



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS DE LA TIERRA**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA**

**“MICRODIVERSIDAD Y DETECCIÓN DE GENES DE DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES  
EN SEDIMENTOS DE LAS CABECERAS ESTUARINAS POM-ATASTA Y PALIZADA-DEL ESTE  
EN LAGUNA DE TÉRMINOS, CAMPECHE”**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA TIERRA**

PRESENTA:

**JESSICA ORCHET POMIER**

Directora de tesis:

Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández

Instituto De Geología, UNAM

Miembros del jurado examinador:

Dr. Luis Amado Ayala Pérez- Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Dra. Blanca Lucia Prado Pano- Instituto De Geología, UNAM

Dra. Silke Cram Heydrich- Instituto de Geografía, UNAM

Dra. Patricia M. Valdespino Castillo- División MBIB, Berkeley Lab

Ciudad Universitaria, CD.MX., Diciembre 2019



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.



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS DE LA TIERRA**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA**

**“MICRODIVERSIDAD Y DETECCIÓN DE GENES DE DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES  
EN SEDIMENTOS DE LAS CABECERAS ESTUARINAS POM-ATASTA Y PALIZADA-DEL ESTE  
EN LAGUNA DE TÉRMINOS, CAMPECHE”**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA TIERRA**

PRESENTA:

**JESSICA ORCHET POMIER**

Directora de tesis:

Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández

Instituto De Geología, UNAM

Miembros del jurado examinador:

Dr. Luis Amado Ayala Pérez- Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Dra. Blanca Lucia Prado Pano- Instituto De Geología, UNAM

Dra. Silke Cram Heydrich- Instituto de Geografía, UNAM

Dra. Patricia M. Valdespino Castillo- División MBIB, Berkeley Lab

Ciudad Universitaria, CD.MX., Diciembre 2019

## **Agradecimientos institucionales**

A la UNAM por permitirme formar parte de su casa de estudio, por darme la oportunidad de superación.

Agradezco al Posgrado en Ciencias de la Tierra, a la ENES-Morelia y el Instituto de Geología por recibirme; por permitirme realizar la maestría, y con ello brindarme la oportunidad de continuar mi desarrollo académico y profesional. Gracias a su claustro de profesores por los conocimientos y herramientas aportadas para mi formación académica

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado (CVU: 865958). Esta investigación se realizó gracias al financiamiento otorgado por CONACyT [No. SEP-CONACYT No.256332]. Así como al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica UNAM-DGAPA-PAPIIT IA202518; *“Metabolismos bacterianos en el antropoceno: presencia y diversidad de genes bacterianos para degradación de xenobióticos en sistemas terrestres y acuáticos de México”*.

A la Dra. Rocío J. Alcántara Hernández investigadora excepcional, por aceptar ser mi tutora y guía, por su paciencia, dedicación y ayuda en todo momento.

Al Dr. Luis Ayala Pérez por todos sus aportes y conocimientos, por abrirnos las puertas de su investigación y formar parte de la nuestra. A Ezel Galindo por permitirnos formar parte de su proyecto y las muestras proporcionadas para poder realizar el nuestro.

A los miembros del comité evaluador de la tesis: Dr. Luis Ayala Pérez, Dra. Blanca Prado Pano, Dra. Silke Cram Heydrich y Dra. Patricia Valdespino Castillo por sus comentarios y sugerencias para mejorar y enriquecer esta tesis.

Se agradece también el apoyo de la Dra. Maricarmen Salazar Ledesma por los análisis realizados en el Laboratorio de Edafología Ambiental perteneciente al Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía (LANGEM). Así como a la Dra. Lucy Mora Palomino por su apoyo técnico en la realización de este proyecto.

## **Agradecimientos a título personal**

Todo esfuerzo tiene finalmente su recompensa y he aquí el fruto del trabajo de muchas personas que me han brindado conocimientos, compañía y consejos.

A mis padres por ser amigos, consejeros y precursores de todos mis sueños; y desde la distancia siempre estar a mi lado

A mi compañero de vida por el amor, por compartir momentos de felicidad y tristeza, el constante apoyo y motivación a lo largo de esta maravillosa aventura profesional que hemos vivido juntos.

A la Dra Rocío, por haberme aceptado, por todo el tiempo invertido, los consejos y la confianza de que se podía. Muchas gracias por recibirme en su extraordinario grupo; sin sus continuas enseñanzas y constante preocupación no hubiese llegado a término el presente trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio: Jaz, Naye, Kary, Dav, Lalin, Yisus, Vic, Alba por abrirme las puertas y darme la oportunidad de trabajar junto a ellos y pertenecer a la familia que somos como grupo, por las horas compartidas y los conocimientos brindados.

A los compañeros del posgrado por los buenos ratos; a los amigos que aunque lejos siguen ahí; a los cubanos que pasaron de compatriotas a ser familia.

A todos los que de una forma u otra aportaron su granito de arena,

MUCHAS GRACIAS.....

# Índice

Índice.....	i
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Marco Teórico.....	5
2.1. Sistemas lagunares.....	5
2.2. Laguna de Términos.....	5
2.2.1. Características de la Laguna de Términos.....	7
2.2.2. Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos (APFFLT) 12	
2.2.3. Pom-Atasta.....	13
2.2.4. Palizada-Del Este.....	16
2.3. Los plaguicidas en los sistemas lagunares.....	19
2.3.1. Plaguicidas organoclorados.....	20
2.3.2. Plaguicidas organofosforados.....	20
2.3.3. Contaminación por plaguicidas en Campeche y Laguna de Términos 21	
2.4. Contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	24
2.4.1. Desarrollo petrolero en la Laguna de Términos.....	24
3. Planteamiento del problema de investigación.....	26
4. Justificación.....	27
5. Preguntas de Investigación.....	28
6. Hipótesis.....	28
7. Objetivos.....	29
7.1. Objetivo general.....	29
7.2. Objetivos particulares.....	29

8.	Materiales y métodos .....	30
8.1.	Búsqueda bibliográfica de genes de degradación. ....	30
8.2.	Muestreo .....	30
8.3.	Caracterización fisicoquímica del ambiente acuático circundante .....	31
8.4.	Determinación de carbono total, carbono orgánico y nitrógeno total .....	32
8.5.	Extracción de ADN, amplificación de fragmentos 16S ARNr y secuenciación.....	32
8.6.	Análisis de las secuencias y diversidad 16S ARNr .....	33
8.7.	Predicción <i>in silico</i> de las capacidades metabólicas de la comunidad 16S ARNr encontradas .....	33
8.8.	Amplificación por PCR de los genes involucrados en la degradación de contaminantes .....	34
8.9.	Análisis estadísticos.....	35
9.	Resultados .....	36
9.1.	Genes de degradación de contaminantes como marcadores moleculares 36	
9.1.1.	Genes <i>alkB</i> y <i>nahA</i> .....	36
9.1.2.	Gen <i>phe</i> .....	37
9.1.3.	Gen <i>tfdA</i> .....	38
9.1.4.	Genes <i>tzrN</i> y <i>atzA</i> .....	38
9.1.5.	Gen <i>linA</i> .....	38
9.1.6.	Gen <i>mola</i> .....	39
9.2.	Caracterización fisicoquímica del ambiente acuático circundante y de los sedimentos muestreados.....	39
9.3.	Análisis del componente 16S ARNr .....	42
9.3.1.	Extracción de ADNmg .....	42
9.3.2.	Secuencias 16S ARNr obtenidas y tamizaje bioinformático .....	43

9.3.3.	Rarefacción y diversidad del 16S ARNr de Bacterias y Arqueas .....	45
9.3.4.	Asignación taxonómica de las secuencias 16S ARNr encontradas.....	48
9.4.	Potencial genético bacteriano para la degradación de contaminantes ...	53
9.4.1.	Predicción de metabolismos de degradación de contaminantes a partir de las secuencias 16S ARNr .....	53
9.4.2.	Detección de los genes implicados en la degradación de contaminantes	54
10.	Discusión.....	56
10.1.	Estructura de la comunidad 16S ARNr.....	56
10.2.	Capacidad genética de degradación de contaminantes .....	58
11.	Conclusiones .....	63
12.	Alcances y perspectivas .....	65
13.	Referencias .....	66
14.	Anexo .....	85
14.1.	Anexo A. Gel de electroforesis para verificación de amplicones 16S ARNr.	85
14.2.	Anexo B. Gel de electroforesis para verificación de amplicones de los genes de estudio .....	85
14.3.	Anexo C. Parámetros físico-químicos de los sedimentos en estudio ..	88



## Resumen

La Laguna de Términos en el Estado de Campeche es el ecosistema lagunar estuarino más grande del Golfo de México y está formado por varios subsistemas lagunares, entre ellos Pom-Atasta y Palizada-Del Este. Estos ambientes son de gran importancia debido a su diversidad biológica, pero el continuo aumento de las poblaciones humanas y las actividades agropecuarias alrededor de éstos, han provocado efectos negativos que se están haciendo evidentes sobre la flora y la fauna de la región. El objetivo de este estudio es caracterizar la diversidad microbiana procarionte en los sedimentos de las cabeceras estuarinas Pom-Atasta y Palizada-Del Este mediante exploraciones del gen 16S ARNr, así como observar patrones de ausencia/presencia del potencial genético relacionado con la degradación de pesticidas e hidrocarburos. Para ello, se obtuvieron muestras de 10 subsitios de cada cabecera estuarina durante la temporada de nortes (Octubre a Enero) y secas (Febrero a Mayo) ( $n=40$ ). Los genes 16S ARNr fueron amplificados a partir de ADN metagenómico y secuenciados (~1.5 millones de secuencias), para después ser asignados taxonómicamente e identificar patrones de distribución de estas comunidades. Asimismo, esta exploración sirvió para hacer una predicción *in silico* asociada a las capacidades de degradación. Finalmente, los genes asociados a la degradación de contaminantes (*phe*, *nahA*, *alkB*, *linA*, *molA*, *trzN* y *atzA*) fueron buscados y sus patrones de presencia/ausencia fueron reportados para ambas temporadas (nortes y secas). Nuestros resultados sugieren que las comunidades de los sedimentos de las cabeceras estuarinas de Palizada-Del Este y Pom-Atasta (Laguna de Términos): i) son diversas, ii) son diferentes entre cabeceras estuarinas, pero parecidas entre los subsitios de muestreo, sin cambios drásticos en la comunidad por la temporada de secas o nortes, iii) cuentan con el potencial para remover compuestos contaminantes, y iv) presentan genes involucrados en la degradación de contaminantes con ligeros cambios en su presencia en la temporada de nortes y secas. Este estudio representa una de las primeras aproximaciones en la descripción de la diversidad microbiana de este sistema Lagunar en México.

## Abstract

The Laguna de Terminos in the state of Campeche is one of the largest estuarine lagoon ecosystems in the Gulf of Mexico and consists of several lagoon systems, such as Pom-Atasta and Palizada-Del Este. These environments are of great importance due to their biological diversity, but the continuous increases in the human populations and agricultural activities in the area have caused negative effects that are becoming evident in the regional flora and fauna. The objective of this study was then to characterize the sediment prokaryotic microbial biodiversity of the estuaries Pom-Atasta and Palizada-Del Este by explorations of the 16S rRNA gene, as well as to observe the absence/presence patterns of the genetic potential related to the degradation of pesticides and hydrocarbons. Samples were obtained from 10 subsites of each estuary during the dry and wind season (Norths) (n = 40) and the metagenomic DNA was extracted. The 16S rRNA genes were amplified and sequenced (~1.5 million sequences), to be later assigned taxonomically and to identify patterns of distribution of these communities. Also, this exploration served to make an *in silico* prediction associated with the degradation capacities. Finally, the genes associated with the degradation of pollutants (*phe*, *nahA*, *alkB*, *linA*, *molA*, *trzN* and *atzA*) were searched and their presence/absence patterns were reported for both seasons (dry and Norths). Our results suggest that the 16S rRNA communities of the estuaries Palizada-Del Este and Pom-Atasta (Laguna de Terminos): i) are highly diverse, ii) are different between estuarine headers, but similar between subsites of sampling, without drastic changes in the community due to the dry season or north, iii) have the potential to remove contaminating compounds, and iv) present genes involved in the degradation of pollutants with slight changes in their presence in the north and dry season. This study represents one of the first to explore the microbial diversity of this lagunar system, which is very relevant in Mexico.

## 1. Introducción

La Laguna de Términos es un ecosistema clave para el estudio de la ecología tropical estuarina y costera del Golfo de México. En los últimos 35 años, este ecosistema situado frente a la Sonda de Campeche ha sido foco de atención nacional e internacional debido a su importancia ecológica, económica y al impacto de las actividades humanas (Yáñez et al. 2012). Asimismo, es una de las lagunas costeras más extensas del país con una superficie aproximada de 2500 km<sup>2</sup> y una gran productividad (Gold et al. 1993; Vázquez et al. 2005). El sistema lagunar está conformado por cuatro sistemas fluvio lagunares: Chumpam-Balchacah, Candelaria-Panlau, Palizada-Del Este y Pom-Atasta.

Considerada como una de las principales cuencas hidrológica del país, cuenta con "hábitats críticos" que permiten la existencia de una elevada biodiversidad de flora y fauna como el manglar, el tular, la vegetación riparia, numerosas especies de fitoplancton y macroalgas, entre otros. Estos hábitats incluyen sus bocas de conexión con el mar, sus sistemas fluvio-lagunares-deltaicos asociados, así como las praderas de pastos sumergidos y los bosques de manglar. Sin embargo, el continuo aumento de las poblaciones humanas alrededor de éstos ha llevado a efectos negativos en la flora y la fauna de la región (Villalobos y Mendoza 2010).

Varios plaguicidas han sido detectados en esta zona costera, su principal origen se atribuye a las actividades agrícolas y a las campañas de salud pública para el control de vectores (Vázquez et al. 2005), así como a las descargas urbanas e industriales aledañas. Por ejemplo, se han detectado residuos del herbicida 2,4-D, glifosato, lindano (hexaclorociclohexano (HCH)) (Vázquez et al. 2005; Arellano y Rendón 2016) y endosulfán (Villalobos y Mendoza 2010; Arellano y Rendón 2016). Aunado a ello, están actividades como el desarrollo turístico, la extracción de petróleo y otras actividades antrópicas que se han intensificado. En conjunto, esto ha devenido en efectos adversos visibles en la biota del sistema, amenazando así su sostenibilidad (Hernández et al. 2011; Chi et al. 2016).

La Laguna de Términos posee una topografía que favorece la acumulación de detritos y sedimentos de granulometría gruesa y muy gruesa (Hernández et al. 2014), los cuales podrían estar acumulando contaminantes hidrofóbicos afines a la

materia orgánica. Ya que, algunos de estos compuestos contienen grupos funcionales cargados que aumentan su capacidad de adsorción por la materia orgánica y los sedimentos. El tipo y naturaleza de los grupos funcionales de la sustancia determina en gran manera su capacidad para ser adsorbida, disminuyendo la concentración en la fase acuosa y gaseosa del contaminante orgánico como también su transporte y su biodisponibilidad (Luthy 2004). Por lo que, el objetivo de esta investigación es conocer la diversidad bacteriana en estos sedimentos y buscar si hay presencia de genes codificantes para enzimas de degradación de contaminantes.

## **2. Marco Teórico**

### **2.1. Sistemas lagunares**

Las lagunas costeras son cuerpos de agua paralelos a la línea de costa que tienen comunicación efímera o permanente con el mar (Lanza y Lozano 1999); y poseen una hidrodinámica compleja regida por la aportación de agua continental mediante ríos, la dinámica de mareas y por procesos de evaporación-precipitación (Villalobos y Mendoza 2010). Los ambientes lagunares-estuarinos son uno de los sistemas acuáticos más productivos en la tierra y constituyen refugios, lugares de reproducción y alimentación importantes para los organismos marinos y de agua dulce que comúnmente viven en ellos o los visitan, ya sea de forma ocasional o estacional. Estos entornos desempeñan un papel prominente para el hombre, debido a su diversidad biológica y las actividades de pesca que generalmente están asociadas. La fauna y la flora que se encuentran en estos sistemas generalmente se caracterizan por un alto grado de adaptación evolutiva al estrés ambiental y, especialmente, a las grandes variaciones en parámetros importantes como la salinidad a la que están constantemente expuestos (Hernández et al. 2011; 2014).

Los estuarios y los mares costeros han sido puntos focales de asentamientos humanos y uso de recursos marinos a lo largo de la historia. Los siglos de sobreexplotación, transformación del hábitat y contaminación han contribuido a la degradación de los estuarios, a la pérdida de biodiversidad y han socavado su capacidad de recuperación ecológica (Lotze et al. 2006). En México, las lagunas costeras y los estuarios cubren del 30-35% de sus litorales, donde el 45% de esta área está ubicada en el Golfo de México y en las costas del Caribe mexicano (Hernández et al. 2011). Entre los estuarios y las lagunas costeras mexicanas sobresale por su elevada riqueza faunística la Laguna de Términos.

### **2.2. Laguna de Términos**

La Laguna de Términos (Fig. 1) localizada en el estado de Campeche está constituida por el conjunto de pantanos fluvio-deltáicos más importante después de los pantanos asociados al río Misisipi (Benítez y Bárcenas 1996; Ayala et al. 2003; Robadue et al. 2004; Amador et al. 2008). Es la laguna más grande de la zona y de mesoamérica (Amador et al. 2008), con una superficie de 7061.47 km<sup>2</sup>; de los

cuales, 2500 km<sup>2</sup> corresponden al cuerpo de agua de la laguna y el resto a la plataforma continental y pantanos asociados (Ayala et al. 2003). Es poco profunda, con una profundidad media de 3.5 m (Currie 2001).

La Laguna de Términos es un ecosistema estuarino influenciado fuertemente por las descargas de agua dulce de tres tributarios ubicados en su parte sur, de oeste a este se encuentran: el río Palizada, el río Chumpan y el río Candelaria, además del río Marentes, el río Las Piñas y el río Del Este (Grenz et al. 2017). Está delimitada por la Isla del Carmen y los intercambios de agua con el mar se realizan a través de dos entradas: una en su parte noreste, Boca de Puerto Real, y la otra en la parte noroeste, Boca El Carmen. Cubre una franja costera de 30 km de ancho que incluye ambientes continentales y marinos; y hacia el continente se extiende 25 km en dirección perpendicular a la línea de costa. Dentro de esta zona, los primeros 15 km hacia el interior, comprenden el área de influencia directa de la interfaz marina, definida principalmente por la presencia de planicies palustres de influencia supramareal. Los restantes 10 km incluyen humedales dulceacuícolas ecológica y antrópicamente interconectados con el área de influencia directa. El límite marino se extiende 5 km hacia el mar y comprende puntos de resurgencias, pastos marinos y sedimentos de origen terrígeno-calcáreo, en movimiento constate por corrientes litorales (Palacio 2006).

De acuerdo con Yáñez et al. (2012), la Laguna de Términos es un ecosistema extremadamente importante para los estudios de gestión integral basados en el ecosistema debido fundamentalmente a:

- Alta productividad primaria natural.
- Alta diversidad ecológica, en términos de especies biológicas, grupos funcionales de conjuntos de población y hábitats.
- Recursos valiosos de peces, ostras, mariscos y vida silvestre, incluida la zona de pesca más importante en el sur del Golfo de México.
- Estacionalidad ambiental y condiciones hidrobiológicas.
- Cambios temporales en el comportamiento ambiental del sistema.
- Actividades actuales de petróleo y gas e industrias petroquímicas.

- La inclusión de una gran parte del ecosistema de la Laguna de Términos en el Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas de México como Área de Protección de Flora y Fauna Silvestre y Acuática.

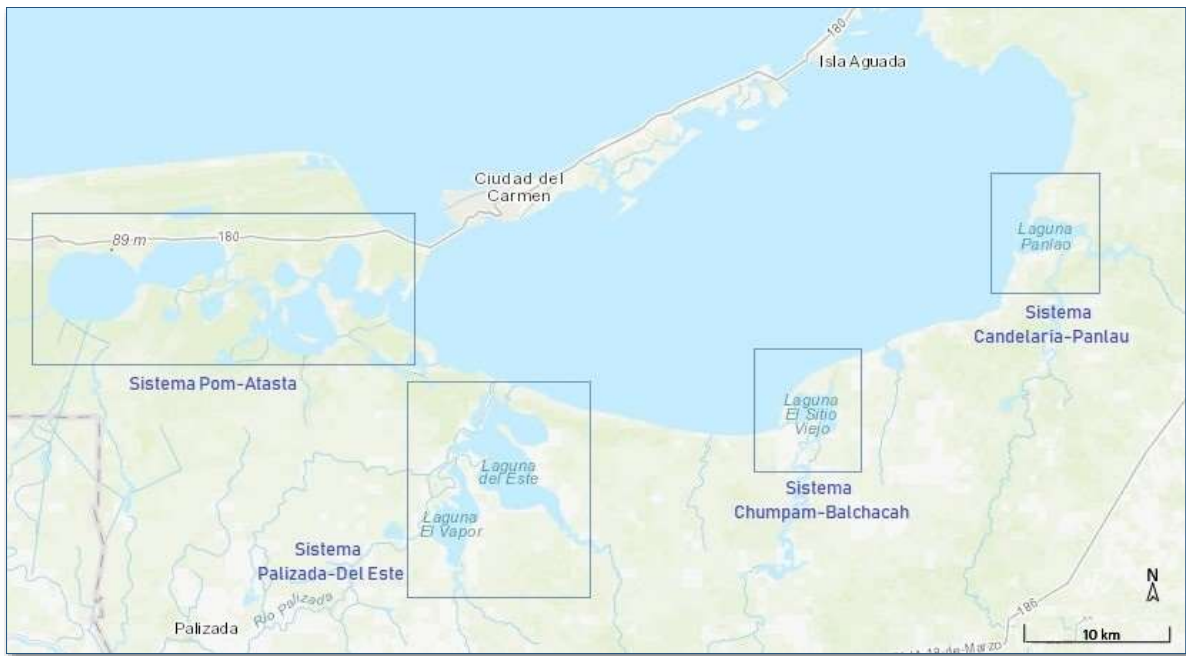


Figura 1. Laguna de Términos, y sus sistemas fluvio-lagunares-estuarinos: cuatro sistemas fluvio lagunares Chumpam-Balchacah, Candelaria-Panlao, Palizada-Del Este y Pom-Atasta.

### 2.2.1. Características de la Laguna de Términos

#### *Clima*

La circulación de agua en la Laguna generalmente sigue una dirección en el sentido de las agujas del reloj; las corrientes de los océanos y los patrones de viento establecen un flujo neto de agua desde la entrada Este de Puerto Real. Esta agua marina se mezcla con agua fresca rica en nutrientes en la laguna y regresa al Golfo de México a través de la Boca El Carmen (Currie 2001; Villéger et al. 2010); esto crea condiciones de alta salinidad (23.5-39.2 dS/m) y agua clara en el extremo Este de la laguna (Yáñez et al. 2012). El flujo de nutrientes resultante ayuda a sustentar numerosas pesquerías en alta mar en la Sonda de Campeche, lo que la convierte en una de las zonas de pesca más productivas de México. Muchas de estas mismas especies pesqueras dependen directamente de las aguas poco profundas y los ecosistemas de manglares de la Laguna como vivero para peces juveniles (Currie 2001).

Hay tres temporadas climáticas en esta región: i) de junio a septiembre, predominan las lluvias con precipitaciones convencionales por la tarde y por la noche asociadas con la zona de convergencia intertropical; ii) de octubre a enero es el período de nortes o tormentas frontales de invierno; iii) y de febrero a mayo es la estación seca, cuando la zona de convergencia intertropical está al sur del Ecuador (Ruiz et al. 2009; Ayala et al. 2012; Yáñez et al. 2012). La temporada de nortes representa la de mayor variabilidad ambiental, con fuertes tormentas asociadas a lluvias durante noviembre, diciembre y enero (Yáñez y Day 1982; Robadue et al. 2004; Grenz et al. 2017). En esta época la frecuente ocurrencia de frentes fríos, provocan una importante disminución de la temperatura ambiente y del agua, un incremento en los procesos de mezcla de agua de diferente origen y alta turbulencia que provoca la resuspensión de materiales (Ayala et al. 2003).

La región presenta además, tres diferentes tipos de clima: clima cálido subhúmedo intermedio con lluvias en verano (Aw1(w)) en Isla Aguada, frente a la Boca de Puerto Real; clima cálido subhúmedo con mayor humedad (Aw2(w)) en la zona que rodea a la Laguna de Términos, incluyendo la Isla del Carmen, y clima cálido húmedo (el más húmedo de los subhúmedos) con abundantes lluvias en verano (Am(f)) en la zona de Palizada, Pom-Atasta hasta el Río San Pedro (Ayala et al. 2012; Amador y Frutos 2015). La temperatura del agua varía entre 19-21 °C en enero-febrero durante la temporada de nortes, hasta 28-30 °C en junio, al final de la temporada seca.

