



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Identificación molecular de cianobacterias potencialmente  
tóxicas y su relación con la dinámica y los efectos del agua  
residual en un sistema de presas del Valle del Mezquital**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN CIENCIAS DE LA TIERRA**

**P R E S E N T A:**

**ANDREA MARGARITA GARCÍA CASILLAS**



**TUTORA  
DRA. LORENA MARÍA DURÁN RIVEROLL**

**Ciudad Universitaria, CDMX, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

1. Datos de la alumna

García  
Casillas  
Andrea Margarita  
(55) 3556 9445  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Ciencias de la Tierra  
415104559

2. Datos de la tutora

Dra.  
Lorena María  
Durán  
Riveroll

3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Christina Désirée  
Siebe  
Grabach

4. Datos del sinodal 2

Dra.  
María Guadalupe  
Ponce  
Vélez

5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Jorge Alberto  
Ramírez  
Zierold

6. Datos del sinodal 4

Dr.  
Enrique Arturo  
Cantoral  
Uriza

7. Datos del trabajo escrito

Identificación molecular de cianobacterias potencialmente tóxicas y su relación con la dinámica y los efectos del agua residual en un sistema de presas del Valle del Mezquital  
110 pp  
2020

## **Agradecimientos académicos**

De las cosas que más me gustan de la ciencia es que sin colaboraciones no existen avances significativos y este trabajo no es la excepción. Por ello, quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo, personas que apoyaron de manera directa o indirecta.

Quiero agradecer a la UNAM, a la Facultad de Ciencias y a todos(as) mis profesores(as) de la licenciatura, quienes compartieron su conocimiento adquirido a través de años de experiencia y sin quienes no habría podido hilar una sola idea presentada aquí.

A mi asesora de tesis, la Dra. Lorena María Durán Riveroll, quien me reveló las maravillas de las colaboraciones en la ciencia y me enseñó un nuevo significado de lo que es trabajar con perseverancia, disciplina y pasión, incluso en los momentos más difíciles de su vida. Sobre todo, le agradezco el tiempo que me dedicó, ya sea para cuestiones profesionales, como personales. Estaré eternamente agradecida con ella.

También aprovecho el espacio para agradecerle a mis sinodales Dra. Christina Siebe, Dra. Guadalupe Ponce, Dr. Jorge Ramírez y Dr. Enrique Cantoral por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Le agradezco a la RedFAN y su curso “Introducción al estudio de los Florecimientos Algales Nocivos 2018”, donde me facilitaron información sobre los FAN y su situación actual en el país.

Al Dr. Fernando González Farías, responsable del Laboratorio de Química Ambiental del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por proporcionarnos un espacio donde poder trabajar y estar atento a nuestras necesidades. Al Dr. Martín López Hernández, Técnico Académico Titular B de este laboratorio, por apoyar en la dirección de las colectas en campo, compartir su conocimiento de Limnología, y orientar en el funcionamiento de los equipos.

Al Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM Xochimilco, a través de la M. en C. María Guadalupe Ramos Espinoza. por brindar el apoyo financiero

para la realización del muestreo en las presas del Valle del Mezquital, así como para la obtención de los reactivos utilizados para los cultivos de cianobacterias.

Le agradezco a todos los pescadores que brindaron apoyo en las lanchas, en la recolección de muestras de agua y en el transporte de equipo: la cooperativa de pescadores de Zozea y a su presidente Rodrigo, el comité de pescadores de la presa Dolores: Mario Falcón, Raymundo Benítez García y Erivan Ocoterio, al comité de vigilancia de Endhó: Pedro Montiel, Manuel Zenón y Juan David, y al pescador de Requena, Adrián, por proporcionar la muestra de agua del centro de dicha presa.

Al Dr. Eberto Novelo Maldonado por proporcionar consejos sobre el crecimiento de cultivos de cianobacterias y por el apoyo brindado tanto en la toma de fotografías, como en la identificación morfológica de los cultivos. Al Dr. Gustavo Alberto Montejano Zurita y a la Dra. María Edith Ponce Márquez por brindarme consejos sobre el crecimiento de cultivos de cianobacterias y a la M. en C. Fabiola Ramírez Corona por su interés en este trabajo.

Al Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala, responsable del laboratorio de Genómica Microbiana del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), sede Mazatlán, por abrir las puertas de su laboratorio y apoyar en la realización del análisis de metagenómica. A la M. en C. Karen Enciso Ibarra por el apoyo en los métodos moleculares, y a los doctores Carlos Abraham Guerrero Ruíz y David Vega por su apoyo en los análisis bioinformáticos.

Al Dr. Francisco Javier Flores Verdugo y a su esposa Lucy de Santiago por abrirme las puertas de su casa y brindarme un lugar acogedor durante mi estancia en Mazatlán. Su admirable generosidad es inolvidable y mi aprecio hacia ellos es eterno.