Hay dos sistemas de viento bastante distintos: durante temporada de nortes, principalmente de octubre a febrero, los vientos son del noroeste. Durante la mayor parte del resto del año, existe un sistema de brisa marina que se ve afectado por los intercambios, con vientos predominantemente del Este-Sureste (Ayala et al. 2012).

### *Hidrología*

La Laguna de Términos forma parte del delta de la principal cuenca hidrológica del país, integrada por los ríos Mexcalapa, Grijalva y Usumacinta. Además cuenta con ríos distributarios como el Palizada y tributarios secundarios como Marentes, Las



Piñas, Las Cruces, Chumpán, Candelaria y Arroyo Lagartero, y se encuentra asociada con los sistemas fluvio lagunares deltaicos denominados: Pom-Atasta, Palizada-Del Este, Chumpán-Balchacah y Candelaria-Panlau (Fig. 1) (DOF 1994). El sistema Pom-Atasta no tiene tributarios directos, su hidrología se basa en escurrimientos provenientes fundamentalmente de los ríos San Pedro y San Pablo (Enciso 2000; Martínez 2003).

El río Usumacinta cubre parte de México y Guatemala, es el río más grande de Mesoamérica y uno de los recursos hídricos compartidos más importantes en el hemisferio occidental (Sánchez et al. 2004). Este río es el de mayor volumen de descarga de agua dulce y sedimentos terrígenos hacia el mar en todo México (Robadue et al. 2004; Rivera 2015). El delta está compuesto por el Usumacinta como río principal, y el río Grijalva, como un importante afluente. Este sistema Grijalva-Usumacinta, desarrolla un estuario claramente estratificado que recibe un gran aporte de material terrígeno. El sistema se considera el segundo contribuidor de agua dulce más importante en América del Norte, con un escurrimiento medio anual de  $12.5 \times 10^9$  m<sup>3</sup>/año (Ayala et al. 2012; Grenz et al. 2017).

El río Usumacinta da origen al río Palizada antes de llegar al poblado de Jonuta. Este último río desemboca en la Laguna de Términos a través del sistema fluvio-lagunar Palizada-Del Este (Ayala et al. 2012). La descarga más alta ocurre de septiembre a noviembre con un total promedio de  $6 \times 10^9$  m<sup>3</sup>/año (Robadue et al. 2004).

### *Sedimentos*

Existen dos fuentes principales de sedimentos: sedimentos fluviales y sedimentos calcáreos provenientes de la zona de playa al Este de la Laguna (Lanza y Lozano 1999; García et al. 2004; Robadue et al. 2004). Las arenas calcáreas predominan en el área de la ensenada de Puerto Real y en la parte posterior de la isla; mientras que, los sedimentos limosos se encuentran en las zonas Sur y Oeste (Yáñez y Day 1982; Grenz et al. 2017).

Los sedimentos son predominantemente areno-limosos con cambios laterales a limo-arenosos; están formados por granos de arena fina y de limo grueso a fino

que varían de moderadamente bien a mal clasificados. Las arcillas siempre están asociadas a los limos, ricos en materia orgánica vegetal aportada por los pantanos de manglar. Las gravas y arenas constituyen una fracción menor (2 y 7%, respectivamente); y son clastos aportados por los bancos de almeja u ostión y por los antiguos cordones de playa (Gutiérrez et al. 1982).

La mayoría de los sedimentos en la laguna contienen aproximadamente 50% de carbonato de calcio; en la desembocadura del río Palizada el contenido es de 30-35%, y cerca de la entrada de Puerto Real hay más del 70% (Yáñez y Day 1982). Alrededor del 30% de la laguna está en proceso de deposición de sedimentos, lo que significa que se enfrenta a un importante problema de acumulación de sedimentos (Grenz et al. 2017).

#### *Diversidad biológica*

La distribución de las comunidades de plantas dentro de la laguna refleja claramente las condiciones de circulación, claridad del agua y salinidad de la laguna. Dos entradas conectan la laguna con el mar, y hay un fuerte flujo de red a través de la laguna causada por los vientos dominantes, que resultan en ensamblajes de foraminíferos y macrofauna bentónica, y migración de peces y camarones (Yáñez y Day 1982).

Las áreas costeras son normalmente áreas con intensa actividad biológica, donde los manglares y los pastos marinos juegan un importante papel en el entrapamiento y estabilización de los sedimentos (Amador y Frutos 2015). Casi toda la laguna está rodeada por manglares que se extienden por los ríos y lagos asociados hasta el límite de la influencia marina (Yáñez y Day 1982). Los manglares de la Laguna son considerados como los más representativos del Golfo de México y el Caribe, proporcionan muchos servicios ambientales, al convertirse en medios naturales de control, ya que forman barreras contra inundaciones, evitan la erosión costera, filtran toxinas y remueven nutrientes, además son el hábitat de diversas especies de peces, crustáceos, moluscos con importancia ecológica y comercial (Amador y Frutos 2015).

En el ecosistema lagunar ecosistema, Yáñez et al. (1982) identificaron 45 géneros de fitoplancton: 34 fueron diatomeas, 4 dinoflagelados, 3 clorofitas, 2 cianobacterias y 2 rodofitos, con pocas especies no identificadas de silicoflagelados y coccolithophores. Las diatomeas dominan el fitoplancton neto de la laguna, y se distribuyen a lo largo de la misma.

### *Salinidad*

La marea y la entrada fluvial son los principales procesos que controlan las formas oxidadas de fósforo y nitrógeno inorgánico durante la estación húmeda. Durante la estación seca, los niveles de sustancias químicas inorgánicas parecen estar originados por condiciones locales como la turbulencia, el estado de reducción del tipo de sedimento y la actividad biológica (Yáñez y Day 1982).

La distribución espacial de la salinidad en la laguna mostró la existencia de una corriente marina que entra por Boca Puerto Real y se mezcla con aguas dulces aportadas principalmente por los ríos Palizada, Candelaria y Chumpán. Esto origina una masa de agua de menor salinidad que sale de la laguna por Boca del Carmen, patrón que es inducido principalmente por la acción de los vientos predominantes con dirección noroeste (Lanza y Lozano 1999; Grenz et al. 2017). La mayor salinidad se reporta en la parte oriental de la laguna y durante la estación seca (Yáñez y Day 1982).

En la cuenca central, la salinidad varía desde alrededor de 12 ups (18.8 dS/m) en noviembre cuando se produce la descarga más alta del río durante la temporada de nortes; y en junio al final de la estación seca pueden presentarse hasta 30 ups (46.9 dS/m). También hay una alta intensidad de radiación solar y alta transparencia del agua al final de la estación seca (Yáñez et al. 2012); resultando en una condición polihalina (39-46.9 dS/m) en abril y junio (secas y principio de lluvias), y mesohalina (7.8-28 dS/m) en noviembre (nortes) (Fichez et al. 2017; Grenz et al. 2017).

### *Delimitación de las unidades del paisaje costero*

Desde el punto de vista morfogenético, la laguna es un sistema estuarino secundario de tipo restringido. Se considera secundario, porque ha sido modificado

en su estructura base original por procesos geomorfológicos erosivos-acumulativos de origen marino y fluvial. De tipo restringido, debido a que la comunicación hidrodinámica entre la laguna costera y el mar se encuentra parcialmente obstruida por una serie de barras litorales (Isla del Carmen) dispuestas transversalmente. Por otra parte, desde el punto de vista sedimentológico, se encuentra sobre ambientes marinos marginales, de planicies bajas intermareales y fluvio-deltaicos que originan facies sedimentológicas, dispuestas a manera de franjas, a lo largo de un gradiente tierra-mar.

El sistema de unidades del paisaje en Laguna de Términos está compuesto por dos interfases, 13 geosistemas (5 marinos y 8 continentales) y 12 geofacies. La interfase marina comprende los geosistemas del vaso lagunar y zona marina adyacente, y la interfase continental los geosistemas terrestres regulados por los regímenes de inundación sobre planicies de distintos orígenes (Palacio 2006).

### **2.2.2. Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos (APFFLT)**

Desde la época prehispánica, la Laguna de Términos tuvo una importancia para el aprovechamiento de recursos naturales y de comunicación para las poblaciones mayas; tanto en el sistema lagunar principal como por sus vías fluviales de los ríos Palizada, Candelaria, Chumpán, San Pedro y San Pablo y el estero de Sabancuy (Amador y Frutos 2015).

El gobierno federal publicó un decreto el 6 de junio de 1994 que estableció oficialmente que la región de la Laguna de Términos era un Área Protegida para Flora y Fauna. El decreto estableció un área que cubre 7061 km<sup>2</sup> (Amador et al. 2008), incluyendo la Laguna de Términos y su litoral asociado, la Isla del Carmen, la Península de Atasta y la zona costera hasta 10 metros de profundidad de agua (Currie 2001).

Este decreto como Área Natural Protegida con el carácter de Área de Protección de Flora y Fauna fue con la finalidad de: i) planear y administrar integralmente los recursos ecológicos de la región, ii) proteger las condiciones ambientales para armonizar y dinamizar su desarrollo, y iii) preservar el equilibrio de los hábitat de los

que depende la asistencia, transformación y desarrollo de las especies silvestres y acuáticas (DOF 1994).

El APFFLT ha sido identificado por la CONABIO como un área terrestre, marina e hidrológica prioritaria, además de ser considerada un Área de Importancia para la Conservación de las Aves (AICA). En el ámbito internacional, el área está reconocida como humedales de relevancia internacional por la convención RAMSAR (Convención Relativa a los Humedales de Importancia Internacional) firmada en Irán en 1971 (Gold et al. 2010). En primer lugar, porque en ella descarga el sistema hídrico de agua dulce más importante de México (Grijalva-Usumacinta). En segundo lugar, esta zona resguarda una alta diversidad de animales endógenos y migratorios, con aproximadamente más de 1400 especies. En tercer lugar, porque aquí se reúnen más de 300 especies de flora acuática y terrestre que proveen servicios ambientales que nutren a la región, y de particular relevancia se pueden destacar los distintos tipos de mangle (Amador y Frutos 2015).

La importancia de la Laguna radica no sólo por ser hoy en día un Área Natural Protegida (ANP), sino que es un espacio geo-histórico, social, cultural y geoestratégico internacional para el presente y futuro de la región sureste de México. Por lo que el Estado mexicano ha instrumentado procesos de planeación en el territorio, al menos desde finales de la recién pasada década de los 1980s a la fecha, con el fin de determinar usos y actividades productivas como la petrolera, entre otras (Solano y Frutos 2013).

### **2.2.3. Pom-Atasta**

Dentro del APFFLT, al sur del estado de Campeche y al interior del municipio petrolero de El Carmen, se encuentra la Península de Atasta. En esta microrregión se forma el sistema lagunar deltáico Pom-Atasta (Fig. 2), el cual está asociado al ecosistema marino del Golfo de México, en donde ocurren diversos eventos hidrometeorológicos como huracanes, ciclones y tormentas tropicales. La población total de la Península de Atasta es de 13 mil 891 habitantes, la cual se encuentra distribuida en seis localidades: Pueblo de Atasta, Puerto Rico, Nuevo Progreso,

Emiliano Zapata, San Antonio Cárdenas y Nuevo Campechito (Amador y Frutos 2015).



Figura 2. Sistema lagunar Pom-Atasta

Las lagunas Atasta y Pom, típicas de litoral, cubren un área aproximada de 80 km<sup>2</sup>, sin considerar a las lagunas pequeñas y a las lagunetas; de los cuales 50 km<sup>2</sup> corresponden a la Laguna Pom, que es la de mayores dimensiones (Gutiérrez et al. 1982). La laguna de Atasta es alargada, con un eje principal de 9 km de longitud orientado al noroeste-suroeste. Mientras que, la laguna de Pom tiene una forma elipsoidal con un diámetro mayor de aproximadamente 10 km de longitud (Ruiz et al. 2009). Ambas lagunas, Atasta y Pom, están comunicadas entre sí por un canal angosto conocido como Boca del Pom. Este canal es el remanente de la porción central del cuerpo lagunar, que por los procesos hidrodinámicos y de sedimentación ha experimentado un pronunciado angostamiento, con acreción de pantanos de manglar (Gutiérrez et al. 1982).

El origen del grupo de las lagunas, del que forma parte el sistema Pom-Atasta, se debe al aporte de sedimentos terrígenos y a los movimientos laterales de los ríos Usumacinta, San Pedro y San Pablo. La forma y las dimensiones de las lagunas están siendo modificadas por la tasa de sedimentación (Amador y Frutos 2015), que

se estima como alta, por la acreción de los pantanos de manglar y por el desarrollo de los bancos de ostión y de almeja (Gutiérrez et al. 1982).

Estas lagunas están sujetas a impactos ambientales tales como la construcción de la infraestructura petrolera, el dragado de la laguna de Pom para instalar tuberías que transportan petróleo crudo y gasolina, la remoción de manglares con el fin de utilizar el terreno para fines agrícolas y la instalación de plataformas de perforación, las incipientes actividades acuícolas y los asentamientos humanos (Ruiz et al. 2009). La industria petrolera es la fuente económica más importante del sistema, y que además, ha traído efectos ambientales durante los trabajos de exploración, explotación y distribución de hidrocarburos (González 2002; Aguirre y Díaz 2006). Por lo que el sistema Pom-Atasta, en comparación con los otros tres sistemas asociados a la Laguna de Términos, es considerado el más impactados por el hombre, además de ser el de mayor superficie y de mejor acceso para la pesca (Barreiro y Aguirre 1999).

En la mayoría de los poblados (Emiliano Zapata, Nuevo Progreso, San Antonio Cárdenas, Puerto Rico, Atasta) predominan la siembra de maíz, frijol y la plantación de la Palma de Coco. Los habitantes del municipio se dedican en un gran porcentaje a las labores agrícolas (CIL 2007).

La Península de Atasta ha sido una de las zonas del APFFLT en donde mayor presencia tiene la actividad petrolera, la cual ha ocurrido en dos etapas. En una primera etapa denominada de ocupación territorial moderada (1950-1988), en la cual PEMEX perforó sólo 33 pozos; y la segunda etapa denominada de ocupación territorial de expansión intensiva (1994-2014), estando ya vigente la declaratoria del nuevo ordenamiento territorial del ANP. En tan solo 20 años, la paraestatal amplió sus áreas; sin embargo, esta última etapa sigue en expansión, dando un amplio margen de maniobra a la paraestatal sobre el territorio protegido (Amador y Frutos 2015).

El sistema Pom-Atasta pertenece a una interfaz marina y es una geofacie limnológica-estuarina determinada por la confluencia de flujos de agua marinos y continentales con diferentes características hidrodinámicas y sedimentológicas. Como resultado, tiene una sedimentación terrígena diferencial y marino calcárea

que genera rasgos geomorfológicos de transición entre ambientes marinos, fluvio-palustres y fluviales, acorde a la energía relativa de las corrientes de deriva litoral, las mareas, el oleaje y los volúmenes de los flujos de agua fluvial. La zona con mayor influencia continental es dentro del vaso lagunar, esto debido a que los aportes de agua dulce asociados representan el 76% del total que ingresa a la laguna a través de Río Palizada. La salinidad del sistema refleja los gradientes típicos estuarinos entre aguas dulces y ambientes mesohalinos (<28 dS/m) (Palacio 2006).

#### **2.2.4. Palizada-Del Este**

Se localiza en la porción Sur-Oeste de la Laguna de Términos e incluye: i) la desembocadura del río Palizada en dos ramales y sus deltas respectivos; ii) tres lagunas denominadas Vapor, Del Este y San Francisco (Fig. 3) (con una superficie conjunta de 89 km<sup>2</sup>); iii) la desembocadura de tres ríos secundarios, Las Piñas, Marentes y Las Cruces, y iv) la conexión con la laguna de Términos mediante dos bocas, siendo la occidental la principal y denominada Boca Chica (Benítez y Bárcenas 1996; Villalobos y Mendoza 2010; Escamilla et al. 2014; Ayala et al. 2015). Palizada comprende a diecinueve localidades y una población total de 6 mil 289 habitantes (Amador y Frutos 2015), presenta un intervalo de salinidad promedio de 0 a 12.5 dS/m, temperatura de 22 a 31 °C y transparencia de 48 a 66% (Ayala et al. 2015).





Figura 3. Sistema lagunar Palizada-Del Este

El sistema Palizada además de constituir el principal aporte dulceacuícola de la Laguna de Términos, posee grandes comunidades de vegetación acuática, así como mangles de tipo ripariano, considerados como los de mayor desarrollo del continente. Estos grupos florísticos en los sistema costeros, actúan como filtros de sedimentos, nutrientes y contaminantes, reciclando los nutrientes para transformarlos en materia orgánica (Vázquez et al. 2005).

El río Palizada es el brazo más caudaloso del Usumacinta, con meandros diversos a través de una planicie aluvial baja y pantanosa, cubierta por vegetación. También recibe las aguas del arroyo Blanco, sigue su curso hasta unirse con el río Viejo y desemboca en la Laguna del Este, donde también desembocan pequeñas corrientes de los ríos Piñas y Marentes, que finalmente salen por Boca Chica a la Laguna de Términos (Villalobos y Mendoza 2010).

Las actividades agrícolas y pecuarias han sido el principal agente detonador de cambio de uso de suelo, que es una fuente potencial de contaminación a la columna de agua, sedimentos y organismos de su sistema fluvio lagunar (Ramos y Villalobos 2015). La agricultura ocupa una superficie de 9633.41 ha, que representa el 4.65%

de la superficie total de la microcuenca. Se realizan tres tipos de cultivo agrícola predominantemente: arroz, sorgo, y manutención; que consiste en la producción de maíz, frijol, chile, mango, entre otros. El cultivo de arroz y sorgo realizado por empresas privadas presenta el 0.68% de superficie de la microcuenca (205.1 ha); mientras que, el cultivo de manutención cubre aproximadamente un 78% de la superficie del total de ésta.

El cultivo de arroz es el más importante y su principal fuente de contaminantes debido a las características de resistencia que presenta ante la inundación. Contrariamente, los cultivos de manutención son más sensibles a la humedad y presentan mayores pérdidas en caso de inundación (Escamilla et al. 2014). Los productos más utilizados en esta unidad son los herbicidas propanilo, 2,4-D y molinato, así como el insecticida malatión. Éstos representan el 70% del total de los plaguicidas utilizados en las cuencas de drenaje de los sistemas fluvio-lagunares (Benítez y Bárcenas 1996). La comunidad “El Juncal” es una de las principales productoras de arroz en Palizada. En ella, todos los productores utilizan fertilizantes, predominando los compuestos en mayor medida por fósforo, y el 100% lo aplican en el mes de mayo y de forma manual (Ángeles et al. 2016).

El sistema Palizada-Del Este se ubica dentro de la interfase continental, clasificado con un geosistema fluvio lacustre-estuarino; donde van a interactuar activamente procesos fluviales, lacustres y marinos. En función de la intensidad relativa y los tipos de interacciones se pueden diferenciar tres subzonas: baja, media y alta. En la baja existe un encuentro frontal entre el prisma mareal que entra a la Laguna de Términos por las bocas del Carmen y Puerto Real y el caudal fluvial de los ríos de la región, originando cuerpos fluvio-lacustres de influencia marina en ambientes mesohalinos continentales. Desde el punto de vista sedimentológico, existe una transición entre facies clástico-silíceas y facies litorales de arenas calcáreas afectadas por mareas. La subzona media está compuesta por ambientes estuarinos oligohalinos (0.8-4.7 dS/m), producto de la mezcla de mayores volúmenes de agua dulce y menores de agua salobre. Presentan alta turbidez en la época de lluvias y predominio de depósitos de grano fino y fragmentos vegetales.

Finalmente, la subzona alta del geosistema, se encuentra aguas arriba sobre los lechos fluviales, con salinidades de 0.2 dS/m (Palacio 2006).

### **2.3. Los plaguicidas en los sistemas lagunares**

En las últimas décadas y a partir del modelo de agricultura industrial impulsado en el país, el uso de plaguicidas (insecticidas, fungicidas y herbicidas) y fertilizantes sintéticos ha aumentado de forma preocupante (Arellano y Rendón 2016). Los plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias que se destinan a controlar plagas, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causan perjuicio o que interfieren con la producción agropecuaria y forestal (Chi et al. 2016; Bejarano 2017).

Estas sustancias representan un riesgo para la salud humana y del ambiente debido a que pueden contaminar suelos, agua, sedimentos y aire (Hernández y Hansen 2011; Akbar y Sultan 2016; Arellano y Rendón 2016), debido a que llegan a cuerpos de agua por escurrimiento, infiltración y erosión de los suelos, en lugares donde se han aplicado. También pueden movilizarse por transporte tanto atmosférico como por escurrimiento durante lluvias o riego agrícola y, de esta manera, transportarse hacia cuerpos de agua, tanto superficiales como subterráneos hasta contaminar agua y sedimentos (Hernández y Hansen 2011). Algunos estudios realizados indican que el porcentaje de plaguicidas que son arrastrados por las aguas de escorrentía puede fluctuar del 0.5 al 5% de lo aplicado en los campos de cultivo (Benítez y Bárcenas 1996).

Los sedimentos son el hábitat natural y la fuente de alimento para muchas especies de organismos, las cuales pueden ser afectadas de manera directa o indirecta por la presencia de algún contaminante (Villalobos 1990). En los trópicos como la Laguna de Términos, los campos de arroz han sido identificados como uno de los principales contribuyentes de residuos de plaguicidas que contaminan el medio ambiente; además de la práctica común de drenar el agua de arroz en canales de irrigación que eventualmente fluyen hacia el sistema de agua dulce y luego al medio marino (Abdullah et al. 1997).

Debido a que los plaguicidas son transportados largas distancias dependiendo de su persistencia, pueden afectar a organismos que estén alejados de la zona de influencia. Tal es el caso del DDT aplicado en zonas tropicales y que se ha detectado como DDE en el Ártico viajando miles de kilómetros (Chi et al. 2016).

### **2.3.1. Plaguicidas organoclorados**

Los compuestos organoclorados fueron los primeros en emplearse en el control de insectos por su alta efectividad en eliminarlos (Chi et al. 2016). Debido a su carácter persistente, toxicidad y propiedades bioacumulativas, éstos son de particular preocupación (Abdullah et al. 1997; Vázquez et al. 2005). En general, son muy estables química y bioquímicamente, su vida media en el ambiente es superior a los diez años. En muchos casos, sus productos de degradación parcial son más estables que el compuesto original. Uno de los principales representantes de este grupo es el hexaclorociclohexano (HCH), del cual sólo el isómero gamma (lindano) tiene actividad insecticida. Uno de los compuestos organoclorados más importantes es el diclorodifeniltricloroetano (DDT), mientras que otros compuestos representantes de esta categoría son el aldrín, dieldrin, endrín, heptacloro, endosulfán, mirex, clordecona (kepona) y clordano (Vázquez et al. 2005). En 1991, se prohibió el uso de seis plaguicidas organoclorados: aldrina, dieldrina, endrina, mirex, toxafeno y clordano (Borabe et al. 2013).

Aun cuando el inventario del uso de plaguicidas demostró que muchos de los plaguicidas organoclorados no se aplican en la actualidad (Hernández y Hansen 2011), en este estudio se analizaron algunos que por ser persistentes -con vidas medias superiores a 18 meses-, se adsorben en materia orgánica y, por lo general, tienen baja movilidad. Además, estos plaguicidas pueden persistir en la atmósfera por largos períodos y viajar grandes distancias antes de depositarse, por lo que pueden contaminar a cuerpos de agua lejanos del sitio donde fueron aplicados.

### **2.3.2. Plaguicidas organofosforados**

Los plaguicidas organofosforados fueron desarrollados durante la Segunda Guerra Mundial (Vázquez et al. 2005). Son menos persistentes en el ambiente que los

organoclorados (Ortíz et al. 2014); sin embargo, son sustancias mucho más tóxicas que se han vinculado a efectos adversos a la salud de diferentes especies, incluyendo a las poblaciones humanas (Arellano y Rendón 2016).

Estos compuestos son usados muy ampliamente como insecticidas, nematocidas y defoliantes. Algunos ejemplos son el diazinón, el monocrotofos, malatión, el paration, el metil paratión y el fosdrín. En general, son poco estables química y bioquímicamente y, por lo tanto, su tiempo de vida ambiental media va de una semana a algunos meses (Vázquez et al. 2005).

### **2.3.3. Contaminación por plaguicidas en Campeche y Laguna de Términos**

Los ecosistemas costeros de Campeche revelan altas concentraciones (>1000 µg/g) de hidrocarburos y pesticidas en los sedimentos (Nava et al. 2018), debido al impacto drástico de la presión humana durante las últimas décadas (Amador et al. 2008; Yáñez et al. 2012; Hernández et al. 2014). Entre los principales cultivos en la cuenca están el arroz, maíz y chile, los cuales comprenden cerca de 40 000 ha y corresponden al 85% del área cultivada. En general, como sucede en todo el país, no se cuenta con una asesoría que brinde las indicaciones necesarias para una aplicación segura de los plaguicidas;. La información directamente relacionada sobre el uso de plaguicidas no es fácil de obtener; sin embargo, existen algunos estudios que indican qué tipo de plaguicidas se emplean en el estado de Campeche y que afectan la Laguna de Términos. (Rendón et al. 2004; Vázquez et al. 2005; Villalobos y Mendoza 2010; Arellano y Rendón 2016).

El carbofuran es el plaguicida con mayor cantidad de criterios de peligrosidad que se emplea en Campeche (Bejarano 2017). Por otra parte, los plaguicidas metomilo, metamidofos, paratión metílico, ometoato y endosulfán son de los plaguicidas que tienen tres criterios de peligrosidad, aunque es importante resaltar que en el 2016, después de muchos años, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) retiró el permiso para el uso del endosulfán (Bejarano 2017).

Plaguicidas como el DDT dejaron de usarse en México oficialmente desde el año 2000 (Chi et al. 2016) para el control de vectores de enfermedades como el

paludismo y dengue. Sin embargo, en el área de Laguna de Términos se ha reportado la presencia de compuestos de las familias del diclorodifeniltricloroetano (DDT), endosulfanes, drines, clordanos, isómeros del hexaclorociclohexano (HCHs) y clorpirifos, tanto en sedimento como en biota acuática (Carvalho et al. 2009). Mientras que se ha dejado de lado el conocimiento sobre el impacto de estos compuestos en los organismos terrestres.

Desde 1995 ya se reportaban concentraciones de plaguicidas y policlorobifenilos (PCBs) en los sedimentos y biota (ostiones, almejas, camarones) de la parte baja del Río Palizada; y de hidrocarburos en la Laguna de Pom (Gold et al. 2010). Asimismo, estudios realizados en la Laguna de Términos presentados por Villalobos y Mendoza (2010) muestran residuos de plaguicidas organoclorados y PCBs en catorce bancos ostrícolas de *Crassostrea virginica*. De acuerdo con la distribución de éstos, concluyen que se originan en ciudades y pueblos alrededor de la laguna, vinculados con residuos procedentes de talleres de reparación y otras actividades industriales. Otro estudio realizado por Vidal et al. (2006) en la zona de Campeche determinó la presencia de metales pesados, hidrocarburos aromáticos, plaguicidas y PCBs en camarón rosado (*Farfantepenaeus duorarum*). Los resultados indican que prácticamente todos los camarones presentaron residuos de cada uno de los grupos de contaminantes mencionados.

Díaz et al. (2005) determinaron residuos de plaguicidas organoclorados en peces procedentes de los sistemas fluvio lagunares de Candelaria-Panlau (*Arius melanopus*) y Palizada (*Cichlasoma* spp.) circundantes a la Laguna de Términos. El estudio encontró las más altas concentraciones de DDT en el sistema Palizada-Del Este. Es importante recordar que el  $\Sigma$ DDT está limitado a un uso restringido, según el catálogo oficial de plaguicidas (COP 2004) y al igual que el lindano y el endrín, forma parte de la llamada “docena sucia” de plaguicidas por su peligrosidad (Díaz et al. 2005; Arellano y Rendón 2016). Esta alta concentración del DDT en el sistema Palizada coincide con los resultados de Carvahillo et al. (2009), donde el análisis de agua filtrada reveló la presencia de varios compuestos organoclorados en la fase disuelta, como los productos de degradación del DDT y varios PCBs. La más alta concentración de DDT en agua se midió en la cuenca del río Palizada. Así mismo,

un análisis de los sedimentos costa sur de Campeche -donde incluyeron la desembocadura del río Palizada-, encontraron varios plaguicidas organoclorados como el HCH, aldrín, epóxido de heptacloro, DDT y metoxicloro (Vázquez et al. 2005). Estos compuestos están asociados directamente a la descarga del río y al elevado contenido de materia orgánica determinado.

Arellano y Rendón (2016) en su estudio sobre el empleo de plaguicidas en la Península de Yucatán, analizó 5 puntos en la Laguna de Términos: Pom-Atasta, Palizada, Estereo Pargo, Panlau y Balchacah. Como parte de los resultados, encontró residuos de plaguicidas organoclorados en todas las muestras analizadas; sin embargo, no detectaron residuos de plaguicidas organofosforados. Estos resultados los relacionaron con las fechas en que realizaron el muestreo, ya que en octubre y diciembre no es temporada de aplicación y los organofosforados no son tan persistentes. Asimismo, todas las zonas analizadas en este estudio presentaron residuos de endosulfán; con elevadas concentraciones de HCH en Palizada. Además, altas concentraciones de drines y DDT en las aguas de Panlau y Pom-Atasta. Aunque varios de estos compuestos han sido prohibidos desde hace tiempo, su alta persistencia en el ambiente hace que todavía se detecten en diversos sustratos ambientales.

También se ha evaluado la exposición de tres especies de ratones silvestres (*Oryzomys couesi*, *Peromyscus leucopus* y *Reithrodontomys gracilis*) a plaguicidas anticolinérgicos y organoclorados en nueve sitios de Laguna de Términos. Veinte compuestos organoclorados fueron detectados en el hígado de los ratones, de los cuales sólo el lindano, el aldrin y el heptacloro se encontraron en cantidades que sugerían una exposición reciente, atribuyendo esta exposición a deposiciones atmosféricas (Chi et al. 2016).

En estudios realizados hace 20 años, no se reportó al glifosato como uno de los herbicidas de amplio uso en el estado. Sin embargo, actualmente el glifosato es uno de los productos más vendidos en el estado, y principalmente asociado a la soya transgénica (Bejarano 2017).

## **2.4. Contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se encuentran entre los grupos de contaminantes orgánicos más ampliamente distribuidos en el ambiente altamente persistentes en suelos y sedimentos (Vázquez et al. 2005; Cébron et al. 2008).

Actualmente se asume que los HAPs en el medio costero y marino provienen de fuentes antropogénicas como descargas urbanas, vertimientos accidentales, de las plataformas y pozos petroleros e ingresan a la zona costera, asociada con partículas y coloides en la columna de agua, que floculan y sedimentan hacia la interfase agua-sedimentos. De esta forma, los sedimentos y las partículas asociados a los contaminantes están disponibles para la biota y se bioacumulan. Los HAPs se caracterizan por su baja hidrosolubilidad y de baja a moderada volatilidad y su vida media varía de una semana a dos meses para ambientes acuáticos, de dos meses a dos años en suelos y de 8 meses a 6 años en sedimentos (Vázquez et al. 2005).

Cada fracción de petróleo suele estar compuesta por cientos de diferentes moléculas de hidrocarburos en lugar de una composición definida. Por lo tanto, las fracciones son diferentes en términos de volatilidad, biodisponibilidad, toxicidad, degradabilidad y persistencia (Fuentes et al. 2014). Esta compleja serie de compuestos representa un desafío para el diseño de estrategias de biorremediación efectivas.

### **2.4.1. Desarrollo petrolero en la Laguna de Términos**

El desarrollo socioeconómico en la Laguna de Términos ha aumentado considerablemente en las últimas décadas debido al crecimiento de la industria petrolera. La contaminación por petróleo está considerada como uno de los principales problemas ambientales en la zona, la cual se incrementa día con día debido al uso del petróleo como el principal recurso energético (Vázquez et al. 2005; Conan et al. 2017).

La compañía petrolera nacional, Petróleos Mexicanos (PEMEX), ha tenido una presencia significativa en la región de Laguna de Términos desde la década de 1970 (García et al. 2004). Esta presencia se ha concentrado en la ciudad de El Carmen



y la Península de Atasta, pero ha influido en toda la región a través de estudios sísmicos y de exploración (Currie 2001; Sánchez et al. 2004). Tras la llegada de Pemex, los núcleos poblacionales han crecido de tal forma que en el caso de Ciudad del Carmen, se comenzó a generar un alto volumen de aguas residuales que generalmente desembocan en la Laguna y el Golfo de México (Amador y Frutos 2015).

Tres cuartas partes del petróleo de México y la mitad de su gas natural son extraídos por plataformas marinas en el Golfo de México más allá de los límites del Área Protegida de la Laguna de Términos. Una red de tuberías conecta estas plataformas con la costa dentro del área en la Península de Atasta, al Oeste de la Laguna. Además de la exploración y los pozos de petróleo, PEMEX tiene una planta de recompresión en la Península de Atasta para presurizar el gas natural para su envío por las instalaciones de procesamiento de tuberías más hacia el oeste en el estado de Tabasco. Las actividades físicas de PEMEX han alterado el uso del suelo, modificado el flujo natural de los ríos y la escorrentía superficial (Currie 2001).

### **3. Planteamiento del problema de investigación**

En años recientes, las actividades ganaderas y agrícolas –como una extensa y creciente producción arrocerá– han cobrado gran importancia en las zonas aledañas a la Laguna de Términos (Vázquez et al. 2005). Esto ha conllevado a que el uso de plaguicidas y fertilizantes sintéticos haya aumentado de forma preocupante. Algunas de estas sustancias además pueden ser altamente persistentes en los sistemas biológicos, transportándose a través del ambiente aún después de su aplicación (Delgado et al. 2015). Tan sólo en México, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se usaron en promedio 4.55 toneladas de plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) por cada 1000 hectáreas entre el año 2009 y 2010, y sólo en 2016 se emplearon 1.88 kg/ha de plaguicidas (<http://faostat3.fao.org/browse/E/EP/E>). Sin embargo, debido a la falta de regulación y monitoreo en el país, no se tiene información detallada sobre el uso de estas sustancias y cuáles son (Arellano y Rendón 2016).

En un estudio realizado en el 2010, se mostró que existen residuos del herbicida 2,4-D en agua de pozo de algunas localidades de Campeche (Arellano y Rendón 2016). Paralelamente, todas las zonas estudiadas presentaron residuos de endosulfán, situación alarmante debido a la falta de actualización del catálogo oficial de plaguicidas. Asimismo, la Laguna de Términos muestra no sólo presencia de endosulfán, sino también de glifosato. Investigaciones previas revelan el riesgo ambiental existente en ambientes costeros sometidos a la influencia de las actividades agropecuarias imperantes en la región (Vázquez et al. 2005), ya que la normatividad mexicana señala que está prohibido el uso de compuestos clorados como el aldrín y sus derivados, y restringida la aplicación de DDT y lindano (γHCH).

Asimismo, y en forma conjunta, la explotación petrolera se ha intensificado en la zona del Golfo, implicando procesos de contaminación asociados a la extracción, producción y al incremento en el transporte vehicular de la zona. En las últimas tres décadas PEMEX ha enfocado sus esfuerzos en los depósitos de hidrocarburos al oeste y al norte del área protegida. Los agricultores y pescadores locales han acusado repetidamente a esta compañía de contaminar suelos y aguas locales. En

todo el mundo, México ocupa el tercer lugar en producción de petróleo, primer lugar en producción de petróleo costa afuera, y noveno en reservas de crudo. Aproximadamente el 80% de su producción proviene de la región de Laguna Términos y área marina adyacente (Benítez et al. 2012; Delgado et al. 2015).

#### **4. Justificación**

El Área Natural Protegida de Laguna de Términos es una zona costera con gran relevancia hidrogeográfica, además de ser un albergue de biodiversidad en México. Pese a esta importancia, a la fecha no existen estudios de la diversidad microbiana de sus sedimentos, los cuales son receptores de grandes caudales, como el río Usumacinta. Asimismo, los sedimentos son espacios de intercambio de materia y energía que forman microespacios óxicos/anóxicos que favorecen la transformación de diversos compuestos contaminantes. La detección y cuantificación de los genes involucrados en la degradación de contaminantes, así como la caracterización de la diversidad bacteriana, es fundamental para la determinación de la biodiversidad microbiana procarionte en los sedimentos del Área Natural Protegida de Laguna de Términos y contribución en la degradación de contaminantes. La presencia de genes relacionados con la degradación de contaminantes como pesticidas, herbicidas e hidrocarburos pueden ser indicadores genéticos que ayudan a reconocer si existe una selección en las comunidades microbianas degradadoras en los sedimentos y si hay microorganismos con la capacidad de atenuar naturalmente la contaminación de este sistema costero.

## 5. Preguntas de Investigación

Derivado de esto, este proyecto de investigación pretende resolver las siguientes preguntas:

- ¿Cómo es la microdiversidad en los sedimentos superficiales de las dos cabeceras estuarinas principales de la Laguna de Términos?
- ¿Existirá el potencial genético para la degradación de contaminantes como la atrazina, el molinato, lindano, fenoles e hidrocarburos?
- ¿Existirán patrones de distribución de estos genes?

## 6. Hipótesis

- Existirá una gran diversidad microbiana (bacterias y arqueas) en los sedimentos superficiales de las cabeceras de Palizada-Del Este y Pom-Atasta.
- La determinación de aquellos genes considerados como indicadores de contaminación (*phe*, *nahA*, *alkB*, *linA*, *molA*, *trzN* y *atzA*), permitirá evaluar si la presencia de estos genes está asociado a reportes previos de contaminación en las dos cabeceras estuarinas de la Laguna de Términos, Pom-Atasta y Palizada-Del Este.
- Debido a la localización de las dos cabeceras estuarinas, habrá un patrón de distribución diferencial de presencia/ausencia de estos genes; siendo en Pom-Atasta donde se encuentren genes asociados a la degradación de hidrocarburos y en Palizada-Del Este aquellos de lindano, molinato y atrazina.

## **7. Objetivos**

### **7.1. Objetivo general**

Caracterizar la diversidad microbiana de los sedimentos de las cabeceras estuarinas Pom-Atasta y Palizada-Del Este mediante exploraciones del gen 16S rRNA, así como observar patrones de ausencia/presencia del potencial genético relacionado con la degradación de pesticidas e hidrocarburos.

### **7.2. Objetivos particulares**

1. Seleccionar los genes involucrados en la degradación de los principales contaminantes encontrados en las cabeceras estuarinas de estudio como marcadores moleculares.
2. Caracterizar el ambiente acuático circundante y los sedimentos de las cabeceras estuarinas de estudio.
3. Caracterizar el componente 16S ARNr de los sedimentos y predecir su capacidad potencial de degradación de contaminantes.
4. Amplificar mediante PCR los genes *phe*, *nahA*, *alkB*, *linA*, *molA*, *trzN* y *atxA* involucrados en la degradación de contaminantes.

## 8. Materiales y métodos

### 8.1. Búsqueda bibliográfica de genes de degradación.

Basados en la historia de contaminantes detectados en la Laguna de Términos, se realizó una búsqueda de genes relacionados con estos compuestos y su degradación. Para este estudio se seleccionaron entonces los siguientes marcadores (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los *primers* empleados en este estudio

Primers	Secuencia (5'-3')	Tamaño de amplicon (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)	Referencia
<b>Degradación de alcanos</b>				
alkBFd	AAC TACMTCGAR CAYTACGG	100	50	(Powell et al., 2006)
alkBRd	TGAMGATGTGGTYRCTGTTCC			
nahAc-7	ACTTGTTCCGGAGTTGATG	136	57	(Liu et al., 2015)
nahAc-R	CAGGTCAGCATGCTGTTGTT			
<b>Degradación de fenoles</b>				
phe-F	GTGCTGACSAAYCTGYTGTT	206	49	(Baldwin et al., 2003)
phe-R	CGCCAGAACCAYTTRTC			
<b>Degradación de molinatos</b>				
molA-F94	CAGGATCACGAAGGTTGGTT	1100	55	(Lopes et al., 2013)
molA-R1122	ATCCACACGAAGTGGTCCTC			
<b>Degradación de HCH</b>				
linA-f	GACCATGGTGATGAGTGATCTAG	480	55	(Sharma et al., 2014)
linA-r	GTAAGCTTTTATGCGCCGGACG			
<b>Degradación de ácidos fenoxialifáticos (2,4-D y 4-cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA))</b>				
tfdAf	AACGCAGCGRTRTCCCA	220	64	(Bælum et al., 2006)
tfdA**f	GAGCACTACGCRCTGAAAYTCCCG			
<b>Degradación de atrazina</b>				
trzNf	CACCAGCACCTGTACGAAGG	420	55	(Mulbry et al., 2002)
trzNr	GATTCGAACCATCCAAACG			
atzAr	TGA AGC GTC CAC ATT ACC-	500	50	(De Souza et al., 1998)
atzAf	CCA TGT GAA CCA GAT CCT			

Los oligonucleótidos iniciadores o *primers* fueron enviados a sintetizar (Sigma-Aldrich) para después ser empleados en los ensayos de PCR.

### 8.2. Muestreo

Se tomaron muestras de sedimentos en 20 sitios: 10 sitios en la zona de Pom-Atasta (PA) y 10 sitios en Palizada-Del Este (PE); durante la temporada de nortes en el mes de noviembre y en la época de secas en abril (Fig. 4). Además, se consideró una muestra control del río Palizada recolectada durante el período de nortes (RPen). En todos los sitios se recolectaron sedimentos superficiales de 0 a 30 cm

muestreados con una draga Van Veen de los cuales, aproximadamente 50 g se colocaron en tubos estériles y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. El trabajo de campo fue realizado por personal del Laboratorio de Ecología Aplicada de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, con quienes se colabora para este proyecto.

Los muestreos de la temporada de nortes se realizaron durante el mes de noviembre, donde se registra la mayor descarga de agua por parte de los ríos luego de la temporada de lluvias en la región (García et al. 2013). Las muestras de la época de secas fueron recolectadas en abril, donde se registran los valores mínimos de precipitación, se producen las temperaturas máximas, la velocidad del viento disminuye y las descargas de los ríos son mínimas produciéndose el menor aporte de sedimentos (Yáñez et al. 2012; Contreras et al. 2014).



Figura 4. Representación de la ubicación de los sitios de muestreo en las cabeceras estuarinas de Pom-Atasta y Palizada del Este.

### 8.3. Caracterización fisicoquímica del ambiente acuático circundante

Se caracterizó el ambiente fisicoquímico circundante a los sedimentos empleando una sonda multiparamétrica YSI-556 MPS, la cual fue colocada cerca de los mismos antes de tomar las muestras. Con ésta se determinó el pH, conductividad eléctrica y oxígeno disuelto.

#### **8.4. Determinación de carbono total, carbono orgánico y nitrógeno total**

De cada muestra de sedimento obtenida se pesaron 5 g y posteriormente se pusieron a secar durante 24 horas, se molieron y se pasaron por un tamiz de 0.5 mm, para la determinación de carbono total ( $C_{Tot}$ ), carbono orgánico ( $C_{Org}$ ) y nitrógeno total ( $N_{Tot}$ ). Para el carbono total se utilizó un analizador elemental CNHS/O Perkin Elmer 2400 series II en modo CHN; utilizando como gas acarreador Helio, a una temperatura de combustión de 980 °C y de reducción de 640 °C; se empleó como material de referencia *LECO soil calibration sample for CNS*. El  $C_{Org}$  se determinó destruyendo previamente los carbonatos con HCl 5N y siendo luego el proceso estándar de determinación de C elemental previamente descrito (Laboratorio de Edafología Ambiental, Instituto de Geología, UNAM) (Schumacher 2002).

#### **8.5. Extracción de ADN, amplificación de fragmentos 16S ARNr y secuenciación**

Se extrajo ADN metagenómico (ADNmg) a partir de 0.25 gramos de cada muestra de sedimento usando el kit de DNeasy PowerSoil (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó mediante fluorimetría empleando el equipo Qubit Fluorometer 3.0 (Invitrogen) y el ensayo de alta sensibilidad Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Para estudiar la diversidad 16S ARNr, se emplearon los protocolos descritos por el *Earth Microbiome Project* empleando los oligonucleótidos iniciadores 515F (5'- GTG CCA GCM GCC GCG GTAA -3') y 806R (5'- GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT -3'). La amplificación se realizó en 25  $\mu$ l de mezcla que incluyó 3  $\mu$ l de ADNmg diluido en una proporción 1:5 (2-20 ng ADN), 2.5  $\mu$ l 1X Takara Ex Taq PCR buffer, 0.5  $\mu$ l Takara dNTPs (200  $\mu$ M), 0.75  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 0.5  $\mu$ l del primer 515F y 1  $\mu$ l de 806R a 10  $\mu$ M y 0.125  $\mu$ l de Takara Ex DNA Taq polimerasa (1U). El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial 95 °C por 3 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 52 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s; y un tiempo final de extensión a 72 °C por 12 min. Después se verificó la presencia de amplicones (~350 pb) mediante electroforesis



en gel de agarosa al 1% empleando para la tinción SYBR Safe 1X (Invitrogen), en amortiguador TAE (tris-acetato-EDTA) al 1X; la migración se efectuó a 80 V por 20 min.

De cada muestra se realizaron amplificaciones por triplicado, que posteriormente se juntaron (~70 µl) y purificaron, para enviar a secuenciar de forma masiva mediante la plataforma Illumina MiSeq del *Yale Center for Genome Analysis* de la Universidad de Yale, Estados Unidos.

### **8.6. Análisis de las secuencias y diversidad 16S ARNr**

Las secuencias de 16S ARNr obtenidas fueron filtradas y demultiplexadas usando QIIME2 (<https://qiime2.org>). Las secuencias se unieron y filtraron con DADA2 (Callahan et al. 2016). Las secuencias que no pasaron el filtro de calidad se descartaron, y las filtradas se asignaron taxonómicamente usando la base de datos de GreenGenes (<http://greengenes.secondgenome.com>). Luego de realizarse la afiliación taxonómica; se obtuvieron tablas de abundancia a diferentes niveles taxonómicos (dominio, filo, clase, orden, género y especie), que fueron transformadas a abundancia relativa para posteriores análisis. Para los estudios de rarefacción y diversidad se realizó un corte a 7000 secuencias.

La diversidad alfa se calculó con los índices de Chao1, Simpson y Shannon empleando la librería 'phyloseq' (<https://joey711.github.io/phyloseq/>) en la plataforma R (R Development CoreTeam 2018).

### **8.7. Predicción *in silico* de las capacidades metabólicas de la comunidad 16S ARNr encontradas**

Para saber si las comunidades microbianas encontradas tenían una capacidad potencial de degradación de contaminantes, se hizo una predicción *in silico* de los metabolismos de la comunidad 16S ARNr encontrada. Para ello, se empleó el paquete Tax4Fun en R para hacer predicciones funcionales considerando su taxonomía y las abundancias de los ASVs encontrados (Aßhauer et al. 2015). Este programa implementa la aproximación de MoP-Pro usada para secuenciación tipo "shortcut" (Aßhauer y Meinicke 2013). El perfil taxonómico del metagenoma está

vinculado a un conjunto de perfiles de referencia metabólicos precalculados. El perfil taxonómico se computa a través de Taxy-Pro (Klingenberg et al. 2013) y perfiles metabólicos de la base de datos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) (Kanehisa y Goto 2000; Kanehisa et al. 2014).

### 8.8. Amplificación por PCR de los genes involucrados en la degradación de contaminantes

Para la detección de genes involucrados en la degradación de contaminantes se utilizaron los primers que delimitan regiones para los genes *alkB*, *nahA*, *phe*, *molA*, *linA*, *tfdA*, *atzA* y *trzN* (Tablas 1 y 2). Las reacciones de PCR se realizaron en 25 µl de mezcla: 2 µl de ADN (4-50ng), 2.5 µl PCR buffer 10X Takara, 0.5 µl de dNTPs mix a 200 µM, 1.25 µl MgCl<sub>2</sub> a 30 mM, 1 µl de cada primer a 10 mM y 0.2 µl de Takara Ex DNA Taq polimerasa (1U); siguiendo el protocolo de amplificación descrito en la Tabla 2 para cada primer.