Al Dr. Andrew Turner del *Centre for Environment Fisheries and Aquaculture Science* (CEFAS), Reino Unido, por apoyar en la detección de cianotoxinas de las muestras enviadas a través de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

Al Dr. Marco Tulio Solano de la Cruz del Laboratorio Conjunto del Instituto de Ecología, UNAM, por apoyar en la liofilización de las muestras y ser tan servicial.

Al Dr. Luis Arturo Soto González y al Biól. Carlos Illescas Monterroso del laboratorio Ecología del Bentos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por permitir el uso del microscopio Zeiss Axio Imager.A2 para observar los cultivos de cianobacterias y poder capturar imágenes en el mismo.

Al Dr. Hugo Isidro Pérez López, a Fer (Toxtli) y a Pame por su apoyo durante la salida de campo, tanto en la toma de muestras, como en las mediciones de los nutrientes en la madrugada. Gracias por la compañía y los ánimos.

Al Doc. Frank Raúl Gío Argáez por estar al pendiente de mí siempre, por enriquecer mi formación profesional, por las risas y los buenos momentos y por ser el mejor tutor de la orientación.

Por último, quiero agradecer a la Biól. Brenda Berenice Martínez Villa, a Emanuel y a Meli por apoyar en el PCA que se presenta en los resultados de este trabajo.

## **Agradecimientos personales**

Así como le agradezco a todas(os) las(os) colaboradoras(es) académicas(os) por hacer posible este trabajo, le agradezco a todas las personas que de alguna manera u otra me han ayudado a ser la persona que actualmente soy.

Si hay alguien a quien debo agradecerle por mostrarme el camino de la fortaleza, de la perseverancia, de la lealtad, del compromiso, de la generosidad y, sobre todo, del amor incondicional es a mi mamá. Le agradezco profundamente el apoyo que me ha brindado durante toda mi vida, sin ella no estaría en donde estoy parada.

Le agradezco a mis hermanos, Rody y Ale, y a mi hermana, Mary, por el apoyo, los ánimos, las bromas y el amor. Son mi fuente de sustento y mi impulso hacia cualquier obstáculo de la vida. También le agradezco a mi papá, quien, aunque no está presente físicamente para la culminación de este sueño, está presente en cada paso de mi vida.

Le agradezco a Octavio por su compañía hasta altas horas de la madrugada, sus consejos y su conocimiento que enriquecieron este trabajo y sus porras. Pero lo que más le agradezco es su paciencia, su bondad y su amor. Es el regalo divino del cielo que no esperaba.

Por último, le agradezco a mis amigas(os), quienes siempre mostraron interés en mi bienestar, así como en la culminación de este trabajo. A mis queridxs Faustinxs, por hacer de la facultad un espacio significativo y siempre sacarme las mejores risas (nunca dejen de sorprenderme, el mundo les queda muy chico). A mis amigas del laboratorio por los buenos momentos y ayudarme en lo que se necesitara. A mi queridísimo Alf, por la genuina amistad de hace más de una década y por compartir el deseo de luchar por nuestro planeta. A mi querida dive buddy Mar, por las risas y siempre velar por mí, tanto en el mar como en la tierra. Y a todas(os) mis demás amigas(os) quienes llenaron mi vida de aventuras que se convirtieron en eternos recuerdos.

## Contenido

Resumen .....	10
1 Introducción .....	11
2 Marco teórico .....	14
2.1 El Valle del Mezquital y el río Tula .....	14
2.2 Cianobacterias.....	19
2.2.1 Florecimientos Algales Nocivos .....	21
2.2.2 Cianotoxinas .....	24
2.2.3 Identificación molecular .....	27
3 Área de estudio.....	29
4 Hipótesis .....	33
5 Objetivo general.....	34
6 Objetivos particulares .....	34
7 Materiales y métodos.....	34
7.1 Obtención de muestras y medición de parámetros <i>in situ</i> .....	34
7.2 Establecimiento de cultivos .....	40
7.3 Análisis metagenómico .....	41
7.3.1 Análisis bioinformático.....	44
7.4 Análisis de toxinas.....	47
7.5 Análisis de componentes principales (PCA) .....	47
8 Resultados y Discusión .....	48
8.1 Parámetros fisicoquímicos .....	48
8.2 Extracción y secuenciación de DNA de muestras ambientales .....	61
8.2.1 Amplificación del gen 16S rRNA .....	62
8.2.2 Metagenomas .....	72
8.3 Establecimiento de cultivos de cianobacterias.....	76
8.4 Análisis de toxinas.....	82
8.5 Análisis de componentes principales (PCA) .....	84
9 Conclusiones .....	90
10 Consideraciones a futuro.....	92
11 Literatura citada .....	94
12 Anexos.....	101