Tabla 2. *Primers* empleados y condiciones utilizadas para los ensayos de PCR

Primers	Procedimiento			Referencia
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización Alineamiento y Extensión	Extensión final	
<i>alkBFd</i>	5 min a 95 °C	15 s a 95 °C	10 min a 72 °C	(Powell et al. 2006; Wu et al. 2013)
<i>alkBRd</i>		15 s a 62 °C 30 s a 72 °C		
<i>nahAc-7</i>	5 min a 95°C	20 s a 94 °C	10 min a 72 °C.	(ParkyCrowley 2006)
<i>nahAc-R</i>		20 s a 55 °C 30s a 72 °C		
<i>phe-F</i>	5 min a 95 °C	1 min a 95 °C	7 min a 72 °C	(Baek et al. 2014)
<i>phe-R</i>		1 min a 55 °C 1 min a 72 °C		
<i>molA-F94</i>	5 min a 94 °C	0.5 min a 94 °C	20 min a 72 °C	(McCarthy et al. 2018; Lopes et al. 2013)
<i>molA-R1122</i>		0.5 min a 55 °C 1.75 min a 72 °C		
<i>linA-f</i>	5 min a 96 °C	1 min a 96 °C	10 min a 72 °C	(Sharma et al. 2014)
<i>linA-r</i>		1 min a 55 °C 2 min a 72 °C		
<i>tfdAf</i>	6 min a 95°C	45 s a 94°C	10 min a 72 °C	(Bælum et al. 2006)
<i>tfdA**F</i>		30 s a 60 °C 2 min a 72°C		
<i>trzNf</i>	3 min a 94°C	1 min a 94 °C	5 min a 72 °C	

Tabla 2. *Primers* empleados y condiciones utilizadas para los ensayos de PCR

Primers	Procedimiento			Referencia
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización Alineamiento y Extensión	Extensión final	
trzNr		1 min a 55 °C 2 min a 72 °C		(Mulbry et al. 2002)
atzAf	3 min a 94°C	45 s a 94 °C	5 min a 72 °C	(Shapir et al. 2000)
atzAr		30 s a 60 °C 2 min a 72 °C		

Todos los genes fueron verificados mediante electroforesis en geles de agarosa (1%) con SYBR Safe 1X (Invitrogen), en amortiguador TAE (tris-acetato-EDTA) al 1X; la migración se efectuó a 80 V por 20 min. Las bandas visibles y del tamaño esperado fueron consideradas como un resultado positivo de amplificación y detección.

### 8.9. Análisis estadísticos

Se realizaron análisis estadísticos para comparar la diversidad de Bacterias y Arqueas; empleando las tablas de abundancia relativa obtenidas a diferentes niveles de asignación taxonómica (fila, clase, orden, familia y género). Los análisis se realizaron en la plataforma R (R Development Core Team 2018) bajo el ambiente integrado RStudio (versión 1.1.463). También se realizaron análisis de validación estadística mediante PERMANOVA (Análisis de varianza multivariado con permutaciones), empleando la función Adonis del paquete R-vegan.

## **9. Resultados**

### **9.1. Genes de degradación de contaminantes como marcadores moleculares**

En este trabajo se evaluó el empleo de genes como biomarcadores para identificar problemas de contaminación en las zonas costeras. Un biomarcador es una respuesta biológica medida con precisión y confianza para proporcionar información que puede estar relacionada con la exposición a un agente ambiental (Rendón et al. 2006). Se ha sugerido que existe una conexión entre los genes de degradación de xenobióticos y las tasas de biodegradación de xenobióticos; por lo tanto, estos genes funcionales podrían usarse como indicadores de la presencia de xenobióticos y sus metabolitos (Su et al. 2018). Su uso en el diagnóstico de la alteración de los ecosistemas y la exposición a xenobióticos tiene varias ventajas como: i) la respuesta de los biomarcadores puede indicar la presencia de contaminantes biológicamente disponibles, ii) con un conjunto o batería de biomarcadores adecuados se puede dilucidar la presencia de contaminantes que no habían sido considerados, y iii) los biomarcadores pueden detectar eventos de contaminación intermitente e integrar en tiempo y espacio la exposición (Vázquez et al. 2005).

Técnicas como la PCR en tiempo real se ha utilizado para cuantificar los genes degradadores de diversos contaminantes. Existen autores (p.e., Baldwin et al. 2003; Powell et al. 2006) que han relacionado estos genes con la presencia o no de los contaminantes; y han desarrollado conjuntos de *primers* para indicar su capacidad de degradación (Nolan 2013). Por lo que la presencia de genes funcionales indica el potencial metabólico para una función biológica particular relacionada con la biodegradación de compuestos (Baek et al. 2014). Los conjuntos de *primers* y los métodos de PCR se utilizan para evaluar la atenuación natural, investigar la ecología de los sitios contaminados y ayudar en la optimización de la biorremediación en el campo (Baldwin et al. 2003).

#### **9.1.1. Genes *alkB* y *nahA***

Entre las muchas enzimas diferentes que están involucradas en la degradación de los HAP, las dioxigenasas iniciales que permiten a las bacterias aeróbicas atacar

las estructuras del anillo aromático son enzimas clave que sirven como marcadores útiles para la actividad de degradación (Park y Crowley 2006; Liu et al. 2017). El gen alcano monooxigenasa (*alkB*) y naftaleno dioxigenasa (*nah*) son los genes predominantes correspondiente a las hidroxilasas de la primera etapa involucradas en el metabolismo de los alcanos e hidrocarburos aromáticos respectivamente (Rojo 2009; Xu et al. 2013; Ellatif Hesham et al. 2014; Fuentes et al. 2014; Liu et al. 2015).

Baldwin et al. (2003) desarrolló y utilizó con éxito conjuntos de *primers* y protocolos para la cuantificación de numerosos genes de la oxigenasa aromática bacteriana por qPCR y Powell et al. (2006) para la cuantificación de los genes de alcano monooxigenasa (*alkB*) bacteriana. Ambos encontraron una correlación positiva con la concentración de alcano en muestras ambientales (Nolan 2013). Los genes implicados en la degradación de hidrocarburos han sido utilizados con éxito como biomarcadores para la caracterización de la magnitud de la contaminación de los suelos por hidrocarburos (Baldwin et al. 2003; Park y Crowley 2006; Singh et al. 2012; Liu et al. 2015; Tribelli et al. 2018).

### **9.1.2. Gen *phe***

El fenol se forma ampliamente como un sustrato primario para la degradación de varios compuestos clorados en biorreactores y estudios de campo. La presencia y abundancia de los genes fenol hidroxilasa (*phe*) ha servido para determinar el potencial de degradación de fenoles a lo largo del tiempo (Baek et al. 2014).

Baek et al. (2014) empleó este gen -utilizando el conjunto de *primers* phe-F y phe-R diseñado por Baldwin (2003)-, para evaluar el potencial de degradación del compuesto 1,2-dibromoetano, también conocido como dibromuro de etileno, que en el pasado se utilizó en la agricultura como insecticida, pesticida y como fumigante antifúngico para varios cultivos. Aunque en 1983 se prohibió su uso agrícola. Además, el gen *phe* ha sido utilizado como biomarcadores para caracterizar la capacidad de biorremediación de las comunidades degradadoras de hidrocarburos, ya que puede mineralizar los intermedios en la degradación de los hidrocarburos monoaromáticos (Liu et al. 2017).

### 9.1.3. Gen *tfdA*

Los herbicidas de ácido fenoxi- han sido ampliamente utilizados para fines agrícolas en todo el mundo desde su desarrollo en la década de 1940 (Huang et al. 2017). La degradación de estos herbicidas como el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA) y compuestos relacionados, se ha estudiado intensivamente durante los últimos 40 años. Estos estudios han revelado un conocimiento detallado sobre la cinética de degradación y mineralización, las vías catabólicas, los genes y sistemas enzimáticos involucrados en la degradación.

En todos los casos, el primer paso en la ruta de degradación es iniciado por una dioxigenasa dependiente de cetoglutarato, codificada por el gen *tfdA* (Mulbry y Kearney 1991; Shapir et al. 2000; Coleman 2015). Otras etapas de degradación son iniciadas y reguladas por los productos génicos de los genes *tfdB* y *tfdCDEF*; por lo que se recomienda el estudio de estos genes para identificar los procesos asociados a la degradación de estos herbicidas (Bælum et al. 2006; Coleman 2015) y su presencia en las muestras a analizar.

### 9.1.4. Genes *trzN* y *atzA*

La familia de herbicidas s-triazina se ha utilizado en una variedad de programas de control de malezas (Mulbry et al. 2002; Huang et al. 2017), la atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) es uno de los herbicidas más utilizados (Shapir et al. 2000; Mulbry et al. 2002). Muchos de los genes involucrados en la ruta de degradación de este compuesto se han detectado en suelos agrícolas sólo cuando estos suelos se han expuesto previamente a los herbicidas s-triazina (Bellini et al. 2014). El catabolismo de la atrazina comienza con la dechloración por las enzimas *atzA* o *trzN* (Mulbry et al. 2002; Bellini et al. 2014) y luego otras dos hidrolasas (*atzB*, *atzC*) actúan para producir ácido cianúrico, que se descompone mediante *atzD*, *atzE* y *atzF* para producir urea (Coleman 2015).

### 9.1.5. Gen *linA*

El hexaclorociclohexano (HCH) es un contaminante orgánico persistente que se ha utilizado ampliamente como insecticida en muchos países. El isómero gamma del

HCH (lindano) se utilizó ampliamente como insecticida, y todos los caracterizados hasta la fecha utilizan dos dehalogenasas: la deshidrocinasa *linA* y la deshalogenasa hidrolítica *linB* juntas median los primeros cuatro pasos de esta vía. Los genes *linA* y *linB* están altamente conservados y asociados de forma única con la ruta de biodegradación del HCH (Sharma et al. 2014; Coleman 2015).

#### **9.1.6. Gen *molA***

La contaminación ambiental con molinato es una preocupación debido a que el herbicida y algunos de sus productos de degradación tienen efectos adversos en humanos y animales (Lopes et al. 2013). El molinato está considerado como uno de los tiocarbamatos más recalcitrantes, se informa de la biodegradación en los suelos por microorganismos aeróbicos y se explica en parte por la actividad de la hidrolasa de molinato (*molA*).

### **9.2. Caracterización fisicoquímica del ambiente acuático circundante y de los sedimentos muestreados**

Se describen las características fisicoquímicas (Tabla 3) del ambiente acuático aledaño a los sedimentos (pH, conductividad eléctrica (CE), oxígeno disuelto OD) y temperatura); así como el contenido de C y N en los sedimentos (Cino, Corg y N-tot). Para observar los patrones de agrupamiento de las muestras acorde a estos parámetros, se hizo un análisis de componentes principales (PCA, Fig. 5). El análisis mostró que todas las muestras se separaban en dos grandes grupos, no por cabecera estuarina, sino por temporada, esto es, en nortes y secas independientemente del sitio de colecta. Las tres principales variables que formaron estos grupos fueron: la conductividad eléctrica, la temperatura y el oxígeno disuelto.

Tabla 3. Promedio de la temperatura, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto y pH del agua circundante a los sedimentos en estudio, así como su concentración de C y N en los mismos.

Muestra	Agua circundante				Sedimentos		
	Temperatura (°C)	CE (mS/cm <sup>2</sup> )*	OD* (mg/L)	pH	Corg	Cino	Ntotal
PAN	25.0	1.3	3.3	7.4	1.7	1.7	0.2
PAS	30.6	17.5	4.27	7.4	1.4	2.1	0.2
PEN	25.3	0.5	1.3	7.4	2.3	1.6	0.4
PES	30.5	13.6	2.5	6.7	2.6	1.9	0.4

\*CE: Conductividad eléctrica; OD: Oxígeno disuelto; PAN: Pom-Atasta en Nortes; PAS: Pom-Atasta en Secas; PEN: Palizada Del Este en Nortes; PES: Palizada Del Este en Secas

En general se observó que el agua circundante a los sedimentos mostró mayor conductividad eléctrica en la temporada de secas (Pom-Atasta (PA)=17.49±17.2 mS/m<sup>2</sup>; Palizada-Del Este (PE)=13.59±19.4 mS/m<sup>2</sup>) que en nortes (PA=1.30±1.1 mS/m<sup>2</sup>; PE=0.49±0.1 mS/m<sup>2</sup>), debido al arribo de agua dulce por los ríos de descarga después de las lluvias. Sin embargo, también se notó que cada cabecera tuvo un gradiente de mayor a menor conductividad eléctrica de este a oeste. Como era de esperarse, la mayor CE de las cabeceras estuarinas se reportó en los puntos de mayor intercambio con la Laguna, es decir, en las bocas con sistema mesohalino. Por ejemplo, para PA en la temporada de secas, el sistema mesohalino fue visible en los subsitios Pa.1, Pa.2, Pa.3, Pa.4 y Pa.5, con una conductividad de ~21 a 41 mS/m<sup>2</sup>. Mientras que los puntos más al oeste (Pa.6-Pa.10) mostraron valores de 0.9 a 4.7 mS/m<sup>2</sup>. Para PE, los puntos Pe.1, Pe.2 y Pe.3 fueron los de mayor conductividad (28-53 mS/m<sup>2</sup>) durante la temporada de secas, lo que muestra una menor intrusión del sistema salino de la Laguna hacia la cabecera. Asimismo, el análisis estadístico confirmó que, en efecto, existe una diferencia significativa en la conductividad eléctrica por la temporada de muestreo ( $p$ -valor = 0.015) y por las cabeceras estuarinas de estudio ( $p$ -valor = 0.004), siendo PA aquella con mayor conductividad eléctrica promedio.



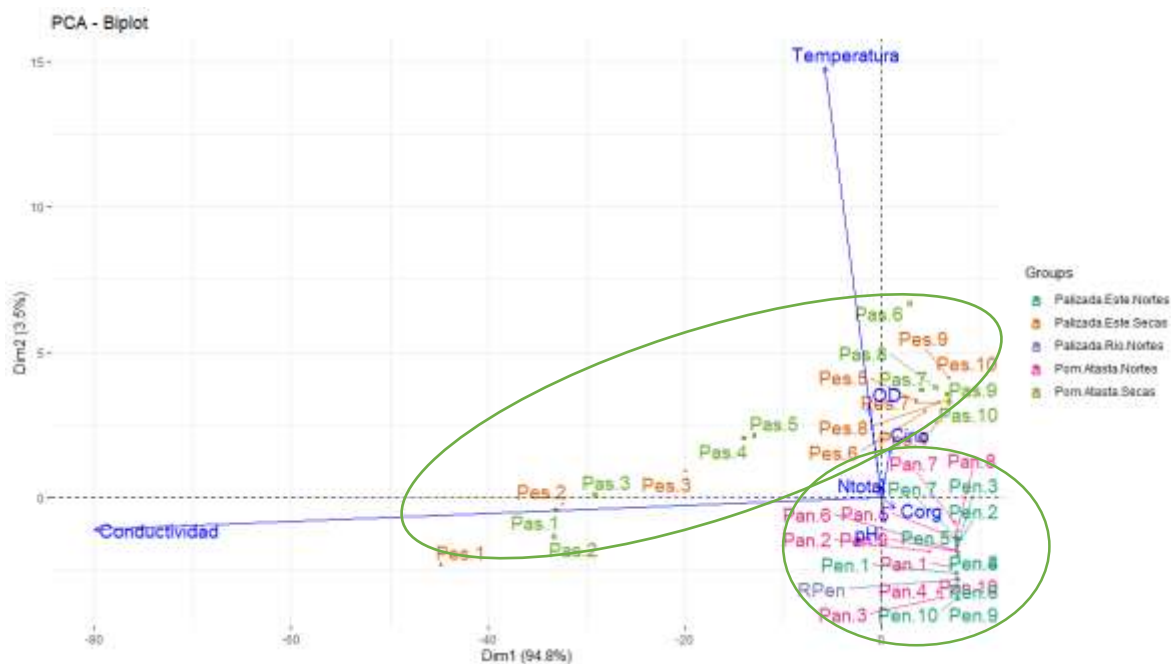


Figura 5. Análisis de componentes principales de los parámetros físico-químicos reportados para ambos sistemas estuarinos.

Tabla 4. Resultados de PERMANOVA para los parámetro físico-químicos

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
OD	1	0.3237	0.32369	3.4881	0.0821	0.009
Temperatura	1	0.0486	0.048596	0.48667	0.01233	0.808
Conductividad	1	0.1891	0.189062	1.9643	0.04795	0.080
pH	1	0.0748	0.074794	0.75411	0.01897	0.544
CIno	1	0.2308	0.230767	2.4245	0.05853	0.052
Corg	1	0.0507	0.050713	0.50815	0.01286	0.784
Ntotal	1	0.2302	0.230201	2.4182	0.05838	0.051

La temperatura ( $p$ -valor  $> 0.05$ ) fue mayor y similar entre las cabeceras estuarinas: (PA=30.5±1.3 °C; PE=30.5±0.7 °C) en la temporada de secas y (PA=25.0±0.8 °C; PE=25.3±0.9 °C) en temporadas de nortes. El oxígeno disuelto (OD) resultó significativo para la distribución de la comunidad microbiana ( $p$ -valor = 0.13) y mostró correlación con la temperatura; contrariamente a lo que se esperaba, *i.e.*, de que a mayor temperatura en la columna de agua existiera menor concentración de oxígeno disuelto por la ley de solubilidad de gases; se observó un incremento en la concentración del OD en la temporada de secas (PA-secas: 4.2±0.4 mg/l; PA-

nortes:  $3.3 \pm 0.4$  mg/l) (PE-secas:  $2.5 \pm 0.5$  mg/l; PE-nortes:  $1.3 \pm 0.4$  mg/l). Este fenómeno se puede asociar con un mayor aporte de oxígeno disuelto por parte de los procesos de fotosíntesis oxigénica por fitoplacton, pastos marinos y algas, que puede ser estimulando en temporada de secas, donde la temperatura estimula algunos *blooms* fotosintéticos, y se han reportado previamente picos de clorofila *a* ( $80 \text{ mg/m}^3$ ) asociados a florecimientos fitoplactónicos en Pom-Atasta (Barreiro y Aguirre 1999).

Algunos parámetros no mostraron influencia en el agrupamiento de las muestras, como el pH, el nitrógeno total o el carbono (orgánico e inorgánico). El pH tuvo un carácter circumneutral en todas las muestras independientemente del sitio y temporada de muestreo ( $7.24 \pm 0.6$ ). Igualmente, el carbono orgánico e inorgánico, así como el nitrógeno total no mostraron gran efecto en esta separación, los cuales muestran valores similares para todas las muestras (Anexo C).

### **9.3. Análisis del componente 16S ARNr**

#### **9.3.1. Extracción de ADNmg**

Se extrajeron 41 muestras de ADNmg de sedimentos en total: 20 muestras en Pom-Atasta (PA) y 20 en Palizada-Del Este (PE). Todas las muestras correspondieron a las dos temporadas de estudio: secas y nortes. También se tomó una muestra en el río Palizada (RPen) (Tabla 3). En todas las muestras extraídas se logró recuperar ADNmg en concentraciones adecuadas para su posterior amplificación por PCR; con un rendimiento promedio de  $20.73 \text{ ng}/\mu\text{L}$  para PA y de  $16.34 \text{ ng}/\mu\text{L}$  PE.

Tabla 5. ADNmg obtenido en las muestras

	Época de secas		Época de nortes	
	Muestra	ADN (ng/μL)	Muestra	ADN (ng/μL)
Pom-Atasta	Pas-1	28.2	Pan-1	47.5
	Pas-2	5.09	Pan-2	18.5
	Pas-3	13.1	Pan-3	4.07
	Pas-4	29.8	Pan-4	27.5
	Pas-5	5.61	Pan-5	31.8
	Pas-6	2.99	Pan-6	32.3
	Pas-7	9.72	Pan-7	30.2
	Pas-8	20.2	Pan-8	21.4
	Pas-9	12.4	Pan-9	17.8
	Pas-10	13.2	Pan-10	43.3
Palizada-Del Este	Pes-1	18.8	Pen-1	38.2
	Pes-2	27.7	Pen-2	35.8
	Pes-3	10.1	Pen-3	18.2
	Pes-4	15.7	Pen-4	6.25
	Pes-5	18.5	Pen-5	3.49
	Pes-6	27.9	Pen-6	12.2
	Pes-7	7.63	Pen-7	4.93
	Pes-8	7.39	Pen-8	37.6
	Pes-9	5.95	Pen-9	3.58
	Pes-10	14.1	Pen-10	12.7
			RPen	18.5

### 9.3.2. Secuencias 16S ARNr obtenidas y tamizaje bioinformático

Tras obtener el ADN se realizaron reacciones de PCR para obtener los fragmentos 16S ARNr que se verificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Anexo A). Una vez secuenciados, se obtuvieron un total de 2,043,561 secuencias 16S ARNr; las cuales, después del filtrado con DADA2, se redujeron a 1,621,593. Luego de eliminar quimeras y singletons se recuperaron 1,332,611 secuencias, lo cual representó una eficiencia de recuperación de ~65%.

Tabla 6. Número de secuencias 16S ARNr obtenidas de los sedimentos de los sistemas Pom-Atasta y Palizada-Del Este

Muestras	Secuencias iniciales	Secuencia identificadora Golay	Secuencias filtradas	Secuencias no químicas
<i>Pom-Atasta, temporada de nortes</i>				
Pan-1	40 521	TAGGATTGCTCG	31 127	24 825
Pan-2	55 821	TCGAGGACTGCA	47 783	38 154
Pan-3	46 572	TAGGAAGTGGCC	35 893	27 095
Pan-4	29 674	ATGAGACTCCAC	24 553	20 193
Pan-5	43 429	GACGGAACCCAT	36 502	31 506
Pan-6	69 514	CAGCTAGAACGC	53 216	46 609
Pan-7	80 369	AATCCGTACAGC	65 478	56 323
Pan-8	66 820	TGAGTCACTGGT	58 223	50 268
Pan-9	51 512	ATGTGCACGACT	43 853	38 094
Pan-10	68 367	CGGAGCTATGGT	56 876	47 692
<i>Pom-Atasta, temporada de secas</i>				
Pas-1	60 735	GGAGACAAGGGA	45 328	34 314
Pas-2	85 263	CCAGTGTATGCA	68 237	53 029
Pas-3	27 246	GCGATATATCGC	20 242	17 184
Pas-4	20 108	TCTAGCGTAGTG	15 385	11 398
Pas-5	32 986	AGCCTAAGCACG	20 974	16 855
Pas-6	32 931	TCTACGGAGAGC	22 406	18 859
Pas-7	35 635	CTCTACCTCTAC	27 010	22 364
Pas-8	69 489	AGGCATCTTACG	55 548	47 685
Pas-9	41 280	AATCAGTCTCGT	26 497	22 382
Pas-10	90 616	CCTCGTTGACT	72 546	62 627
<i>Palizada-Del Este, temporada de nortes</i>				
Pen-1	58 201	CCTGAACTAGTT	46 995	36 409
Pen-2	17 968	AGCTGGAAGTCC	7 506	7 050
Pen-3	56 347	TATCGTTGACCA	47 753	38 795
Pen-4	64 084	TACACGATCTAC	52 807	42 346
Pen-5	55 726	GACTTTCCTCG	46 453	39 561
Pen-6	33 241	TCCAAAGTGTTT	27 129	21 960
Pen-7	55 567	ATTCCTGTGAGT	48 023	41 219
Pen-8	48 448	GAGTGGTAGAGA	39 150	31 247
Pen-9	44 668	CTTCGGCAGAAT	36 511	27 614
Pen-10	41 583	CACGGTTGTGAG	30 750	23 529
Rpen	71 627	TACTGTGCGAT	58 638	47 102
<i>Palizada-Del Este, temporada de secas</i>				
Pes-1	44 125	CTAGCGAACATC	35 275	30 043
Pes-2	69 523	GAATCTTCGAGC	58 157	49 341
Pes-3	36 423	CAAGCATGCCTA	28 146	22 485

Muestras	Secuencias iniciales	Secuencia identificadora Golay	Secuencias filtradas	Secuencias no químicas
Pes-4	67 564	TCCCAGAACAAC	55 051	45 243
Pes-5	54 016	ACACCTGGTGAT	40 152	33 273
Pes-6	50 504	GACTTGGTATTC	42 530	34 868
Pes-7	29 118	ACGCGCAGATAC	23 363	18 395
Pes-8	25 595	AAGAGATGTCTGA	14 628	10 806
Pes-9	36 758	GACAGGAGATAG	26 609	22 155
Pes-10	33 587	ACACGTAAGCCT	28 290	21 714
Total	2 043 561		1 621 593	1 332 611

Las muestras tuvieron un promedio de aproximadamente 32,503 secuencias cada una, siendo la menor 7,050 (Pen-2) y la mayor 62,627 (Pas-10). Con ello, se observó que el número menor de corte para continuar con los estudios de diversidad fue de 7,000 secuencias.