## Lista de Tablas

Tabla 1. Capacidad de almacenamiento y volúmenes de descarga de las presas Endhó, Requena, J. Rojo Gómez y Zozea. ....	33
Tabla 2. Puntos de muestreo en cada presa. ....	36
Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos <i>in situ</i> . ....	49
Tabla 4. Nutrientes cuantificados de las muestras de agua. ....	61
Tabla 5. Abundancias relativas de los phyla bacterianos. ....	65
Tabla 6. Abundancias relativas de los géneros de cianobacterias. ....	65
Tabla 7. Índices de dominancia y equidad para la diversidad alfa (gen 16S rRNA). ....	70
Tabla 8. Coeficiente de similitud de Jaccard para la diversidad beta (gen 16S rRNA). ....	71
Tabla 9. Abundancias relativas de los phyla bacterianos presentes (metagenomas). ....	75
Tabla 10. Abundancias relativas de los géneros de cianobacterias presentes (metagenomas). ....	75
Tabla 11. Análisis de la matriz de correlaciones en el conjunto de datos. ....	85

## Lista de Figuras

Figura 1. Flujo de las aguas residuales de la Ciudad de México y su zona metropolitana hacia el Valle del Mezquital y cuatro de sus presas. ....	15
Figura 2. Puntos de descarga de aguas residuales municipales sin tratamiento. ....	19
Figura 3. Subcuencas hidrográficas de región hidrológica-administrativa XIII. ....	30
Figura 4. Vista satelital de la zona de estudio. ....	31
Figura 5. Ubicación de los puntos de muestreo en la presa Zozea. ....	38
Figura 6. Ubicación de los puntos de muestreo en la presa Javier Rojo Gómez. ....	38
Figura 7. Ubicación de los puntos de muestreo en la presa Dolores. ....	39
Figura 8. Ubicación de los puntos de muestreo en la presa Endhó. ....	39
Figura 9. Ubicación de los puntos de muestreo en la presa Requena. ....	40
Figura 10. Secuencia del metagenoma de la presa Endhó antes de la limpieza. ....	45
Figura 11. Secuencia del metagenoma de la presa Endhó después de la limpieza. ....	45
Figura 12. Secuencia del metagenoma de la presa Endhó con los porcentajes de bases nitrogenadas del DNA antes de la limpieza. ....	46
Figura 13. Secuencia del metagenoma de la presa Endhó después de la limpieza. ....	46
Figura 14. Comparación de la transparencia de las presas en función de la profundidad, de acuerdo con sus medianas y la dispersión de sus valores. ....	50
Figura 15. Temperatura del agua, potencial de hidrógeno (pH) y oxígeno disuelto de las presas, de acuerdo con sus medianas y la dispersión de sus valores. ....	51
Figura 16. Sólidos totales disueltos, indicadores del nivel de contaminación, conductividad y salinidad de las presas, de acuerdo con sus medianas y la dispersión de sus valores. ....	54
Figura 17. Comparación de los cuatro nutrientes cuantificados en las presas, de acuerdo con sus medianas y la dispersión de sus valores. ....	57
Figura 18. DNA extraído de las muestras de agua. ....	62
Figura 19. Amplificación de la región V3 para el gen 16S rRNA. ....	62
Figura 20. Amplificación de la región V3 para el gen 16S rRNA. ....	63
Figura 21. Amplificación de la región V3 con los índices en 300 pb. ....	63
Figura 22. Distribución y abundancia de los phyla bacterianos en cada punto de muestreo. ....	66
Figura 23. Modelo de rarefacción. ....	68
Figura 24. DNA extraído de cada presa para realizar el proceso de metagenomas. ....	72
Figura 25. Cultivo puro de cianobacterias nostocales Z3 en condiciones de laboratorio. ....	78
Figura 26. Cultivo de <i>Dolichospermum</i> Z3. ....	79
Figura 27. Cultivo de <i>Dolichospermum</i> Z3. ....	79
Figura 28. Polo del heterocisto (superior derecha) que está en contacto con el resto de la cianobacteria. ....	80
Figura 29. Polo del otro heterocisto (inferior izquierda). ....	80
Figura 30. Heterocistos intercalares. ....	81
Figura 31. Cultivo sin purificar de cianobacteria del orden Oscillatoriales. ....	81
Figura 32. Cultivo sin purificar de la cianobacteria del orden Oscillatoriales. ....	82

Figura 33. Modelo de Broken Stick. ....	84
Figura 34. Análisis de componentes principales realizado en este estudio. ....	89