### 9.3.3. Rarefacción y diversidad del 16S ARNr de Bacterias y Arqueas

Se realizó un análisis de rarefacción considerando el número mínimo de secuencias filtradas (7000). Las curvas de rarefacción a este corte mostraron que algunas muestras alcanzan el comportamiento asintótico. (Fig. 8). Sin embargo, también se notó que en otras muestras es necesario un esfuerzo más grande de muestreo. Para cada sitio/temporada se encontraron de ~400 a 1300 secuencias variantes de amplicón (o ASVs), con una gran variabilidad entre los sitios encontrados y sin comportamiento aparente.

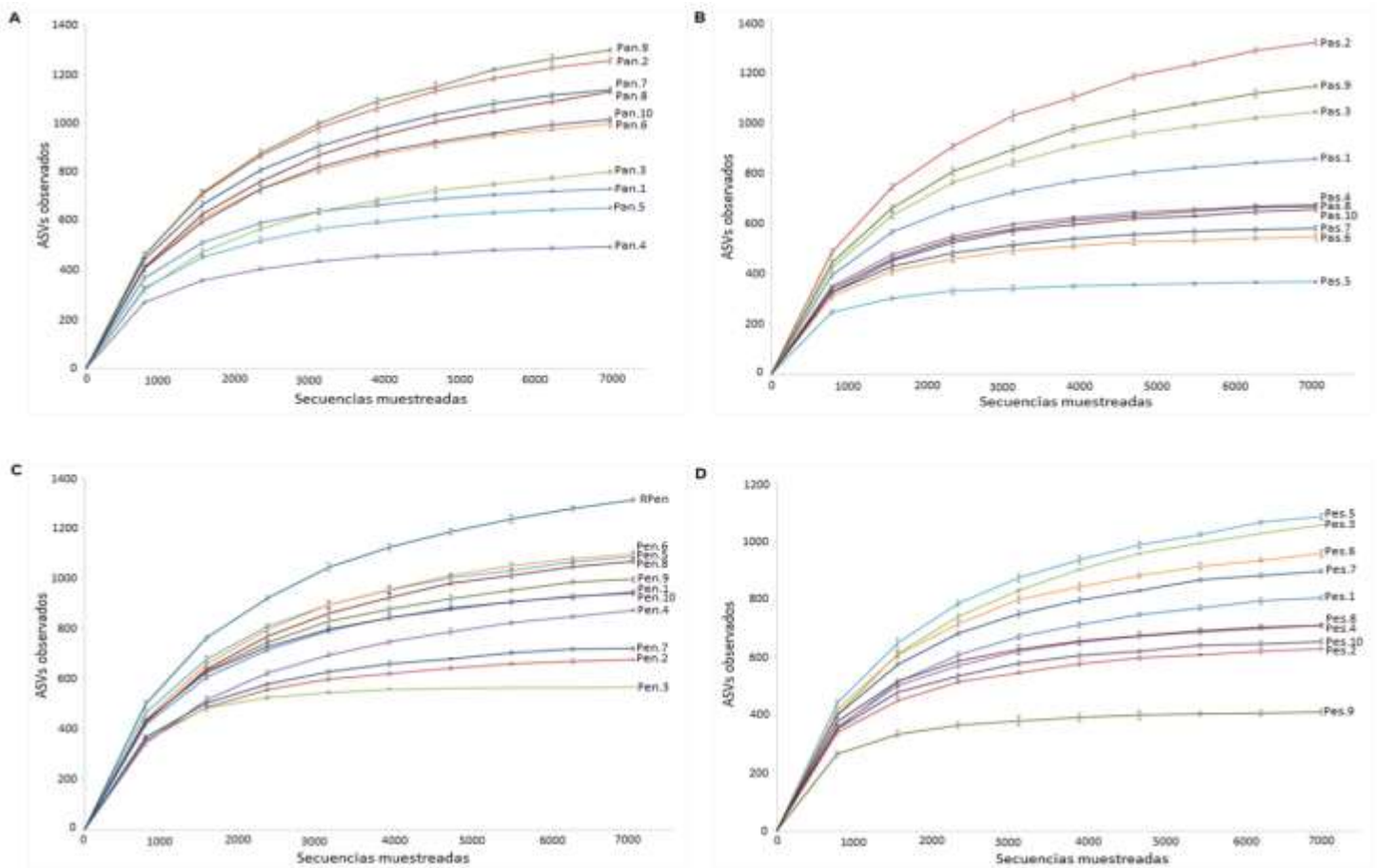


Figura 6. Curva de rarefacción de las muestras de sedimentos. A) Pom-Atasta temporada de nortes, B) Pom-Atasta temporada de secas, C) Palizada-Del Este temporada de nortes y D) Palizada-Del Este temporada de secas.

La diversidad alfa (diversidad y riqueza) de las comunidades bacterianas fue estimada con los índices de Shannon ( $H'$ ) y Simpson ( $1-D$ ) (Fig. 9). Los índices de diversidad alfa determinados fueron considerados como altos, esto es  $H' > 4$  y  $1-D > 0.97$ ; lo que sugiere una gran diversidad y riqueza de las comunidades microbianas presentes en las cabeceras estuarinas estudiadas. Paralelamente, a medida que el índice de Simpson se acerca a 1, el paisaje se aproxima a una uniformidad perfecta (Nagendra 2002), lo que sugiere que la comunidad estudiada tiene uniformidad en los ASVs encontrados. No se observaron diferencias o tendencias entre sitios o temporadas, lo que sugiere que hay similitud en la diversidad y riqueza de las comunidades de los sedimentos por sitio y temporada de muestreo.

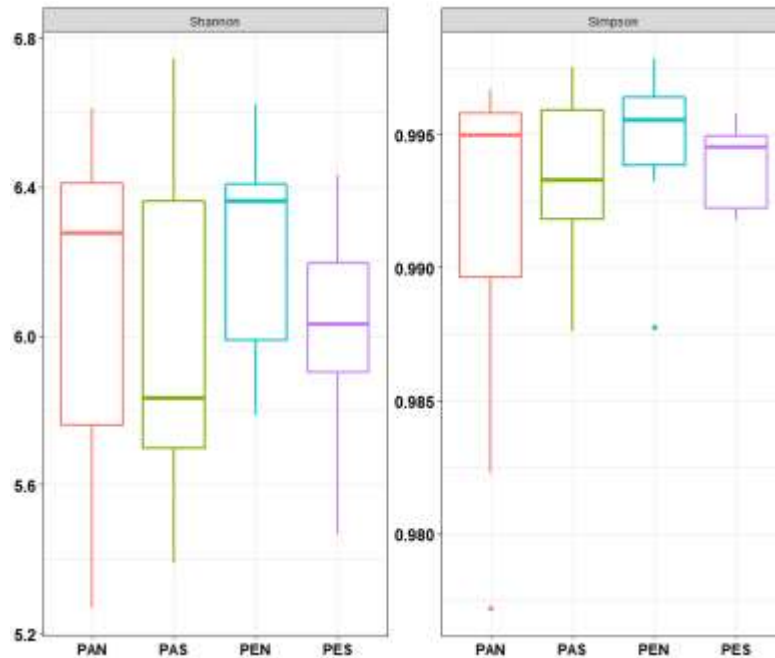


Figura 7. Índice de diversidad alfa de la comunidad 16S ARNr de los sedimentos de las cabeceras estuarinas de Pom-Atasta y Palizada-Del Este. PAN: Pom-Atasta\_Nortes, PAS: Pom-Atasta\_Secas, PEN: Palizada-Del Este\_Nortes y PES: Palizada-Del Este\_Secas

Se realizó un Análisis de Coordenadas Principales con distancia Unifrac (PCoA-Unifrac) con el objetivo de conocer cómo se distribuyen las muestras en un espacio euclidiano en función de la estructura de la comunidad microbiana presente. Esto es, considerando la presencia de los ASVs detectados en cada muestra, así como su distancia filogenética. También se consideró la abundancia de estos ASVs con un análisis ponderado. El análisis PCoA-Unifrac sugirió que existen diferentes comunidades en los sedimentos de Pom-Atasta con relación a Palizada-Del Este (Fig. 10), lo cual también se comprobó por un análisis estadístico de PERMANOVA ( $p$ -valor=0.011). En este último, no se notan diferencias entre las dos temporadas de estudio por sitio (● secas y ▲ nortes) ( $p$ -valor = 0.866).

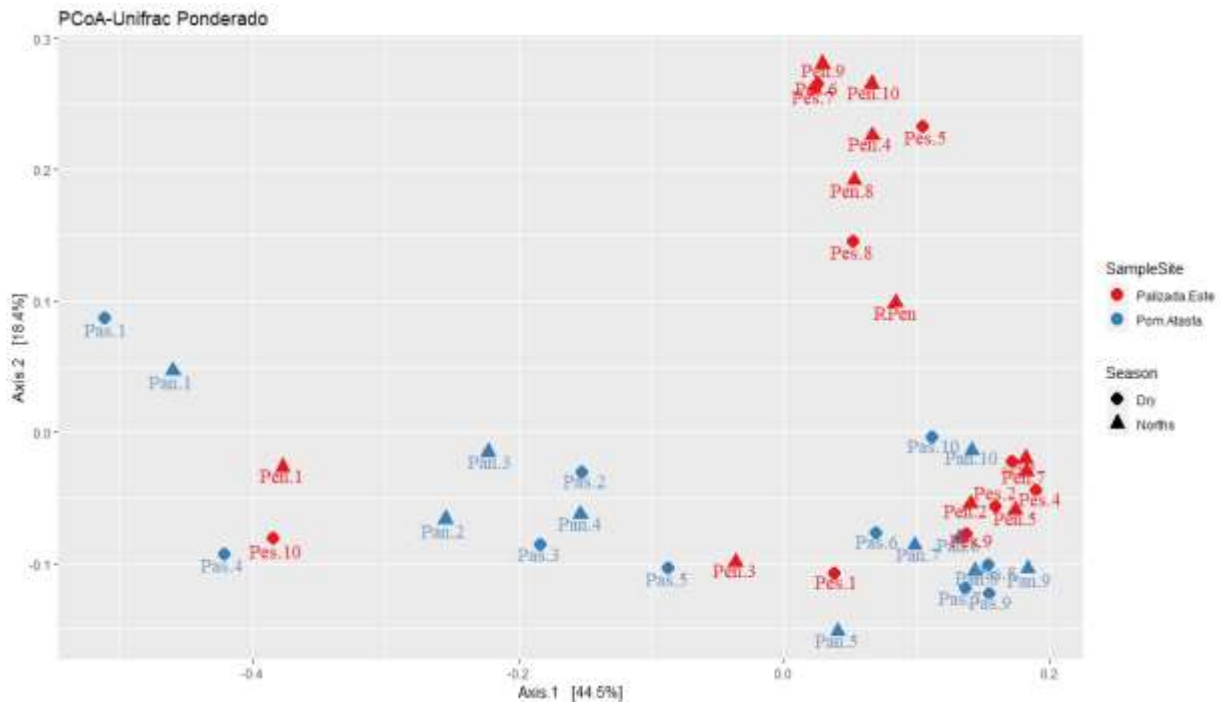


Figura 8. Análisis de componentes principales en distancia PCoA-Unifrac ponderado de las muestras de estudio.

### 9.3.4. Asignación taxonómica de las secuencias 16S ARNr encontradas

Las secuencias filtradas (1,332,611) fueron agrupadas en secuencias variantes de amplicón o ASVs, por su nombre en inglés de *Amplicon Sequence Variants*. De todas las muestras se obtuvieron un total de 19,101 ASVs, de los cuales la mayoría pudo ser clasificada a nivel dominio (99.8%). Contrariamente, a nivel especie sólo se detectó el 0.007% (Fig. 5), sugiriendo un gran número de secuencias de carácter ambiental y en clados aún no cultivados y reportados.

Paralelamente se detectaron algunas secuencias de eucariontes asociadas a las muestras, como 16S ARNr mitocondrial o de cloroplastos. El porcentaje de secuencias mitocondriales fue bajo (0.37%) (Tabla 5), que incluyó algunas amibas (*Acanthamoeba*) y diatomeas (*Thalassiosira*); mientras que la abundancia de cloroplastos fue mayor (8.36%), debido a la presencia de (micro) algas y plantas (Chlorophyta, Streptophyta), lo cual se espera en este tipo de sistemas.



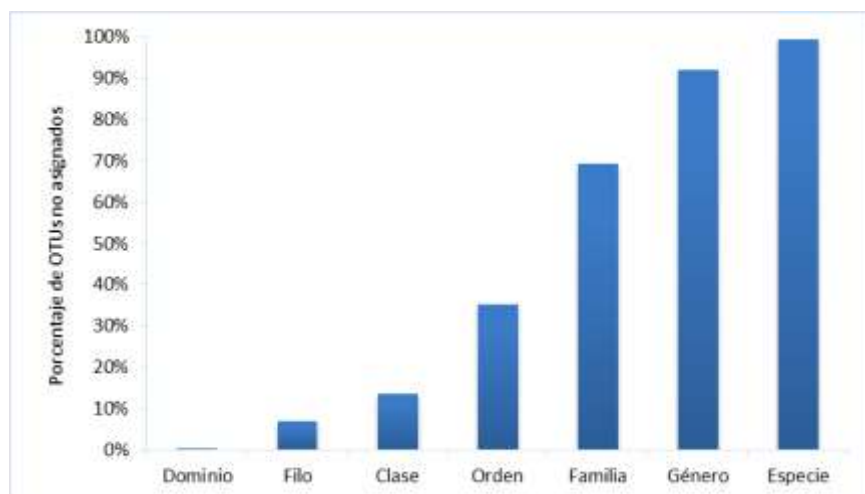


Figura 9. Porcentajes de ASVs no asignados a diferentes niveles taxonómicos empleando la base de datos GreenGenes.

Tabla 7. Porcentaje relativo de secuencias mitocondriales, de cloroplastos y no asignadas.

Sitios	Mitocondriales	Cloroplastos	Sitios	Mitocondriales	Cloroplastos
Pan.1	0.01	0.77	Pen.1	0.01	0.88
Pan.2	0.02	2.93	Pen.2	0.37	2.92
Pan.3	0.00	0.09	Pen.3	0.00	0.13
Pan.4	0.02	0.29	Pen.4	0.01	0.21
Pan.5	0.03	0.85	Pen.5	0.00	0.06
Pan.6	0.26	8.36	Pen.6	0.00	0.05
Pan.7	0.05	0.60	Pen.7	0.00	0.02
Pan.8	0.02	0.54	Pen.8	0.00	0.04
Pan.9	0.01	0.61	Pen.9	0.01	0.12
Pan.10	0.10	4.32	Pen.10	0.00	0.23
Pas.1	0.06	2.11	Pes.1	0.00	0.18
Pas.2	0.00	0.12	Pes.2	0.00	0.02
Pas.3	0.00	5.55	Pes.3	0.00	0.11
Pas.4	0.00	3.49	Pes.4	0.00	0.36
Pas.5	0.00	0.37	Pes.5	0.00	0.00
Pas.6	0.30	8.11	Pes.6	0.00	0.00
Pas.7	0.00	0.67	Pes.7	0.00	0.12
Pas.8	0.01	0.88	Pes.8	0.00	0.49
Pas.9	0.02	0.38	Pes.9	0.00	0.07
Pas.10	0.05	3.29	Pes.10	0.00	0.67
			RPen	0.03	2.10
Promedio	0.05	2.22		0.02	0.42

De los ASVs encontrados, se observó que a nivel dominio, en promedio, el 93.8% de las secuencias pertenecieron a Bacteria, y el 6.1% a Arqueas (Fig. 10).

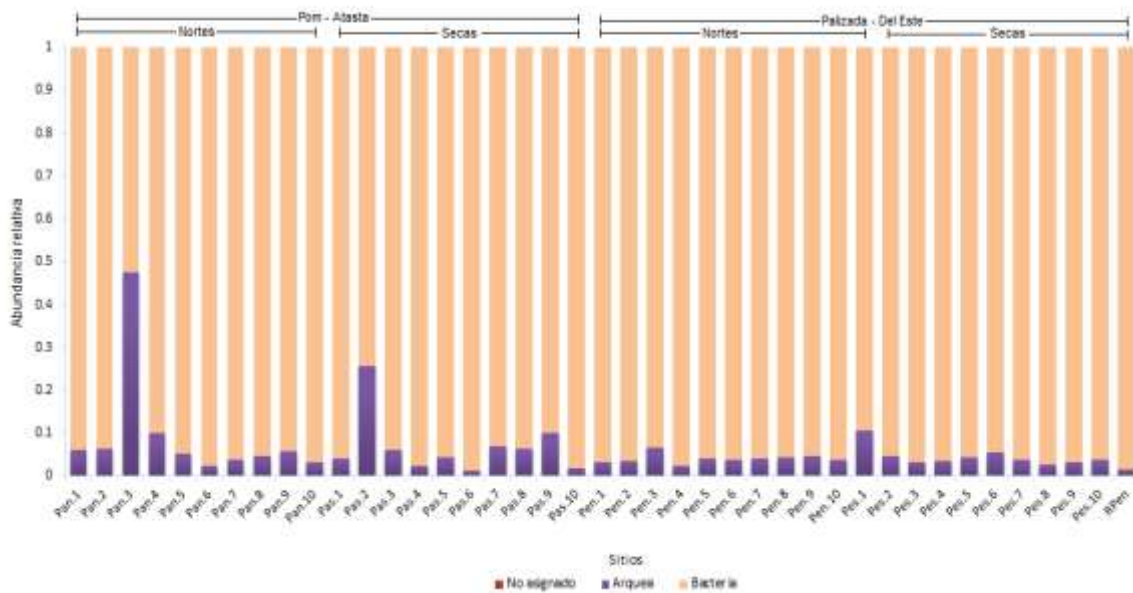


Figura 10. Asignación taxonómica a nivel dominio de las secuencias 16S ARNr generadas en este estudio.

En Archaea se detectaron los fila Crenarchaeota (4.87%), Euryarchaeota (0.81%) y Parvachaeota (0.41%), y se obtuvo un mayor porcentaje de arqueas en el sistema Pom-Atasta (2.05%) que en Palizada-del Este. Estas arqueas son comunes en sistemas sedimentarios y representan las mayores generadoras de metano por procesamiento anaerobio de la materia orgánica. Se ha llegado a sugerir que la inhibición de la producción de metano a través de la salinidad coincide con un tamaño reducido de la población metanogénica (Wen et al. 2017). En la temporada de Nortes, el aumento de la entrada de agua dulce a los sistemas crea condiciones favorables para el desarrollo de Arqueas metanogénicas. En la estación seca, la descarga de los ríos disminuye y aumenta la salinidad, y con ello disminuye la población de Arqueas. Sin embargo, aunque la mayor abundancia de arqueas se registró durante la temporada de Nortes, fue en el sistema Pom-Atasta y en los puntos de mayor conductividad (salinidad) en este estuario, donde se alcanzaron los valores máximos de arqueas (Pan 3 y Pas 2).

Del dominio Eubacteria, se encontraron los siguientes fila en todas las muestras con abundancias promedio de Proteobacteria (47.3%), Acidobacteria (9.2%), Chloroflexi (8.9%), Nitrospirae (5.4%), Planctomycetes (4.4%), Verrucomicrobia (2.5%), WS3 (2.2%), Bacteroidetes (1.9%), Cyanobacteria (1.6%), Gemmatimonadetes (1.6%), Actinobacteria (1.2%), GN04 (0.5%) y OP3 (0.4%) (Fig. 7). Gamma- y Deltaproteobacteria fueron las clases con mayor abundancia en ambos sitios, seguido de Chloroflexi para el sistema Pom-Atasta y Acidobacteria en Palizada-Del Este.

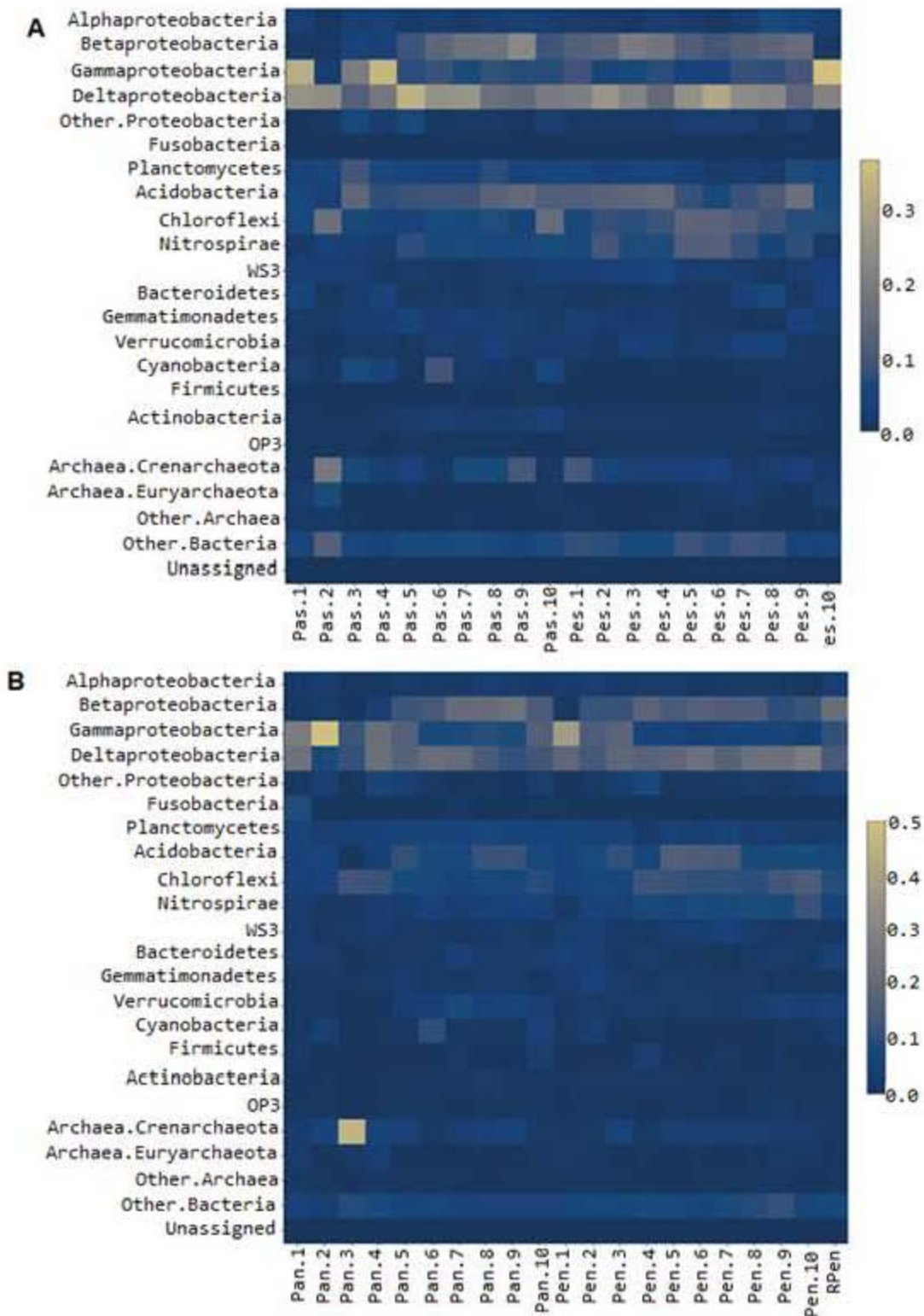


Figura 11. Abundancia relativa 16S ARNr a nivel phylum en los sedimentos de estudio en: A) época de secas y B) época de nortes. Pa: Pom-Atasta, Pe: Palizada-Del Este

## 9.4. Potencial genético bacteriano para la degradación de contaminantes

### 9.4.1. Predicción de metabolismos de degradación de contaminantes a partir de las secuencias 16S ARNr

Se realizó una predicción de los procesos metabólicos y de degradación que se podrían estar llevando cabo por los microorganismos de los sedimentos. Del análisis de Tax4Fun se seleccionaron los principales procesos vinculados al ciclo del C, S, N y la generación de metano como lo son el metabolismo del metano, del nitrógeno y el azufre, la fijación de carbono y la fotosíntesis. La predicción mostró que las abundancias de estos metabolismos en los diferentes sitios y temporadas fueron muy parecidos (Fig. 11), es decir tienen un potencial semejante para estos procesos. Siendo el metabolismo del metano, uno de los más importantes, como anteriormente fue sugerido por el número de arqueas encontradas.