**Anexos**

Anexo 1. Soluciones stock para medio de cultivo BG-11 <sub>0</sub> (Andersen, 2005) (modificado). ....	101
Anexo 2. Metales traza para medio de cultivo BG-11 <sub>0</sub> (Andersen, 2005) (modificado). ....	101
Anexo 3. Cantidades de cicloheximida utilizadas para medio de cultivo BG-11 <sub>0</sub> (Jacinavicius <i>et al.</i> , 2013). ....	101
Anexo 4. Abundancia de los géneros de cianobacterias (gen 16S rRNA). ....	102
Anexo 5. Abundancia de los géneros de cianobacterias (metagenomas).....	103
Anexo 6. Phyla de eucariontes en función de la metagenómica dirigida al gen 16S rRNA. ....	105
Anexo 7. Phyla de arqueas en función de la metagenómica <i>shotgun</i> estructural. ....	107
Anexo 8. Tabla de los componentes principales.....	110

## Resumen

Se realizó un muestreo único durante abril de 2019, época de estiaje, en cinco presas del Valle del Mezquital, Hidalgo, México, con el objetivo de identificar la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas en estos ecosistemas acuáticos. El Valle del Mezquital es una importante zona agrícola para el centro del país, donde la producción de los cultivos depende de las aguas residuales que recibe. Éstas provienen de los 22 millones de habitantes de la Ciudad de México y su zona metropolitana, y son ricas en materia orgánica, algunos metales pesados, bacterias coliformes, compuestos nitrogenados y fosfatados y compuestos tóxicos. La alta concentración de compuestos nitrogenados y fosfatados disueltos es utilizada como fertilizante por los agricultores regionales para irrigar sus cultivos, maíz y alfalfa principalmente, contribuyendo al reciclamiento de nutrientes y a que exista un menor ingreso de nitrógeno reactivo antropogénico a los ecosistemas. No obstante, esta alta concentración de nutrientes disueltos en las presas del valle también puede propiciar el desarrollo de cianobacterias potencialmente tóxicas, conocidas por liberar toxinas hepatotóxicas, neurotóxicas y citotóxicas que afectan a animales domésticos como el ganado, a animales silvestres y a los seres humanos. Por ello, se realizó la identificación molecular de DNA ambiental en muestras de agua de las presas de interés para identificar las especies de cianobacterias presentes; se realizaron cultivos de cianobacterias en condiciones de laboratorio y se realizó un análisis de cianotoxinas; se midieron parámetros fisicoquímicos de las presas *in situ* y se realizó un análisis de componentes principales para observar la relación de las cianobacterias identificadas con los parámetros fisicoquímicos. En las cinco presas se identificaron catorce géneros y cuatro especies de cianobacterias reportados como potencialmente tóxicos en nuestro país, con bajas abundancias relativas. Se obtuvo un cultivo puro de cianobacterias, las cuales fueron identificadas morfológicamente como pertenecientes al género *Dolichospermum*, el cual presentó resultados negativos en el análisis de cianotoxinas. Asimismo, las cianobacterias de los sistemas lénticos analizados mostraron una relación inversa con los compuestos fosfatados, por lo que es probable que, entre otros factores, éstos limiten su desarrollo.

## 1 Introducción

Con la creciente densidad poblacional mundial, la demanda de agua será mayor, y con ella, aumentará la generación de aguas residuales que difícilmente podrán ser tratadas en su totalidad debido a la baja cobertura de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), lo que disminuirá la calidad del agua (Martínez-Austria *et al.*, 2017).

De acuerdo con la Comisión Nacional del Agua (Conagua), en 2017 el caudal de aguas residuales generado en el país era de  $453 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ . De este volumen,  $234.9 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  provinieron de descargas municipales, de los cuales se trataron  $135.6 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ . Por otro lado,  $218.1 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  provinieron de descargas no municipales (por ejemplo, de industrias), es decir, aquellas que no se colectaron en sistemas de alcantarillado, de los cuales se trataron  $83.7 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ . Del volumen total de aguas residuales descargado en ese año, 51.6% se descargó sin tratamiento en cuerpos de agua receptores (Conagua, 2018).

Las aguas residuales son ricas en nutrientes, entre otros compuestos, que pueden ser aprovechados por el fitoplancton, de manera que éste puede crecer exponencialmente, fenómeno conocido como florecimiento algal. Cuando estos florecimientos tienen impactos negativos en la calidad del agua, en la vida acuática, en la vida terrestre circundante o en la salud humana, se les denomina florecimientos algales nocivos (FAN) (Heisler *et al.*, 2008).

Los FAN degradan la calidad del agua para la flora y la fauna nativas, afectan la salud de los organismos que interactúan con los cuerpos acuáticos, ponen en peligro el acceso al agua potable y crean zonas hipóxicas o muertas (en las cuales la concentración de  $\text{O}_2$  disuelto es  $<60 \mu\text{mol kg}^{-1}$  (aproximadamente  $0.192 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Deutsch *et al.*, 2011), en estuarios, lagos, ríos y aguas costeras marinas (Arellano-Aguilar *et al.*, 2016). Los organismos tóxicos productores de FAN pueden ser marinos o dulceacuícolas. En el caso de los cuerpos de agua epicontinentales, las cianobacterias son los microorganismos responsables de FAN (Carmichael, 1994), razón de interés para este trabajo.

El Valle del Mezquital, a 80 km al norte de la zona metropolitana de la Ciudad de México, en el estado de Hidalgo, es una importante zona de producción agrícola con mantenimiento de bajo costo en el centro del país. Sin embargo, el 75% ( $52 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,785 \text{ hm}^3$  anuales) del agua utilizada para la irrigación de cultivos proviene de aguas residuales no tratadas; una mezcla de aguas de desecho doméstico, municipal e industrial, así como de agua pluvial de la Ciudad de México y su zona metropolitana (ZMCM) (López-Álvarez, 2004; Lesser-Carrillo *et al.*, 2011; Siebe *et al.*, 2016). El constante envío de las aguas residuales desde hace más de 100 años ha convertido a este valle en la segunda zona de cultivo más grande del mundo irrigada con aguas residuales, la zona de mayor reúso de agua residual en el país y el tercer lugar en producción agrícola a nivel nacional (Conagua, 2013; Peña-García, 2012).

El sistema de drenaje que viaja de la Ciudad de México hacia Hidalgo fue construido desde la época colonial hasta el Porfiriato para evitar inundaciones en la cuenca cerrada de México. A principios del siglo pasado, el agua que era descargada en el Valle del Mezquital se utilizaba para generar energía eléctrica en las plantas hidroeléctricas de Juandhó y la Cañada (Peña-García, 2012). Posteriormente, se utilizaba para la irrigación de cultivos. Conforme aumentó la población en la Ciudad de México y la ZMCM, aumentó la descarga de aguas residuales, y con ello la superficie de suelo irrigado, lo que beneficia hoy en día a más de 46 mil personas que dependen económicamente de esta actividad en tres distritos de riego: distrito 003 Tula (que depende de la presa Requena), distrito 100 Alfajayucan (que depende de la presa Endhó) y distrito 112 Ajacuba (Conagua, 2011b). De esta manera, las aguas residuales no tratadas han transformado esta zona semiárida en una de las áreas más fértiles en el centro de México (Reyes-Solís *et al.*, 2009) y su uso permite la producción de cultivos forrajeros (aprovechados mayormente por el ganado), maíz, alfalfa, y algunas verduras como calabaza, coliflor y chiles, obteniendo así rendimientos superiores al promedio (Siebe *et al.*, 2016).

A pesar de la alta productividad agrícola en la zona, se ha cuantificado y analizado la contaminación en la región. Los cultivos y los suelos irrigados por las

aguas residuales absorben los metales pesados disueltos en el agua, sobre todo en los primeros 20 cm de espesor del suelo; las aguas subterráneas tienen concentraciones considerables de nitratos y coliformes fecales y totales; existe una acumulación en las concentraciones traza de algunos compuestos farmacéuticos en la parte superior del suelo, e incluso se ha reportado una mayor prevalencia de infecciones por helmintos intestinales en niños que habitan la zona (Lesser-Carrillo *et al.*, 2011; Siebe *et al.*, 2016).

Las aguas residuales son un foco de riesgo debido a que contaminan los cuerpos de agua, favorecen la eutrofización, transmiten enfermedades infecciosas y parasitarias, y limitan el acceso al agua potable a cerca de 800 millones de personas en el mundo (Arellano-Aguilar *et al.*, 2016). Se estima que el tratamiento de estas aguas residuales podría solventar la demanda de agua hasta en un 40% para el 2030, ya que para ese año habrá aproximadamente 9.2 mil millones de m<sup>3</sup> de aguas residuales (Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental, 2018).

La inversión en el tratamiento de aguas residuales podría reducir considerablemente algunos problemas de salud, así como reestablecer las condiciones ecológicas de los ecosistemas acuáticos y terrestres por donde transita el agua, cuya dinámica cambia drásticamente con su vertido. Asimismo, podría mantener la economía local de las zonas que dependen directamente de las actividades pesqueras y recreativas de los cuerpos de agua epicontinentales. Por ello, es necesario realizar estudios sobre la calidad de agua en la región del Valle del Mezquital, para generar acciones de conservación y reutilización del recurso hídrico de acuerdo con la normativa mexicana. Estos estudios también permitirán el establecimiento de las condiciones para su descarga en los cuerpos acuáticos y, con ello, la preservación de la flora y la fauna nativas, que a su vez apoya a los sectores que dependen de dicho recurso (Montelongo-Casanova *et al.*, 2008).