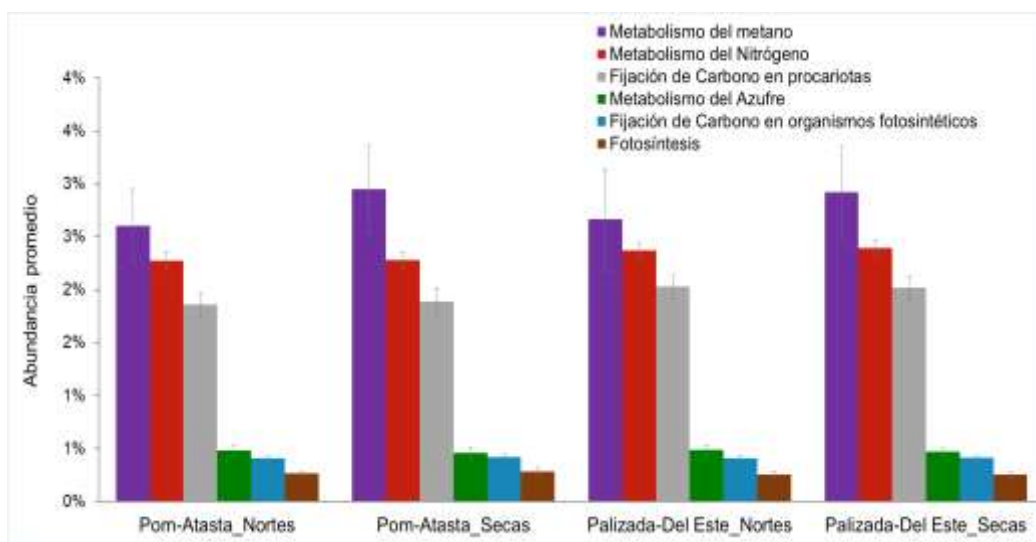


Figura 12. Análisis de Tax4Fun de las principales capacidades metabólicas en los ciclos del C, N y S de las comunidades microbianas presentes en los sedimentos estuarinos de estudio.

Para los metabolismos de degradación de contaminantes como nitrotolueno, PHAs, toluenos, naftalenos, cloroalquenos, atrazina y DDT, se obtuvieron resultados similares (Fig. 12). Se observó que existe una proporción similar de microorganismos degradadores independientemente del sitio o de la temporada muestreada. De lo anterior, es posible concluir que existe una amplia comunidad degradadora en estos sedimentos, con una mayor capacidad potencial de degradar

nitrotoluenos y compuestos policíclicos aromáticos PAHs. La capacidad de degradación de DDT y atrazina también se encontró.

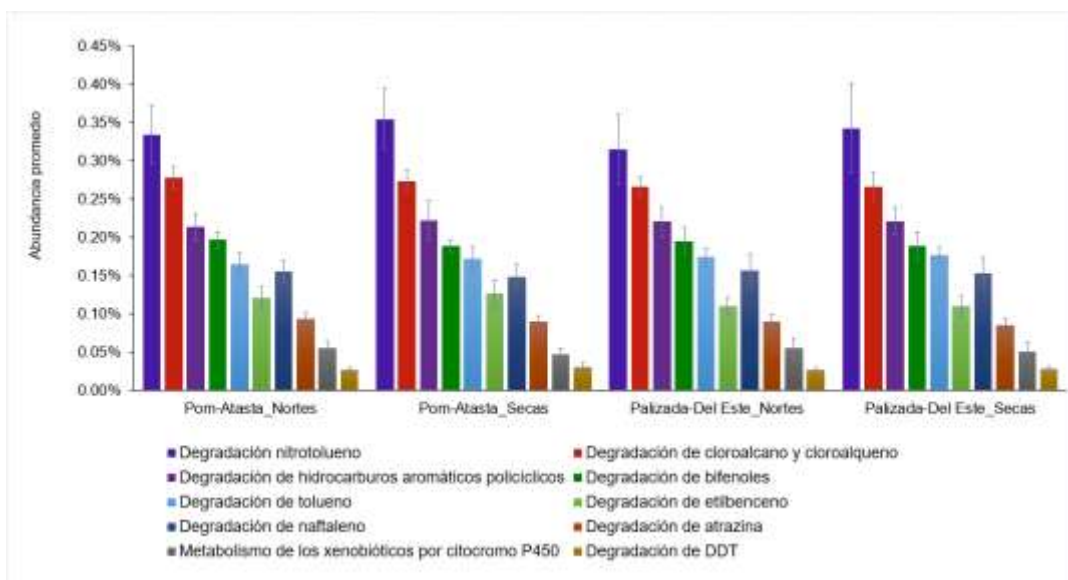


Figura 13. Análisis de Tax4Fun de los principales procesos de degradación de contaminantes presentes en los sistemas estuarinos de estudio.

#### 9.4.2. Detección de los genes implicados en la degradación de contaminantes

Una vez conformados los protocolos para la detección de los genes de degradación de contaminantes, se realizaron los ensayos en todas las muestras de sedimentos de ambas cabeceras para determinar su presencia o ausencia (Tabla 6). Donde los genes *tfdA*, *nahA*, *alkB* y *atzA* no fueron detectados en ninguna muestra.

Tabla 8. Resultados de electroforesis/PCR con geles de agarosa para los genes en estudio.

Resultados positivos (+) o negativos (-)

Muestras	<i>phe</i>	<i>linA</i>	<i>molA</i>	<i>trzN</i>	<i>atzA</i>	Muestras	<i>phe</i>	<i>linA</i>	<i>molA</i>	<i>trzN</i>	<i>atzA</i>
Pan.1	+	+	-	+	-	Pen.1	+	+	-	-	-
Pan.2	+	+	-	+	-	Pen.2	+	+	-	-	-
Pan.3	+	+	-	+	-	Pen.3	+	+	+	-	-
Pan.4	+	+	-	+	-	Pen.4	+	+	+	-	-
Pan.5	+	+	-	+	-	Pen.5	+	+	+	-	-
Pan.6	+	+	-	+	-	Pen.6	+	+	+	-	-
Pan.7	+	+	-	+	-	Pen.7	+	+	+	+	-
Pan.8	+	+	-	+	-	Pen.8	+	+	+	+	-
Pan.9	+	+	-	+	-	Pen.9	+	+	+	+	-
Pan.10	+	+	-	+	-	Pen.10	+	+	-	+	-

Muestras	<i>phe</i>	<i>linA</i>	<i>molA</i>	<i>trzN</i>	<i>atzA</i>	Muestras	<i>phe</i>	<i>linA</i>	<i>molA</i>	<i>trzN</i>	<i>atzA</i>
Pas.1	-	+	-	-	-	RPen	+	+	+	-	-
Pas.2	-	+	-	-	-	Pes.1	+	+	-	+	-
Pas.3	-	+	-	-	-	Pes.2	+	+	-	+	-
Pas.4	-	+	-	-	-	Pes.3	+	+	-	+	-
Pas.5	+	+	-	-	-	Pes.4	+	+	-	+	-
Pas.6	+	+	-	+	-	Pes.5	+	+	-	+	-
Pas.7	-	+	-	+	-	Pes.6	+	+	-	+	-
Pas.8	-	+	-	+	-	Pes.7	+	+	-	+	-
Pas.9	-	+	-	+	-	Pes.8	+	+	-	+	-
Pas.10	-	+	-	+	-	Pes.9	+	+	-	+	-
						Pes.10	+	+	-	+	-

Los genes *phe*, *linA*, *molA* y *trzN*, relacionados con la degradación de lindano, fenoles, molinato y atrazina mostraron señales positivas en diferentes muestras. En la muestra de sedimento del Río Palizada-Del Este, se obtuvieron presencia de amplicones para los genes *phe*, *molA*, *linA* y *trzN*; mientras que también se observaron en varias muestras de la cabecera estuarina Palizada-Del Este. El gen *phe* (fenoles), se detectó en todos los sedimentos de PE, tanto en nortes como en secas. Mientras que en Pom-Atasta, sólo se detectó este gen durante el muestreo en el período de nortes. Para el gen *linA* (lindano), se obtuvieron amplicones para todas las muestras y en todas las temporadas.

Para el gen *molA* (molinato), se obtuvieron algunos amplicones para Palizada-Del Este, principalmente durante la temporada de nortes. Para el sistema Pom-Atasta no se detectaron amplicones correspondientes al gen *molA*; contrario a lo ocurrido en algunos puntos durante la época de nortes en el sistema de Palizada-Del Este. En esta región es el cultivo la principal fuente de contaminantes, y, por tanto, el uso de molinato es mayor, de ahí se intuye la presencia de este gen.

También se observaron amplicones del gen *trzN*—uno de los genes que codifica la degradación de la atrazina y más fácilmente detectable en suelos contaminados con este pesticida— a la largo de todo el sistema de Pom-Atasta y durante la época de secas en el sistema Palizada-Del Este fundamentalmente. A diferencia de los resultados obtenidos para *trzN*, se obtuvo una respuesta negativa en todos los sedimentos para el gen *atzA*.

## **10. Discusión**

El sistema de la Laguna de Términos, pese a ser uno de los más representativos de México, ha sido poco estudiado en términos de microdiversidad, donde se han encontrado reportes de fitoplancton (Poot et al. 2015) y Actinobacterias cultivables (Rivera 2015) de la columna de agua. Por lo que este estudio representa un primer aporte a la descripción de la diversidad microbiana de este sistema.

El conjunto de resultados obtenidos en la investigación de esta tesis sugiere que las comunidades procariontes de los sedimentos de ambas cabeceras tienen alta diversidad y riqueza, donde la estructura de la comunidad 16S ARNr en PA es diferente de PE, pero ambas comunidades no sufren cambios drásticos durante la temporada de secas o nortes. Asimismo, las bacterias y arqueas presentes en estos sedimentos cuentan con el potencial para remover compuestos contaminantes; y además, cuentan con genes involucrados en la degradación de contaminantes, como fenoles, molinato, lindano y triazinas, principalmente en PE.

### **10.1. Estructura de la comunidad 16S ARNr**

Los estudios previos en sedimentos costeros sugieren que los parámetros ambientales como la temperatura, el oxígeno disuelto y la salinidad afectan la diversidad y abundancia de las especies bacterianas (Liu et al. 2015; Yu et al. 2017; Su et al. 2018). Sin embargo, los resultados de esta tesis apuntan a que la estructura de la comunidad 16S ARNr en los sedimentos se rige por la cabecera estuarina muestreada (i.e., Pom-Atasta y Palizada-Del Este), y no por la estación de muestreo (i.e., secas o nortes) donde se manifiestan los mayores cambios de temperatura, conductividad eléctrica y oxígeno disuelto encontrados en el sistema béntico. Aunque esto puede ser contra intuitivo, algo similar fue concluido por Poot et al. (2015), quienes en un estudio anual del fitoplancton en la boca mesohalina de Pom-Atasta, y no pudieron explicar la estructura de la comunidad fitoplanctónica con los parámetros ambientales evaluados, como temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto.

El hecho de que las comunidades bacterianas de los sedimentos de las cabeceras estuarinas de Palizada-Del Este y Pom-Atasta sean diferentes y no se



pueda correlacionar con un parámetro fisicoquímico estudiado, quiere decir que probablemente existen otros factores no considerados en este estudio que determinan esta distribución. Por ejemplo, se ha observado que los factores geofísicos como las mareas, también pueden tener un efecto en la diversidad bacteriana (Feng et al. 2009; Jiang et al. 2016). El sistema mesohalino de PA es más extenso que el de PE, especialmente durante la temporada de secas, debido a la estructura geomorfológica de sus bocas que contactan con la Laguna (Muciño et al. 2014). Durante las pleamares, el agua proveniente del Golfo de México ingresa a la cabecera estuarina Pom-Atasta y logra llegar hasta la laguna Atasta; pero este flujo es contrarrestado por la circulación dominante de agua dulce que fluye en sentido opuesto, especialmente en temporada de lluvias (Enciso 2000). Este fenómeno afecta en menor medida la región de Palizada-Del Este, ya que no está en intercambio directo de agua con la Laguna; pero se ha observado que, en estación de secas, la cuña salina puede llegar hasta la Laguna del Este (Fuentes et al. 2001).

Existen también otros factores que afectan la dinámica y las características propias de cada cabecera estuarina. La descarga de agua y aporte de sedimentos continentales provenientes de ríos y arroyos es diferencial para cada sistema. En Pom-Atasta, el aporte de sedimentos es considerable por los escurrimientos superficiales sin cauce definido que fluyen hacia las riberas norte y oeste; además, existe el remanente de un antiguo cauce fluvial correspondiente a un afluente del Río San Pedro San Pablo (Gutiérrez et al. 1982). Mientras que para el sistema Palizada-Del Este, el río Palizada es el principal aportador (Yáñez y Day 1982; Fuentes et al. 2001; Robadue et al. 2004; Rendón et al. 2006; Romo 2013). También los fuertes vientos, conocidos como 'Nortes', impactan la hidrodinámica del sistema; además de que causan la resuspensión de material sedimentario (Lizárraga et al. 1986). La vegetación de manglar también tiene un patrón diferencial (Villalobos et al. 1999; Villalobos y Mendoza 2010) en cada cabecera estuarina, con una mayor extensión de Pom-Atasta que en Palizada-Del Este (Fig. 4). Esta dificultad para explicar la estructura de la comunidad por un solo factor se ha observado en las comunidades microbianas de otros sedimentos (Feng et al. 2009; Guo et al. 2018),

donde no se puede encontrar un sólo factor determinante y todo se atribuye a la dinámica del sistema. Consecuentemente, consideramos que existen otros factores que afectan la distribución de comunidades bacterianas en cada cabecera estuarina que pueden incluir la geomorfología del lugar, la descarga fluvial, el nivel del mar, la precipitación pluvial, y los cambios en la dirección del viento.

Los sistemas estuarinos intermareales, como lo son PA y PE, suelen también tener una abundancia y diversidad bacteriana relativamente alta (Huang et al. 2019; Guo et al. 2018; Guo et al. 2019). Ejemplos los sistemas de Mandovi y Zuari, estuarios tropicales ubicados en el sudeste del mar Arábigo, donde se obtuvieron 47,030 secuencias de calidad (Khandeparker et al. 2017). El río Yangtze, en el mar de China Oriental, es un estuario afectado por los contaminantes de la escorrentía de los ríos urbanos y las descargas de aguas residuales; en este sitio se generaron 1,420,328 secuencias válidas de las muestras de sedimentos intermareales a lo largo del estuario (Guo et al. 2018). En otro estudio sobre la influencia antropogénica en este mismo sitio, Guo et al. (2019) obtuvo un total de 791,695 secuencias válidas en muestras de sedimentos.

Esta diversidad puede estar relacionada con la mayor disponibilidad de nutrientes de las fuentes continentales, el aporte de las diferentes comunidades bacterianas por los ríos que desembocan, el área específica de los sedimentos finos, entre otros (Khandeparker et al. 2017; Guo et al. 2018). Especialmente, los vientos de las temporadas de norte y el intercambio de agua marina y continental, los caracteriza como sistemas muy dinámicos. Este dinamismo hidrológico genera una heterogeneidad entre los sitios que propicia una gran diversidad microbiana (Muciño et al. 2014).

## **10.2. Capacidad genética de degradación de contaminantes**

Los análisis de predicción del potencial de degradación de contaminantes en los sedimentos de PA y PE, sugieren que la comunidad microbiana es capaz de degradar varios compuestos como haloalcanos, naftaleno, PAHs, DDT, atrazina, entre otros. Esta predicción está relacionada con la identidad filogenética de los microorganismos encontrados. Por ejemplo, el phylum más abundante en las

muestras de sedimentos analizadas fue Proteobacteria, lo que concuerda con otros estudios sobre las composiciones bacterianas en sedimentos estuarinos (Feng et al. 2009; Liu et al. 2015; Aylagas et al. 2017; Guo et al. 2018; Su et al. 2018; Zhang et al. 2018; Tong et al. 2019). Este superfilo es muy amplio e incluye a las clases Deltaproteobacteria y Gammaproteobacteria, que son también muy relevantes en sistemas estuarinos (Feng et al. 2009; Liu et al. 2015; Su et al. 2018), y se han reportado como degradadoras aerobias y anaerobias de contaminantes y xenobióticos. Por ejemplo, varias deltaproteobacterias están involucrados en el metabolismo anaerobio de los alcanos y otros hidrocarburos, e incluso están interconectados a la metanogénesis a través del transporte de electrones a nivel inter-especie (Roy et al. 2018). Asimismo, las bacterias que degradan la atrazina no constituyen un grupo específico y se distribuyen principalmente en diversos filos de Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria (Douglass et al. 2017), que constituyen los principales phyla encontrados en este estudio y en todos los sedimentos analizados.

En las últimas décadas se han reportado una serie de géneros y especies bacterianas capaces de degradar diferentes contaminantes. Por ejemplo, compuestos organoclorados y pesticidas como el endosulfán pueden ser degradados por bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium* y *Micrococcus* (Sharma et al. 2016; Parte et al. 2017). También se han descrito gran diversidad de microorganismos capaces de degradar plaguicidas de tipo N-metilcarbamatos, incluyendo *Novosphingobium*, *Paracoccus*, *Sphingobium*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Yan et al. 2007, Castellanos y Rache 2013). Mientras que las enzimas involucradas en la degradación aeróbica del lindano se han relacionado con el género *Microbacterium* (Sáez et al. 2012) y en el orden de los *Shingomonadales* (Sharma et al. 2016); el cual también es relacionado con la degradación de  $\beta$ - $\delta$ -HCH. Todos estos géneros y órdenes fueron encontrados en los sedimentos de los sistemas estuarinos aquí estudiados, de allí que la predicción del potencial genético de remoción sea considerable para todas las muestras.

Esta predicción fue comprobada cuando varios genes relacionados con la degradación de contaminantes como *linA*, *molA*, *trzN* y *phe* fueron amplificados y detectados como positivos en las muestras de sedimentos de ambas cabeceras estuarinas. Compuestos como el lindano, molinato, atrazina y derivados de PAHs han sido previamente reportados en el sistema de Laguna de Términos (Díaz et al. 2005; Carvalho et al. 2009). Contrariamente, otros compuestos contaminantes relacionados con los genes *alkB*, *nahA*, *tdfA* y *atzA* también han sido reportados en este sistema (Vázquez et al. 2005; Vidal et al. 2006; Villalobos y Mendoza 2010; Rosano et al. 2012; Hansen et al. 2013; Solano 2013; Vallarino y Rendón 2017); sin embargo, estos genes no pudieron ser detectados siguiendo los protocolos de PCR aquí empleados. Estos resultados de no amplificación pueden corresponder a que las copias genómicas ambientales están en muy bajo número, el protocolo de amplificación no fue el apropiado para estas muestras, existen procesos de inhibición de PCR por co-contaminantes de las muestras, o los oligonucleótidos iniciadores son muy específicos para los microorganismos ya aislados y no están diseñados para captar cepas ambientales (Chandler y Brockman 1996). Con esto, la hipótesis planteada para este proyecto se cumple parcialmente, donde los genes pueden llegar a ser indicadores de contaminación en sedimentos y además prueban que hay un potencial genético para su atenuación *in situ*.

La mayoría de los genes detectados fueron encontrados: i) durante la temporada de Nortes, y ii) en el sistema de Palizada-Del Este. Como antes se mencionó, los Nortes están asociados con las altas descargas de los ríos tributarios a ambas cabeceras estuarinas, además del arrastre, incorporación y resuspensión de sedimentos, más una alta dispersión atmosférica por los vientos de la temporada. Herbicidas tales como la atrazina y la dietilatrizina son los más utilizados en los cultivos agrícolas (Martínez 2003) y se ha observado la presencia de estos compuestos a 300 km de la fuente de origen, lo que demuestra que el viento puede transportar estos compuestos a grandes distancias.

El sistema Paliza-Del Este se relaciona con las descargas del río Palizada, especialmente en la Laguna Vapor, donde se encontraron varios genes asociados con la degradación de herbicidas y pesticidas. Vázquez et al. (1996) reportó que

este sistema es el principal punto de entrada de contaminantes, ya que recibe la mayor parte de las escorrentías de las granjas arroceras (Gold et al. 2010). Estas zonas arroceras consumen varios plaguicidas, especialmente los herbicidas propanilo, 2,4-D y molinato, que representan el 70% del total de los plaguicidas utilizados en las cuencas de drenaje de los sistemas fluvio-lagunares (Benítez y Bárcenas 1996). También, la formación de pastizales para la ganadería es probablemente la actividad responsable de la mayor pérdida de cubierta vegetal en el estado desde 1969. Los productores que se encuentran al margen del río Palizada han abierto arroyos que son utilizados para trasladarse a dichos cuerpos de agua o ir ganando terreno con los azolves en las crecientes (Villalobos y Mendoza 2010), incluyendo localidades aledañas como Rivera Gómez y Rivera Porvenir (Escamilla et al. 2014). Todas estas actividades antrópicas han afectado el área y consecuentemente se reportan contaminantes en la zona. Una perspectiva más para este estudio sería confirmar paralelamente la presencia de los contaminantes, así como de los genes de degradación, para saber que son indicadores factibles de contaminación.

En el presente estudio se consideraron los sedimentos de 0 a 30 cm; esto implicó que no se pudieron ver efectos claros de estratificación y distribución de las comunidades microbianas en un perfil de profundidad. Se ha reportado la tasa de acumulación de sedimentos en la región de Bécice en la franja de manglar, la cual varió de 1.2 a 2.8 mm/año; mientras que en la región de Celestún es de  $2.8 \pm 0.8$  mm/año (Carnero et al. 2018); ambas zonas aledañas a la Laguna de Términos. Encino (2000) reportó que en el sistema Pom-Atasta hay alta tasa de sedimentación con valor promedio de  $117.68 \text{ kg/m}^2/\text{año}$ , lo que equivale a 44.4 mm/año. Esto quiere decir que las muestras de la región de Atasta representan aproximadamente 7 años. Esto coincide con que desde 1995 ya se reportaban concentraciones de plaguicidas en los sedimentos y biota (ostiones, almejas, camarones) de la parte baja del Río Palizada; y de hidrocarburos en la Laguna de Pom (Gold et al. 2010). Sin embargo, hay que ser cautelosos en esta aproximación, ya que como antes se mencionaba, los aportes masivos de agua en temporada de lluvia, el efecto de los Nortes y huracanes, seguramente remueven continuamente estos sedimentos.

Finalmente, hay que considerar que la presencia de estos microorganismos en los sedimentos no nos habla de su origen, el cual no puede ser determinado por la estrategia aquí empleada. Los sistemas estuarinos son áreas de almacenamiento y transporte de microorganismos, por lo que no se puede definir una vía específica por la que llegan a los sedimentos. Muchos de estos microorganismos se encuentran y desarrollan *in situ*, es decir, forman parte propia de una microbiota nativa de los sedimentos. Otros microorganismos pueden provenir de sistemas externos a través del transporte fluvial, pudiéndose depositar desde la columna de agua, y eventualmente adaptarse y volverse parte de sistema. Asimismo, debido a las interacciones entre las corrientes y mareas se pueden arrastrar tanto del agua dulce proveniente de los ríos y arroyos como del agua marina que entra de la Laguna de Términos. Los humedales son de gran importancia debido a la gran diversidad de manglar presente, por lo que va a existir una comunidad característica de este tipo de ecosistema que también puede ser transportada y posteriormente depositada en los sedimentos. Se ha reportado que los humedales son de los sistemas más diversos que existen (Huang et al. 2017). Estas posibles vías contribuyen a la gran diversidad de la microbiota en ambos sitios, y que pueda haber una selección de las poblaciones tolerantes a la contaminación que ayuden a la atenuación de los contaminantes. Este estudio representa un avance en el conocimiento de las comunidades microbianas de las cabeceras estuarinas más importantes del sistema de Laguna de Términos, el cual también es uno de los más relevantes en México. Sin embargo, la interpretación de los datos generados debe estar contextualizado en el marco de las características intrínsecas de cada sistema para evaluar su comportamiento espacio-temporal y proponer métodos adecuados para su manejo.

## 11. Conclusiones

En el presente estudio se estudiaron los sedimentos superficiales (0-30 cm) de las cabeceras estuarinas de Pom-Atasta y Palizada-Del Este de la Laguna de Términos, (Campeche, México) para explorar su microdiversidad y su potencial genético para la degradación de contaminantes. De los resultados aquí obtenidos se concluye que ambos sistemas fluvio-lagunares (PE y PA) tiene una amplia diversidad y riqueza microbiana, donde las comunidades bacterianas de ambas cabeceras estuarinas son diferentes y no muestran cambios drásticos en la temporada de secas o nortes.