## 2 Marco teórico

### 2.1 El Valle del Mezquital y el río Tula

El Valle del Mezquital se encuentra en una zona semiárida a 80 km al norte de la Ciudad de México y la ZMCM. La precipitación anual media en este valle es de 700 mm en su zona sur y menos de 400 mm en su zona norte (la mayor parte de estas precipitaciones ocurren entre junio y septiembre) y su evapotranspiración anual media es de 1,800 mm (Siebe *et al.*, 2016), es decir, se evapora más de lo que precipita. El resto del agua que se evapotranspira proviene de las aguas del río Tula que fluyen durante todo el año en este valle.

El río Tula recibe los flujos procedentes de la red de drenaje de la Ciudad de México y la ZMCM, a través del Tajo de Nochistongo y del río Salado –los cuales son alimentados por el Gran Canal de Desagüe (Del Arenal-Capetillo, 1985)–, del Emisor Central, del Interceptor Poniente –el cual descarga en el río El Salto– (Figura 1), y, próximamente, a través del Túnel Emisor Oriente. El valle recibe aproximadamente  $52 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  de agua residual no tratada, los cuales se utilizan para irrigar 90 mil ha, y parte de ésta se infiltra al acuífero Mezquital (Lesser-Carrillo *et al.*, 2011; Siebe *et al.*, 2016).

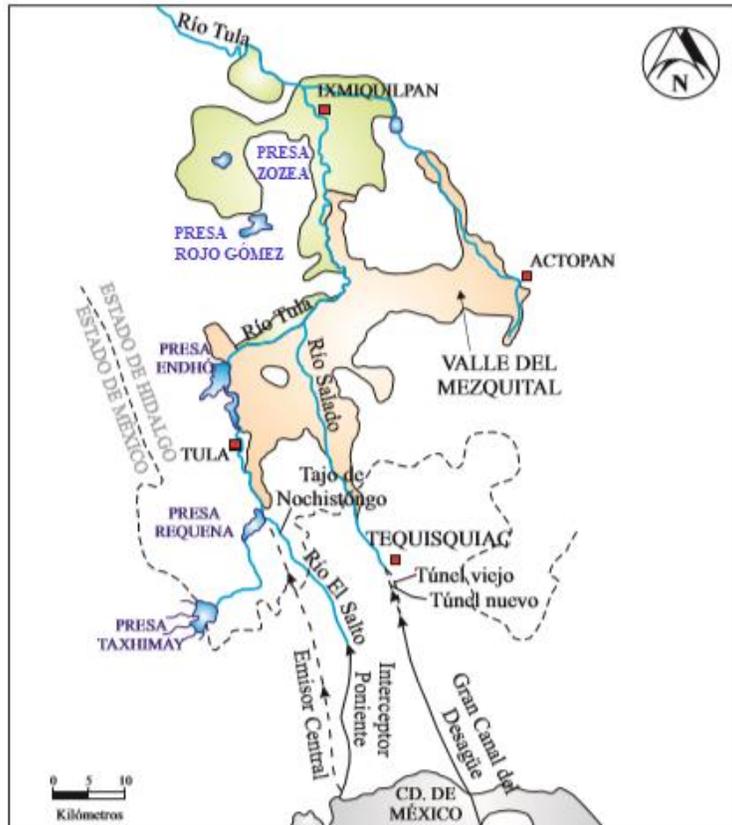


Figura 1. Flujo de las aguas residuales de la Ciudad de México y su zona metropolitana hacia el Valle del Mezquital y cuatro de sus presas. Fuente: Lesser-Carrillo *et al.*, 2011 (modificado).

El Valle del Mezquital es de importancia económica para una de las urbes más grandes del mundo, pues se utiliza como zona agrícola y pecuaria. Desde hace más de un siglo, éste se ha irrigado principalmente con aguas residuales de la Ciudad de México de manera continua, debido a la baja precipitación y al alto contenido de nutrientes inorgánicos que sirven como fertilizantes. Esta situación convierte al Valle del Mezquital en la segunda zona de cultivo más grande del mundo irrigada con aguas residuales, y el tercer lugar de producción agrícola a nivel nacional (Peña-García, 2012). Estas aguas residuales han sido usadas para la producción local de 90 mil ha, de la cual depende el 61% de la población local (i.e. 46 mil habitantes) (López-Álvarez, 2004; Acosta-Álvarez, 2007; Cruz-Sánchez, 2011; Lesser-Carrillo *et al.*, 2011; Siebe *et al.*, 2016). Los principales cultivos que se producen son cultivos forrajeros, maíz, alfalfa, y algunas verduras como calabaza, coliflor y chiles (Siebe *et al.*, 2016).