Asimismo, estas comunidades microbianas cuentan con el potencial genético para la transformación de contaminantes como fenoles (*phe*), lindano (*linA*), molinato (*molA*) y triazinas (*trzN*), lo cual está relacionado con los reportes bibliográficos de contaminación en estas cabeceras estuarinas. El mayor número de genes se detectó en el sistema PE durante la temporada de Nortes, esto asociado fundamentalmente al mayor aporte de sedimentos proveniente del río Palizada durante esta temporada.

Las predicciones metabólicas de las comunidades microbianas de ambos sistemas estuarinos muestran que, éstas son capaces de realizar funciones metabólicas similares implicadas en los ciclos biogeoquímicos del C, N y S; así como la degradación de compuestos derivados de hidrocarburos, la atrazina, los HCH, entre otros. Esto sugiere que la comunidad microbiana es capaz de transformar algunos de los contaminantes reportados en el sistema, ayudando entonces a la atenuación de dichos contaminantes.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que los genes pueden llegar a ser buenos indicadores de contaminación en sedimentos, como se ha planteado anteriormente; pero sería conveniente conocer con precisión los plaguicidas que actualmente se emplean en estas regiones para corroborarlos con los genes detectados y poder establecer este método como una posible vía de identificación de contaminantes.

Aunque necesitaríamos tener las medidas de contaminación reportadas para ambos sistemas estuarinos (PA y PE) y conocer más sobre el sitio para asociar el

desarrollo de los genes con historias de contaminación; se puede concluir que todos los marcadores propuestos se pueden considerar como biosensores de contaminación, bioindicadores indirectos que puedan dar una idea preliminar sobre el grado de contaminación de los sitios.



## **12. Alcances y perspectivas**

Este estudio representa uno de los primeros en explorar toda la diversidad microbiana procarionte en los sistemas Pom-Atasta y Palizada-Del Este (Laguna de Términos) y proporcionan nuevas perspectivas sobre la dinámica de las comunidades bacterianas dentro de los ecosistemas estuarinos en México. En estudios posteriores, sería importante tener en cuenta las características intrínsecas de cada cabecera estuarina para la identificación de las posibles variables que influyen en el comportamiento de cada una y proponer métodos adecuados para su manejo. Estos son sistemas muy diversos, por lo que se pudieran estudiar sus capacidades metabólicas para realizar procesos específicos como la metanogénesis, nitrificación, sulfatoreducción, entre otros. Es importante actualizar la información sobre el uso de plaguicidas en estas regiones y su metodología de empleo, para así identificar y corroborar la presencia de estos contaminantes con la de los genes de degradación, para saber que son indicadores factibles de la contaminación. Generalmente no se recomienda el uso de plaguicidas organoclorados por ser altamente persistente; sin embargo, hay otros como los organofosforados que, si bien se degradan rápidamente y no perduran en los sistemas, son mucho más tóxicos que los anteriores; por lo que lo más recomendable es utilizar siempre el plaguicida correcto en la dosis especificada y así además, se evitan problemas de resistencia a estos productos.

Así mismo, la presencia de pesticidas ha fomentado que existan ya genes de degradación en la biomasa intrínseca de los sedimentos. Se conoce que su presencia puede disminuir la diversidad microbiana, pero aún no sabemos si hay impacto en la diversidad procarionte en estos sitios y el alcance ecológico que está teniendo su aplicación.

### 13. Referencias

- Abdullah, AR., Bajet, C., Matin, MA., Nhan, DD. y Sulaiman, AH. (1997). Ecotoxicology of pesticides in the tropical paddy field ecosystem. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (1): 59-70.
- Abßhauer, KP. y Meinicke, P. (2013). On the estimation of metabolic profiles in metagenomics. *En: Beißbarth, T., Kollmar, M., Leha, A., Morgenstern, B., Schultz, AK., Waack, S., Wingender, E. (eds.) German Conference on Bioinformatics 2013, vol. 34 of OpenAccess Series in Informatics (OASISs)*. Schloss Dagstuhl–Leibniz-Zentrum fuer Informatik: Dagstuhl, Germany, p 13.
- Abßhauer, KP., Wemheuer, B., Daniel, R. y Meinicke, P. (2015). Tax4Fun: Predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*, 31 (17): 2882–2884. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv287>
- Aguirre, A. y Díaz, S. (2006). Estructura de tallas, madurez gonádica y alimentación del pez *Diapterus rhombeus* (Gerreidae) en el sistema fluvio-deltaico Pom-Atasta, Campeche, México. *Revista Biología Tropical*, 54 (2): 599-611.
- Akbar, S. y Sultan, S. (2016). Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47: 563-570.
- Albert, LA. y Loera, R. (2005). Química y ecotoxicología de los insecticidas, p. 177-190. *En: Vázquez, A., Rendón, J., Gold, G. y Agraz, C. (eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Instituto Nacional de Ecología, p 696.
- Amador, LE. y Frutos, M. (eds) (2015). *Problemas contemporáneos regionales del sureste mexicano: El caso del Estado de Campeche*. Primera edición, ed. Universidad Autónoma del Carmen, Campeche, México, p 308.
- Amador, LE., Guevara, E., Wakida, AT. y Cabrera, P. (2008). Peces del área natural protegida Laguna de Términos, incluidos en la norma oficial mexicana NOM-059 ECOL-2001. *TecnoCiencias*, 2 (2): 12-19.

- Ángeles, Al., Chávez, EA., Contreras, J., Cruz, JL., Díaz, F., Figueroa, D., González, B., Martínez, E., Martínez, R., Olguín, SD., Olmedo, RA. y Ruiz, RF. (2016). Análisis de la producción agrícola en tres localidades del estado de Campeche desde un enfoque sociológico. Universidad Autónoma Chapingo, p 121.
- Arellano, O. y Rendón, J. (2016). *La huella de los plaguicidas en México*. México: Instituto de Ecología, Pesquería y Oceanografía (EPOMEX), p 21.
- Ayala, LA., Ramos, J. y Flores, D. (2003). La comunidad de peces de la Laguna de Términos: estructura actual comparada. *Revista de Biología Tropical*, 51 (3-4): 783-793.
- Ayala, LA., Ramos, J., Flores, D., Sosa, A. y Martínez, GE. (2015). *Ictiofauna marina y costera de Campeche, México*, Instituto de Ecología, Pesquería y Oceanografía del Golfo de México (EPOMEX), Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. 60 p. ISBN 978-607-7887-95-9.
- Ayala, LA., Terán, G., Ramos, J. y Flores, D. (2012). Interannual changes in the fish community abundance on the west coast of Campeche, Mexico. *Ciencias Marinas*, vol. 38 (2): 395-410.
- Aylagas, E., Borja, Á., Tangherlini, M., Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Michell, CT., Irigoien, X., Danovaro, R. y Rodríguez N. (2017). A bacterial community based index to assess the ecological status of estuarine and coastal environments. *Marine Pollution Bulletin*, 114: 679-688.
- Baek, K., Wang, M., Mckeever, R., Rieber, K., Park, C. y Nüsslein, K. (2014). Biodegradation of low concentrations of 1,2-dibromoethane in groundwater is enhanced by phenol. *Applied Microbiology Biotechnology*, 98: 1329–1338.
- Bælum, J., Henriksen, T., Bruun, HC. y Suhr, C. (2006). Degradation of 4-Chloro-2-Methylphenoxyacetic Acid in Top- and Subsoil Is Quantitatively Linked to the Class III tfdA Gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (2): 1476-1486.

- Baldwin, BR., Nakatsu, CH. y Nies, L. (2003). Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (6): 3350–3358.
- Barreiro, MT. y Aguirre, A. (1999). Distribución espacio-temporal de la biomasa fitopláncica en el sistema lagunar Pom-Atasta, Campeche, México. *Revista Biología Tropical*, 47 (1): 27-35.
- Bejarano, F. (eds) (2017). *Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México*. Primera Edición ed. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, A. C. 364 p.
- Bellini, I., Pinelli, L., Dos Santos, ME. y Fernández, A. (2014). Bacterial consortia from raw water and sludges from water potabilization plants are able to degrade atrazine. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90: 131-139.
- Benítez, JA. y Bárcenas, C. (1996). Sistemas fluvio-lagunares de la Laguna de Términos: Hábitats críticos susceptibles a los efectos adversos de los plaguicidas, p 187-201. En: Vázquez, A., Rojas, J., Benítez, J. y Zárate, D. (eds.) *Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias*. México: EPOMEX- Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche, México, 666 p.
- Benítez, JA., Vidal, J., Bricchieri, T. y Delgado, A. (2012). Monitoring ecosystem health of the Terminos Lagoon region using heavy metals as environmental indicators. *Environmental Impact*, 162: 349-358.
- Borabe, L., Sericano, JL., García, A. y Carrillo, A. (2013). Biomonitorio de hidrocarburos aromáticos polinucleares en el sistema estuarino lagunar del río Pánuco, México. México: CICATA-IPN, Unidad Altamira, 8 p.
- Bravo, P. (2018). Bacterias asociadas a muestras de sedimentos y zooplancton en el Golfo de México. Maestría en Ciencias de la Vida. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 65 p.

- Bruno, D., Gutiérrez, C., Sánchez, D., Velasco, J. y Nilsson, C. (2016). Impacts of environmental filters on functional redundancy in riparian vegetation. *Journal of Applied Ecology*, 53: 846-855.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J. y Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7): 581–583.
- Cao, H., J.-C. Auguet & J.-D. Gu (2013) Global ecological pattern of ammonia-oxidizing archaea. *PLoS One*, 8 (2): 1-8.
- Carnero, V., Sánchez, J.A., Ruiz, A.C., Merino, M., Corcho, J.A., Sahli, H., Hélie, J.F., Preda, M., Zavala, J. y Díaz, M. (2018). Sea level rise sedimentary record and organic carbon fluxes in a low-lying tropical coastal ecosystem. *Catena*, 162: 421-430.
- Carvalho, F.P., Villeneuve, J., Cattini, C., Rendón, J. y Mota, J. (2009). Pesticide and PCB residues in the aquatic ecosystems of Laguna de Terminos, a protected area of the coast of Campeche, Mexico. *Chemosphere*, 74: 988-995.
- Castellanos, J. y Rache, L.Y. (2013). Microorganismos, enzimas, plásmidos y genes involucrados en la degradación de plaguicidas N-Metil carbamatos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29: 105-119.
- Castro, H.F., Williams, N.H. y Ogram, A. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology Ecology*, 31: 1-9.
- Cébron, A., Norini, M.P. y Beguiristain, T. (2008). Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 73 (2): 148-159.
- Chandler, D.P. y Brockman, F.J. (1996). Estimating biodegradative gene numbers at a JP-5 contaminated site using PCR. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57: 971-982.

- Charpy, L., Palinska, KA., Casareto, B., Langlade, MJ., Suzuki, Y., Abed, RM. Y Golubic, S. (2010). Dinitrogen-fixing Cyanobacteria in microbial mats of two shallow coral reef ecosystems. *Microbial Ecology*, 59: 174-186.
- Chi, T., Escalona, G., Vallarino, A., Vargas, JA., Castillo, GE. y Lara, J. (2016). Organochlorine and anticholinergic pesticides in wild mice from wetland ecosystems of the Gulf of Mexico. *Therya*, 7 (3): 465-482.
- CIL. (2007). Manual de gestión para la nominación del Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos patrimonio natural de la humanidad. Centro de Innovación y Liderazgo. Campeche: Universidad Autónoma del Carmen, 271 p.
- Cockell, CS., Kelly, LC. y Marteinson, V. (2013). Actinobacteria—An ancient phylum active in volcanic rock weathering. *Geomicrobiology Journal*, 30 (8): 706-720.
- Coleman, NV. (2015). Primers: Functional Genes for Aerobic Chlorinated Hydrocarbon-Degrading Microbes, p 141-170. En: *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. McGenity, TJ. (ed.), Berlin Heidelberg: Springer Protocols Handbooks, 244 p.
- Conan, P., Pujo, M., Agab, M., Calva, L., Chifflet, S., Douillet, P., Dussud, C., Fichez, R., Grenz, C., Gutierrez, F., Origel, M., Rodríguez, A., Sauret, C., Severin, T., Tedetti, M., Torres, R. y Ghiglione, JF. (2017). Biogeochemical cycling and phyto- and bacterioplankton communities in a large and shallow tropical lagoon (Términos Lagoon, Mexico) under 2009–2010 El Niño Modoki drought conditions. *Biogeosciences*, 14: 959-975.
- Contreras, A., Douillet, P. y Zavala, J. (2014). Tidal dynamics of the Terminos Lagoon, Mexico: observations and 3D numerical modelling. *Ocean Dynamics*, 64: 1349–1371.
- COP, (2004). Catálogo Oficial de Plaguicidas de la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas. Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST), México, 9 p.

- Currie, B. (2001). Collaborative Management of the Mexican Coast: Public Participation and the Oil Industry in the Terminos Lagoon Protected Area. Master of resource management, Simon Fraser University, 129 p.
- De Souza, M., Seffernick, J., Martínez, B., Sadowsky, M. y Wackett, L. (1998). The atrazine catabolism genes atzABC are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology*, 180 (7): 1951-1954.
- Delgado, A., Barreto, D.R., Acevedo, G. y Vázquez, LE. (2015). Effects of pollutant discharges on the aquatic mammal populations of Terminos Lagoon, Campeche, Mexico. *Water and Society*, 200: 229-235.
- Díaz, G., Vázquez, A. y Ponce, G. (2005). Plaguicidas organoclorados en pastos y peces de los sistemas Candelaria-Panlau y Palizada del Este, Laguna de Términos, Campeche, México, p. 207-224. En: Vázquez, V., Rendón, J. y Gold, G. (eds.) *Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. Segunda edición ed. Centro EPOMEX. Universidad Autónoma de Campeche, México, 696 p.
- DOF, (1994.) Decreto Área Nacional Protegida Laguna de Términos. Diario Oficial de la Federación. Consultado: 20 de noviembre de 2018. [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4745237&fecha=27/09/1994#](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4745237&fecha=27/09/1994#)
- Douglass, JF., Radosevich, M. y Tuovinen, OH. (2017). Microbial attenuation of atrazine in agricultural soils: Biometer assays, bacterial taxonomic diversity, and catabolic genes. *Chemosphere*, 17: 352-360.
- Ellatifhesham, A., Mawad, AM., Mostafa, YM. y Shoreit, A. (2014). Biodegradation ability and catabolic genes of petroleum-degrading *Sphingomonas koreensis* Strain ASU-06 Isolated from Egyptian Oily Soil. *BioMed Research International*, 2014 (127674): 1-10.
- Enciso, G. (2000). Sedimentación y dispersión en las lagunas costeras "Pom" y "Atasta", Campeche. Maestría en Ingeniería Ambiental. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, 61 p.

- Escamilla, VI., González, JA. y Villalobos, G. (2014). Developing strategies for environmental planning and risk management in the watershed of the Palizada River, Campeche. *Sociedad y Ambiente*, 1 (5): 73-91.
- Feng, BW., Li, XR., Wang, JH., Hu, ZY., Meng, H., Xiang LY. y Quan ZX. (2009). Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, 70: 236-248.
- Fichez, R., Archundia, D., Grenz, C., Douillet, P., Gutiérrez, F., Origel, M., Denis, L., Ruiz, AC. y Zavala, J. (2017). Global climate change and local watershed management as potential drivers of salinity variation in a tropical coastal lagoon (Laguna de Terminos, Mexico). *Aquatic Sciences*, 79: 219-230.
- Fuentes, C., De León, DA., Monreal, MA. y Vera, F. (2001). Environmental forcing in a tropical estuarine ecosystem: the Palizada River in the southern Gulf of Mexico. *Marine and Freshwater Research*, 52: 735-744.
- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P. y Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 98 (11): 4781-4794.
- Galindo, EJ. (2019). Biogeoquímica de dos cabeceras estuarinas de la Laguna de Términos, Campeche: Estudio base para generar propuestas de conservación. Máster en Ecología Aplicada. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, 21 p.
- García, JA., Arreguín, F., Hernández, S. y Lluch, D. (2004). Impacto ecológico de la industria petrolera en la Sonda de Campeche, México, tras tres décadas de actividad: una revisión. *Interciencia*, 29 (6): 311-319.
- García, V., Alpuche, L., Herrera, J., Montero, J., Morales, S. Pech, D., Cepeda, MF., Zapata, O. y Gold, G. (2013). Towards a coastal condition assessment and monitoring of the Gulf of Mexico Large Marine Ecosystem (GoM LME): Terminos Lagoon pilot site. *Environmental Development*, 7: 72-79.
- Gold G., Silva, T. y Zapata, O. (1993). Chlorinated pesticides in the Rio Palizada, Campeche, Mexico". *Marine Pollution Bulletin*, 26 (11): 648-650.



- Gold, G., Zapata, O., Montero, J., Cepeda, MF., Ceja, V. y Chan, ME. (2010). Diagnóstico de la situación ambiental de los COP en el Golfo de México. Análisis y sistematización de la información recolectada y de estudios previos realizados en la zona. México: Departamento de Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Mérida, 96 p.
- González, ME. (2002). Aplicación de un modelo de simulación ambiental para el sistema laguna Pom-Atasta, Campeche. Máster en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 54 p.
- Grativol, AD., Marchetti, AA., Wetler, RM., Venancio, TM., Gatts, CE., Thompson, FL. y Rezende, CE. (2017). Bacterial interactions and implications for oil biodegradation process in mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 118: 221-228.
- Grenz, C., Fichez, R., Álvarez, C., Calva, L., Conan, P., Contreras, A., Denis, L., Díaz, S., Douillet, P., Gallegos, E., Francois, J., Gutierrez, FJ., Origel, M., Márquez, AZ., Muñoz, A., Pujo, M., Torres, R. y Zabala, J. (2017). Benthic ecology of tropical coastal lagoons: Environmental changes over the last decades in the Términos Lagoon, Mexico. *Comptes Rendus Geoscience*, 349 (6): 319-329.
- Guo, XP., Lu, DP., Niu, ZS., Feng, JN., Chen, YR., Tou, FY., Liu, M. y Yang, Y. (2017). Bacterial community structure in the intertidal biofilm along the Yangtze Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, 124: 314-320.
- Guo, XP., Lu, DP., Niu, ZS., Feng, JN., Chen, YR., Tou, FY., Liu, M. y Yang, Y. (2018). Bacterial community structure in response to environmental impacts in the intertidal sediments along the Yangtze Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, 126: 141-149.
- Guo, XP., Yang, Y., Niu, ZS., Lu, DP., Zhu, CH., Feng, JN., Wu, JY., Chen, YR., Tou, FY. y Liu, M. (2019). Characteristics of microbial community indicate anthropogenic impact on the sediments along the Yangtze Estuary and its coastal area, China. *Science of the total Environment*, 648: 306-314.

- Gurav, R., Lyu, H., Tang, J., Liu, Q. y Zhang, H. (2017). Degradation of n-alkanes and PAHs from the heavy crude oil using salt-tolerant bacterial consortia and analysis of their catabolic genes. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 11392-11403.
- Gutiérrez, M., Cruz, VM. y Reyes, JM. (1982). Geomorfología y sedimentos recientes del sistema lagunar Atasta-Pom, Campeche, México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, 9 (130): 1-13.
- Hansen, A., Treviño, LG., Márquez, H., Villada, M., González, LC., Guillén, RA. y Hernández, A. (2013). Atrazina: un herbicida polémico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29: 65-84.
- Harrabi, M., Alexandrino, DA., Aloulou, F., Elleuch, B., Liu, B., Jia, Z., Almeida, C., Mucha, AP. y Carvalho, MF. (2019). Biodegradation of oxytetracycline and enrofloxacin by autochthonous microbial communities from estuarine sediments. *Science of the total Environment*, 648: 962-972.
- Hernández, A. y Hansen, AM. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27 (2): 115-127.
- Hernández, P., Cortés, JD. y Solís, V. (2011). Polychaete diversity in lagoons and estuaries of the Southern Gulf of Mexico”, p 557-569. En: Özhan, E. (ed.) *Proceedings of the Tenth International Conference on the Mediterranean Coastal Environment*. Rhodes, Greece.
- Hernández, P., Cortés, JD., Medina, NM., Avilés, AL. y Solís, V. (2014). Polychaete diversity in the estuarine habitats of Terminos Lagoon, southern Gulf of Mexico. *Memoirs of Museum Victoria*, 71: 97-107.
- Huang, X., He, J., Yan, X., Hong, Q., Chen, K., He, Q., Zhang, L., Liu, X., Chuang, S. y Li, S. (2017). Microbial catabolism of chemical herbicides: microbial resources, metabolic pathways and catabolic genes. *Pesticide biochemistry and physiology*, 143: 272-297.

- Huang, W., X. Chen, K. Wang, J. Chen, B. Zheng & X. Jiang (2019) Comparison among the microbial communities in the lake, lake wetland, and estuary sediments of a plain river network. *MicrobiologyOpen*, 8, e00644.
- Jiang, R., Wang, J.X., Huang, B., Yu, K.C., Zhang, P., Zheng, J.W. y Liu X.Z. (2016). Phylogenetic analysis of bacterial community composition in sediments with organic contaminants from the Jiaojiang estuary in China. *Marine Pollution Bulletin*, 109: 558-565.
- Kanehisa, M., y Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia de genes y genomas. *Nucleic Acids Research*, 28: 27–30.
- Kanehisa M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. y Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 42: 199-205.
- Khandeparker, L., Kuchi, N., Kale, D. y Anil, AC. (2017). Microbial community structure of surface sediments from a tropical estuarine environment using next generation sequencing. *Ecological Indicators*, 74: 172-181.
- Klingenberg, H., Aßhauer, KP., Lingner, T. y Meinicke, P. (2013). Protein signature-based estimation of metagenomic abundances including all domains of life and viruses. *Bioinformatics*, 29 (8): 973-980.
- Lanza, G. y Lozano, H. (1999). Comparación fisicoquímica de las lagunas de Alavarado y Términos. *Hidrobiología*, 9 (1): 15-30.
- Li, X., Gao, D., Hou, L. y Liu, M. (2019). Salinity stress changed the biogeochemical controls on CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions of estuarine and intertidal sediments. *Science of the Total Environment*, 652: 593-601.
- Liu, J., Liu, X., Wang, M., Qiao, Y., Zheng, Y. y Zhang, XH. (2015). Bacterial and archaeal communities in sediments of the north Chinese marginal seas. *Microbial Ecology*, 70: 105-117.
- Liu, Q., Tang, J., Bai, Z., Hecker, M. y Giesy, JP. (2015). Distribution of petroleum degrading genes and factor analysis of petroleum contaminated soil from the Dagang Oilfield, China. *Scientific Reports*, 5 (11068): 1-12.

- Liu, Q., Tang, J., Liu, X., Song, B., Zhen, M. y Ashbolt, NJ. (2017). Response of microbial community and catabolic genes to simulated petroleum hydrocarbon spills in soils/sediments from different geographic locations. *Journal of Applied Microbiology*, 123: 875-885.
- Liu, X., Pan, J., Liu, Y., Li, M. y Gu, JD. (2018). Diversity and distribution of Archaea in global estuarine ecosystems. *Science of the Total Environment*, 637: 349-358.
- Lizárraga, ML., Carballo, R., Izquierdo, FB., Wong, L. y Colwell, RR. (1986). Bacteriología de la Laguna de Términos, Campeche, México. Programa CONACYT-UNAM, NSF-UM, PAMASEU 005779. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, 15 p.
- Lopes, A., Danko, A., Manaia, CM. y Nunes, O. (2013). Molinate biodegradation in soils: natural attenuation versus bioaugmentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (6): 2691-2700.
- Lotze, HK., Lenihan, H., Bourque, B., Bradbury, R., Cooke, R., Kay, M., Kidwell, S., Kirby, M., Peterson, C. y Jackson, J. (2006). Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science*, 312 (5781): 1806-1809.
- Lozupone, C., Hamady, M. y Knight, R. (2006). UniFrac – An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics*, 7 (371): 1-14.
- Lu, XM., Chen, C. y Zheng, TL. (2017). Metagenomic insights into effects of chemical pollutants on microbial community composition and function in estuarine sediments receiving polluted river water. *Microbial Ecology*, 73: 791-800.
- Luthy, R.G. (2004). Organic contaminants in the environment: challenges for the water/environmental engineering community. *En: Water and sustainable development: opportunities for the chemical sciences—a workshop report to the chemical sciences roundtable*, 40 p.
- Martínez, AG. (2003). Determinación de la actividad citotóxica, mutagénica y genotóxica de compuestos orgánicos presentes en agua y sedimento de la

- laguna Pom-Atasta, Campeche. Máster en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 59 p.
- McCarthy, MJ., Otis, DB., Méndez, P. y Muller, FE. (2018). Water Quality Drivers in 11 Gulf of Mexico Estuaries. *Remote sensing*, 10 (255): 1-15.
- Montoya, JC., Costa, JL. y Bedmar, F. (2006). Effects of soil type and tillage practice on atrazine transport through intact soil cores. *Geoderma*, 137 (1-2): 161-173.
- Mori, K., Suzuki, K., Urabe, T., Sugihara, M., Tanaka, K., Hamada, M. y Hanada, S. (2011). *Thiopfundum hispidum* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing gammaproteobacterium isolated from the hydrothermal field on Suiyo Seamount, and proposal of Thioalkalspiraceae fam. nov. in the order Chromatiales. *Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 2412-2418.
- Morris, L., O'Brien, A., Natera, SH., Lutz, A., Roessner, U. y Long, SM. (2018). Structural and functional measures of marine microbial communities: An experiment to assess implications for oil spill management. *Marine Pollution Bulletin*, 131: 525-529.
- Muciño, RE., Figueroa MG. y Aguirre, A. (2014). Phytoplankton composition in the fluvial-lagoon systems Pom-Atasta and Palizada Del Este, adjacent to the Terminos Lagoon Campeche, México. *Acta Biológica Colombiana*, 19: 63-84.
- Mulbry, W. y Kearney, P. (1991). Degradation of pesticides by micro-organisms and the potential for genetic manipulation. *Crop Protection*, 10 (5): 334-346.
- Mulbry, WW., Zhu, H., Nour, SM. y Topp, E. (2002). The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioides* sp. strain C190: cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, 206 (1): 75-79.
- Nagendra, H. (2002). Opposite trends in response for the Shannon and Simpson indices of landscape diversity. *Applied Geography*, 22: 175-186.
- Nava, JC., Arenas, P. y Cardoso, F. (2018). Integrated coastal management in Campeche, Mexico; a review after the Mexican marine and coastal national policy. *Ocean and Coastal Management*, 154: 34-45.

- Nolan, K. (2013). Quantification of total and oil-degrading bacteria in Louisiana marsh sediment following the deepwater horizon oil spill using cultivation and real-time PCR assays. Master in Science, Universidad de Louisiana, 51 p.
- Obi, CC., Adebusoye, SA., Ugoji, EO., Ilori, MO., Amund, OO. y Hickey, W.J. (2016). Microbial communities in sediments of Lagos lagoon, Nigeria: elucidation of community structure and potential impacts of contamination by municipal and industrial wastes. *Frontiers in Microbiology*, 7 (1213): 1-16.
- Ortíz, I., Avila, MA. y Torres, LG. (2014). Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 4 (1): 26-46.
- Palacio, ÁG. (2006). Ecología del paisaje costero en Laguna de Términos, Campeche. Diagnóstico ambiental para el manejo. Tesis de Doctorado en Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México, 139 p.
- Park, JW. y Crowley, DE. (2006). Dynamic changes in nahAc gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Applied Microbiology Biotechnology*, 72 (6): 13222-13230.
- Parte, SG., Mohekar, AD. y Kharat, AS. (2017). Microbial degradation of pesticide: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 11 (24): 992-1012.
- Poot, CA., Okolodkov, YB., Aké, JA. y Rendón, J. (2015). Annual cycle of phytoplankton with emphasis on potentially harmful species in oyster beds of Términos Lagoon, southeastern Gulf of Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 50: 465-477.
- Powell, SM., Ferguson, SH., Bowman, JP. y Snape, I. (2006). Using Real-Time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. *Microbial Ecology*, 52: 523–532.
- Ramos, J. y Villalobos, G. (eds.) (2015). Aspectos socioambientales de la región de la laguna de Términos, Campeche. Primera edición, ed. Universidad Autónoma de Campeche, México, 222 p.

- Rendón, J., Ojanguren, RT., Soares, A. y Guilhermino, L. (2004). Effect of pesticide exposure on acetylcholinesterase activity in subsistence farmers from Campeche, Mexico. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 59: 418-425.
- Rendón, J., Memije, M., Ortiz, A., Soares, A. y Guilhermino, L. (2006). An integrated approach to assess water quality and environmental contamination in the fluvial-lagoon system of the Palizada River, Mexico. *Environmental toxicology and chemistry*, 25 (11): 3024-3034.
- Rendón, J. y Memije, M. (2016). Organic compound residues that persist in shrimp and sediments in the coast and bay of Campeche, México. *Agroproductividad*, 9 (9): 16-21.
- Rivera, LN. (2015). Actinobacterias cultivables en la Laguna de Términos, Campeche, México. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 72 p.
- Robadue, D., Calderon, R., Oczkowski, A., Bach, L. y Cepeda, MF. (2004). Characterization of the region of the Laguna de Términos Campeche, Mexico. Managing freshwater inflows to estuaries. México: Fresh Water Inflow to Estuaries Project. Nature Conservancy and the University of Rhode Island, 51 p.
- Romo, JA. (2013). Productores primarios y su relación con la distribución de la ictiofauna en Laguna de Términos y plataforma continental adyacente, Campeche, México. En *Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas*, La Paz: Instituto Politécnico Nacional (IPN), 100 p.
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental microbiology*, 11 (10): 2477-2490.
- Rosano, MC., Ramírez, H. y Fernández, L. (2012). Petroleum-influenced beach sediments of the Campeche Bank, Mexico: Diversity and bacterial community structure assessment. *Journal of Environmental Management*, 95: 325-331.
- Roy, A., Dutta, A., Pal, S., Gupta, A., Sarkar, J., Chatterjee, A., Saha, A., Sarkar, P., Sar, P. y Kazy, SK. (2018). Biostimulation and bioaugmentation of native

- microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresource Technology*, 253: 22-32.
- Ruiz, A., Campos, S., Zavala, J. y Canedo, Y. (2009). Hydrological aspects of the Lagoons of Atasta and Pom, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10 (1): 63-74.
- Sáez, JM., Benimeli, CS. y Fuentes, MS. (2012). Biodegradación de lindano por consorcios definidos de Actinobacterias. Tesis de Doctorado en Bioquímica. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina, 62 p.
- Sánchez, P., Yáñez, A., Ramírez, J., DAY, JW. y Templet, PH. (2004). Some socio-economic indicators in the Mexican states of the Gulf of Mexico. *Ocean and Coastal Management*, 47 (11-12): 581-596.
- Schumacher, B. A. (2002) Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments.
- Shapir, N., Goux, S., Mandelbaum, R. y Pussemier, L. (2000). The potential of soil microorganisms to mineralize atrazine as predicted by MCH-PCR followed by nested PCR. *Canadian journal of microbiology*, 46 (5): 425-432.
- Sharma, P., Jindal, S., Bala, K., Kumari, K., Jasvinder, NN., Pandey, G., Pandey, R., Russell, RJ., Oakeshott, JG. y Lal, R. (2014). Functional screening of enzymes and bacteria for the dechlorination of hexachlorocyclohexane by a high-throughput colorimetric assay. *Biodegradation*, 25: 179–187.
- Sharma, A., Bhatt, P., Khati, P., Gangola, S. y Kumar G. (2016). Microbial degradation of pesticides for environmental cleanup Chap. 6: 178-205. En: Naresh, R. y Saxena, G. (eds), *Bioremediation of Industrial Pollutants*, 379 p.
- Singh, SN., Kumari, B. y Mishra, S. (2012). Microbial degradation of alkanes, p 439-469. En: Singh, SN. (ed.) *Microbial degradation of xenobiotics*. Springer, 483 p.
- Solano, E. y Frutos, M. (2013). Petróleo y sustentabilidad en la Laguna de Términos: entre las políticas de ordenamiento territorial y los nuevos esquemas de la industria petrolera regional en la Península de Atasta, Carmen, Campeche, p 71-81. En: Saavedra, SG. y Mendoza, AO. (eds.) *Problemas de desarrollo regional*



en la región sur-sureste de México: Política, economía y sociedad. Primera ed. Universidad de Quintana Roo, México, 255 p.

Su, Z., Dai, T., Tang, Y., Tao, Y., Huang, B., Mu, Q. y Wen, D. (2018). Sediment bacterial community structures and their predicted functions implied the impacts from natural processes and anthropogenic activities in coastal area. *Marine Pollution Bulletin*, 131: 481-495.

Tong, T., Li, R., Wu, S. y Xie, S. (2019). The distribution of sediment bacterial community in mangroves across China was governed by geographic location and eutrophication. *Marine Pollution Bulletin*, 140: 198-203.

Torres, MR. (2007). Distribución espacial de las bacterias sulfatorreductoras en el sedimento de una laguna costera. *Hidrobiología*, 17 (3): 277-279.

Torres, MR. (2009). Determinación de la diversidad y actividad bacteriana sulfatorreductora y metanogénica en los sedimentos de dos ecosistemas estuarino-lagunares del estado de Chiapas. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, México, 264 p.

Torres, MR., Fernández, FJ., Ramírez, F., Varona, F. (2013). Dynamics of the methanogenic archaea in tropical estuarine sediments. *Archaea*, 2013 (582646): 1-13.

Tribelli, PM., Rossi, L., Ricardi, MM., Gomez, M., Molin, S., Raiger, LJ. y López, NI. (2018). Microaerophilic alkane degradation in *Pseudomonas extremaustralis*: a transcriptomic and physiological approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45: 15-23.

Vallarino, A. y Rendón, J. (2017). Comparison of organochlorine and PAHs residues in terns eggs from two natural protected areas in the Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 116: 48-55.

Varona, F., Gutiérrez, F., Márquez, AZ., Crevenna, A. y Torres, V. (2014). Variación espacio-temporal de las características físico-químicas y nutrientes en la región marino-costera ubicada entre los ríos San Pedro y San Pablo y Champotón, Campeche, p 839-866. En: Vázquez, A., Rendón, J., Benítez, JA., Gold, G. *Golfo*

- de México. *Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. Primera edición, ed. UAC, UNAM-ICMYL, Cinvestav-Universidad Mérida, 1176 p.
- Vázquez, A., Rendón, J., Gold, G. y Agraz, C. (2005). *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias, Campeche, México*. Centro EPOMEX, Universidad Autónoma de Campeche, 729 p.
- Vidal, VM., Aguirre, ML., Del Rio, R., Gold, G., Rendón, J. y Miranda, GA. (2006). The pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*, its symbionts and helminths as bioindicators of chemical pollution in Campeche Sound, México. *Journal of Helminthology*, 80 (2): 159-174.
- Villalobos, CE. (1990). Niveles de plaguicidas organoclorados presentes en sedimentos recientes de la Laguna de Términos, Campeche. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, 90 p.
- Villalobos, G., Yáñez, A., Day J. y Lara, A. (1999). Ecología y Manejo de los Manglares en la Laguna de Términos, Campeche, México, p 263-274. En: Yáñez A. y Lara, AL. (eds). *Ecosistemas de Manglar en América Tropical*. Instituto de Ecología A.C. México, 380 p.
- Villalobos, G. y Mendoza, J. (2010). *La Biodiversidad en Campeche: estudio de caso*. En: (CONABIO) (eds.) Primera edición ed. Centro EPOMEX- Universidad Autónoma de Campeche, México, 747 p.
- Villéger, S., Ramos, J., Flores, D. y Mouillot, D. (2010). Contrasting changes in taxonomic vs. functional diversity of tropical fish communities after habitat degradation. *Ecological Applications*, 20 (6): 1512-1222.
- Wang, H., Gilbert, JA., Zhu, Y. y Yang, X. (2018). Salinity is a key factor driving the nitrogen cycling in the mangrove sediment. *Science of the Total Environment*, 631: 1342-1349.
- Wen, X., Yang, S., Horn, F., Winkel, M., Wagner, D. y Liebner, S. (2017). Global Biogeographic Analysis of Methanogenic Archaea Identifies Community-Shaping Environmental Factors of Natural Environments. *Frontiers in Microbiology*, 8 (1339): 1-13.

- Wu, B., Lan, T., Lu, D. y Liu, Z. (2013). Ecological and enzymatic responses to petroleum contaminations. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 00 (1-3): 2-12.
- Wu, P., Xiong, X., Xu, Z., Lu, C., Cheng, H., Lyu, X., Zhang, J., He, W., Deng, W. y Lyu, Y. (2016). Bacterial Communities in the rhizospheres of three mangrove tree species from Beilun Estuary, China". *PLoS ONE*, 11 (10): 1-10.
- Xu, K., Tang, Y., Ren, C., Zhao, K. y Sun, Y. (2013). Diversity and abundance of n-alkane-degrading bacteria in the near-surface soils of a Chinese onshore oil and gas field. *Biogeosciences*, 10: 2041-2049.
- Yan, QX., Hong, Q., Han, P., Dong, XJ., Shen, YJ. y Li, SP. (2007). Isolation and characterization of a carbofuran-degrading strain *Novosphingobium* sp. FND-3. *Microbiology Ecology*, 271 (2): 207-213.
- Yan, L., Yu, D., Hui, N., Naanuri, E., Viggor, S., Gafarov, A., Romantschuk, M. (2018). Distribution of Archaeal Communities along the Coast of the Gulf of Finland and Their Response to Oil Contamination. *Frontiers in Microbiology*, 9 (15): 1-19.
- Yáñez, A. (1969). Procesos costeros y sedimentos recientes de la plataforma continental al sur de la bahía de Campeche. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 32 (2): 75-115.
- Yáñez, A. y Day, JW (1982). Ecological characterization of Terminos Lagoon, a tropical lagoon-estuarine system in the southern Gulf of Mexico. *Oceanologica Acta*, 5: 431-440.
- Yáñez, A., Day, JW., Lara, AL., Sánchez, P., Villalobos, GJ. y Herrera, JA. (2012). *Ecosystem functioning: The basis for sustainable management of Terminos Lagoon, Campeche Mexico*, p 167-200. En: Tunnill, J. (ed.) *Gulf of Mexico Origin, Waters, and Biota: Ecosystem-Based Management*. Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies Series. Primera ed. Universidad de Texas, 460 p.

Yu, SX., Pang, YL., Wang, YC., Li, JL. y Qin, S. (2017). Spatial variation of microbial communities in sediments along the environmental gradients from Xiaoqing River to Laizhou Bay. *Marine Pollution Bulletin*, 120: 90-98.

Zhang, X., Hu, BX., Ren, H. y Zhang, J. (2018). Composition and functional diversity of microbial community across a mangrove-inhabited mudflat as revealed by 16S rDNA gene sequences. *Science of the Total Environment*, 633: 518-528.

## 14. Anexo

### 14.1. Anexo A. Gel de electroforesis para verificación de amplicones 16S ARNr.

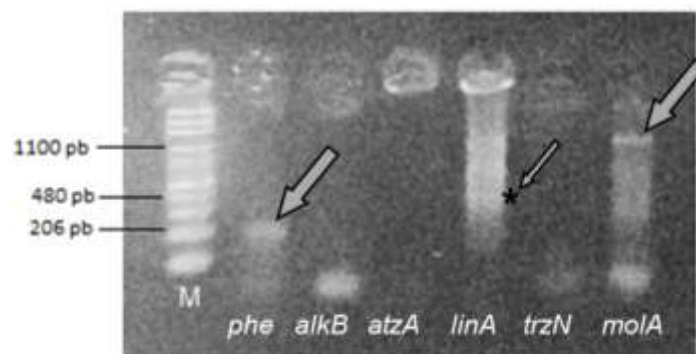


Anexo A1. Gel de electroforesis para verificación de amplicones 16S ARNr en el sistema Pom-Atasta. M: marcador de tamaño molecular.



Anexo A2. Gel de electroforesis para verificación de amplicones 16S ARNr en el sistema Palizada-Del Este y el río Palizada. M: marcador de tamaño molecular.

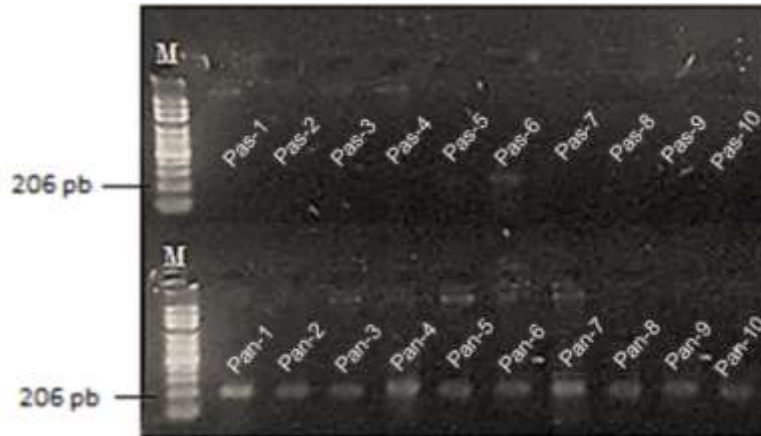
### 14.2. Anexo B. Gel de electroforesis para verificación de amplicones de los genes de estudio



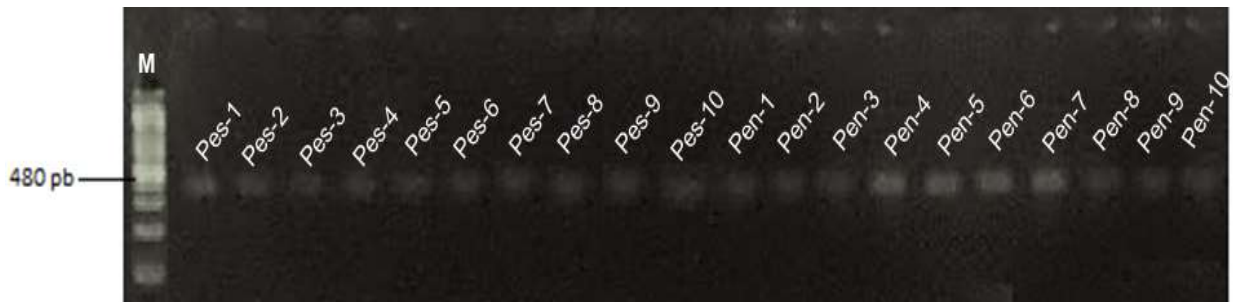
Anexo B1. Gel de electroforesis de la muestra de sedimento del río Palizada. (\*) Banda muy tenue del gen *linA*. M: marcador de tamaño molecular.



Anexo B2. Gel en agarosa del gen *phe* para las muestras de Palizada-Del Este, en secas y nortes respectivamente. M: marcador de tamaño molecular.



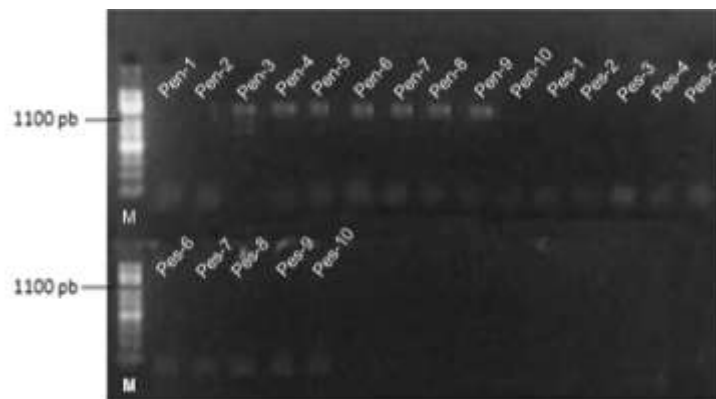
Anexo B3. Gel en agarosa del gen *phe* para las muestras de Pom-Atasta, en secas y nortes respectivamente. Solo se detectó este gen durante el muestreo del período de nortes. M: marcador molecular.



Anexo B4. Gel en agarosa del gen *linA* anidado para las muestras de Palizada-Del este, en secas y nortes, respectivamente. M: marcador de tamaño molecular.



Anexo B5. Gel en agarosa del gen *linA* anidado para las muestras de Pom-Atasta, en secas y nortes, respectivamente. M: marcador de tamaño molecular.



Anexo B6. Gel en agarosa del gen *moIA* para las muestras de Palizada-Del Este, en nortes y secas, respectivamente. Se obtuvieron señales de amplicones para la temporada de nortes en algunos sedimentos. M: marcador de tamaño molecular.



Anexo B7. Gel en agarosa correspondiente al gen *trzN* para las muestras de Pom-Atasta, en nortes y secas respectivamente. Se obtuvieron amplicones para la época de norte solamente. M: marcador de tamaño molecular.



Anexo B8. Gel en agarosa del gen *trzN* para las muestras de Palizada-Del Este, en nortes y secas respectivamente. Las señales de amplicones se obtuvieron para la época de secas y en las últimas estaciones durante el período de nortes. M: marcador de tamaño molecular.

### 14.3. Anexo C. Parámetros físico-químicos de los sedimentos en estudio

Muestra	Temperatura (°C)	Conductividad eléctrica (mS/cm <sup>2</sup> )	OD (mg/L)	pH	Corg	Cino	Ntotal
<i>Pom-Atasta, temporada de nortes</i>							
Pan.1	24.5	1.25	3.4	7	1.79	2.98	0.29
Pan.2	25.3	3.45	3.2	7.5	1.43	2.68	0.23
Pan.3	23.7	2.18	2.8	7.6	0.78	2.20	0.13
Pan.4	23.9	2.56	3.9	7.6	3.23	0.63	0.36
Pan.5	25.7	0.63	3.2	7.2	1.84	1.19	0.25
Pan.6	25.2	0.63	3.1	7.3	0.99	2.00	0.16
Pan.7	26.1	0.64	3.7	7.3	0.82	1.64	0.14
Pan.8	25.7	0.51	3.8	7.3	2.23	2.27	0.33
Pan.9	25.2	0.48	3.4	7.3	1.14	1.08	0.19
Pan.10	24.7	0.66	2.8	7.6	2.92	0.48	0.29
<i>Pom-Atasta, temporada de secas</i>							
Pas.1	29.4	41.12	3.8	6.9	1.57	2.85	0.27
Pas.2	28.7	41.33	3.9	7.2	2.66	1.06	0.32
Pas.3	29.8	37.06	3.5	7.5	0.86	2.15	0.18
Pas.4	30.3	21.88	4.2	7.4	1.04	4.11	0.23
Pas.5	30.6	20.77	4.5	7.3	1.69	1.13	0.22
Pas.6	33.9	4.70	5.0	7.6	0.95	1.98	0.15
Pas.7	30.9	3.71	4.3	7.6	0.94	1.88	0.18
Pas.8	30.8	2.29	4.2	7.6	1.58	2.80	0.23
Pas.9	30.7	1.12	4.1	7.6	1.24	1.00	0.15
Pas.10	30.5	0.92	4.2	7.6	1.25	3.5·10 <sup>-3</sup>	0.12
<i>Palizada-Del Este, temporada de nortes</i>							
Pen.1	24.6	0.71	1.6	7.2	1.52	3.13	0.38
Pen.2	26.0	0.43	1.1	7.5	0.63	0.84	0.17
Pen.3	26.2	0.19	1.3	7.5	2.47	0.1625	0.38
Pen.4	25.4	0.40	1.4	7.5	0.87	1.891	0.19



Muestra	Temperatura (°C)	Conductividad eléctrica (mS/cm <sup>2</sup> )	OD (mg/L)	pH	Corg	Cino	Ntotal
Pen.5	26.0	0.55	1.4	7.6	3.75	1.4	0.46
Pen.6	25.0	0.40	0.4	7.4	2.09	0.04	0.33
Pen.7	26.0	0.54	1.4	7.4	2.00	2.15	0.28
Pen.8	25.5	0.54	1.4	7.4	3.32	3.98	0.56
Pen.9	23.7	0.49	1.7	7.1	1.78	2.14	0.31
Pen.10	24.1	0.56	1.5	7.8	4.86	0.18	0.58
Rpen	24.1	0.56	1.5	7.8	1.52	1.58	0.21
<i>Palizada-Del Este, temporada de secas</i>							
Pes.1	29.1	52.89	2.0	8.2	2.48	0.13	0.37
Pes.2	30.1	40.37	2.3	6.9	4.26	0.72	0.31
Pes.3	30.2	27.85	3.0	5.3	2.62	0.09	0.40
Pes.4	29.8	2.23	2.8	5.2	2.03	2.02	0.61
Pes.5	30.6	4.43	2.0	5.9	2.77	5.67	0.83
Pes.6	30.8	3.37	2.0	6.9	4.51	0.11	0.54
Pes.7	30.7	1.95	2.2	6.8	1.79	2.39	0.33
Pes.8	30.7	0.90	2.4	6.8	3.03	2.35	0.32
Pes.9	31.1	0.96	3.4	7.6	1.1395	3.74	0.24
Pes.10	31.4	0.91	3.1	7.3	1.735	2.25	0.30