Las aguas residuales, que están parcialmente tratadas y mezcladas con aguas pluviales (Peña-García, 2012), contienen concentraciones considerables de bacterias coliformes, residuos orgánicos, metales pesados y otros compuestos tóxicos. En el caso de los metales pesados en suelos de la región se ha reportado la presencia de Al, Ni, Pb, V, As, Cd, Cu, Co, Mn, Cr y Zn, por mencionar algunos, y se ha observado que la concentración de los últimos dos aumenta de manera directamente proporcional al uso del agua residual (Huerta *et al.*, 2002; Reyes-Solís *et al.*, 2009). También se ha observado que en los sedimentos y en los tejidos de las plantas se absorben los metales pesados disueltos. Los niveles de Ni, Pb, Co y Cu aumentan en las plantas cuando se riegan con aguas residuales. En el caso de la alfalfa, el Zn es el metal más absorbido; las concentraciones de Cr y Pb se han reportado por arriba de los niveles de tolerancia, y las cantidades de Co en este cultivo pueden ser un riesgo para la salud de los animales y de los seres humanos (Cajuste *et al.*, 1991). Por último, se han reportado niveles de Pb por arriba de los recomendados en el músculo de tilapias (*Oreochromis nilotica*) que viven en la cuenca del río Tula (Rubio-Franchini *et al.*, 2016). Todo esto es una retroalimentación negativa para la producción de la zona, puesto que estos contaminantes orgánicos e inorgánicos modifican las propiedades fisicoquímicas del agua, del suelo y, por lo tanto, de los cultivos (Acosta-Álvarez, 2007).

Dentro del Valle del Mezquital se encuentran cinco presas con una capacidad de almacenaje total de agua de 350 millones de m<sup>3</sup>: Taxhimay, Requena, Endhó, Javier Rojo Gómez y Vicente Aguirre (también conocida como Zozea). También existen sus presas derivadoras, una extensa red de canales que conducen y distribuyen el agua, túneles y plantas de bombeo que permiten la circulación de las aguas residuales en este valle (Peña-García, 2012).

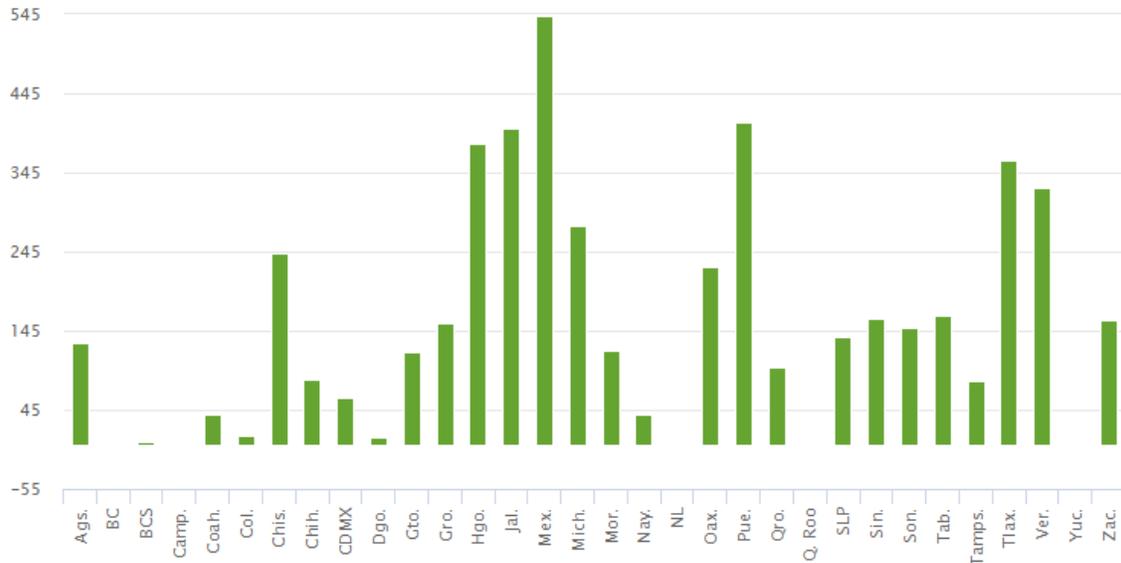
Desde el Emisor Central hasta la Presa Endhó, las condiciones fisicoquímicas no son aptas para la vida acuática en general, de acuerdo con los estudios realizados en 2008 por Montelongo-Casanova y colaboradores:

- Las concentraciones de oxígeno disuelto (OD) se encuentran entre 1.52 y 5.82 mg L<sup>-1</sup>, por lo que ciertos tramos tienen concentraciones por debajo del nivel requerido para la vida acuática en general (5 mg L<sup>-1</sup>).
- La alcalinidad (CaCO<sub>3</sub>) se encuentra por arriba del Criterio Ecológico de Calidad del Agua CE-CCA-001/89 para fuentes de abastecimiento de agua potable, con 458.01 mg L<sup>-1</sup> –el límite máximo permitido es de 400 mg L<sup>-1</sup>.
- La concentración de amoníaco está por arriba de los límites establecidos para la protección de fauna acuática, con valores entre 0.09 y 64 mg L<sup>-1</sup> –el límite máximo permitido de acuerdo con la NOM-127-SSA1-1994 para fuentes de abastecimiento es de 0.5 mg L<sup>-1</sup>.
- La concentración de nitratos es de 6.24 mg L<sup>-1</sup> –el límite establecido para estos compuestos es menor a 5 mg L<sup>-1</sup> para fuentes de agua potable–, mientras que de nitritos está entre 0.5 y 1.304 mg L<sup>-1</sup> –su límite está establecido para concentraciones menores a 0.5 mg L<sup>-1</sup>–.
- Incluso se ha detectado la presencia de compuestos de mercurio. Por lo tanto, la toxicidad de estas aguas residuales se considera de moderada a alta, lo que afecta la biodiversidad de la cuenca y la salud de las poblaciones humanas locales (Montelongo-Casanova *et al.*, 2008).

En México se ha estimado que, para el 2015, el costo económico de la contaminación por aguas residuales sin tratamiento fue aproximadamente de 57 mil millones de pesos, lo que equivale a 0.3% del producto interno bruto (PIB), mientras que se calculó la muerte de 3,754 personas a causa de enfermedades gastrointestinales en ese mismo año. Por lo tanto, una inversión a largo plazo en el tratamiento de aguas residuales podría ser mucho más económico y saludable que la situación actual de la zona, considerando que somos el primer lugar en Latinoamérica y el segundo a nivel internacional (solo detrás de la República Popular de China) en utilizar aguas residuales sin tratamiento para la agricultura (Acosta-Álvarez, 2007; Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental, 2018).

De acuerdo con el Censo Nacional de Gobiernos Municipales y Delegacionales 2015, del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el 2014 el Estado de México era el estado con mayor cantidad de puntos de descarga de aguas residuales municipales (éstas excluyen las aguas residuales provenientes de las industrias) sin tratamiento en el país, con 544 puntos, seguido por Puebla (408), Jalisco (400) e Hidalgo (381) (Figura 2) (INEGI, 2014).

Para solventar la cantidad de puntos de descarga de aguas residuales sin tratamiento, en el 2015 entró en operación la PTAR Atotonilco de Tula, cuya capacidad de tratamiento instalada es de  $23,000 \text{ L s}^{-1}$ . Su proceso es dual, es decir, provee pretratamiento, tratamiento primario y desinfección durante el tren de procesos químicos (TPQ); tratamiento biológico, digestión y cogeneración de lodos, los cuales son aprovechados para la obtención de biocombustibles (Duro-Rodríguez *et al.*, 2014), y da servicio de tratamiento a  $9,000 \text{ L s}^{-1}$  de aguas residuales provenientes de la Ciudad de México y la ZMCM ( $5,400 \text{ L s}^{-1}$  provienen de la Ciudad de México y  $3,600 \text{ L s}^{-1}$  provienen del Estado de México) (Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental, 2017). Esta PTAR recibe las aguas residuales transportadas por el Emisor Central y, próximamente, por el Túnel Emisor Oriente, y descarga el agua tratada en la presa Endhó, de manera que se pueda utilizar en los distritos de riego (Peña-García, 2012).



Fuente:

INEGI Censo Nacional de Gobiernos Municipales y Delegacionales 2015. Módulo ambiental de agua potable y saneamiento.

Figura 2. Puntos de descarga de aguas residuales municipales sin tratamiento.

Fuente: INEGI, 2014.

## 2.2 Cianobacterias

Las cianobacterias, también conocidas como cianofitas o cianoprocariontes, y anteriormente como algas verdeazules, son un grupo extenso de productores primarios que habitan en ecosistemas tanto terrestres húmedos como acuáticos, y que llevan a cabo diferentes funciones ecológicas. Entre los organismos procariontes, las cianobacterias son las únicas capaces de realizar fotosíntesis, debido a que contienen pigmentos fotosintéticos. Estos microorganismos forman parte de los ciclos biogeoquímicos, ya que algunos son fijadores de nitrógeno (también conocidos como diazótrofos). Los organismos diazótrofos convierten el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ , el cual constituye el 78% del volumen de la atmósfera terrestre), que se encuentra disuelto en el agua, en formas de nitrógeno orgánico o biodisponible ( $NH_4$  principalmente, que después se transforma en  $NO_2$  y  $NO_3$  durante el proceso de nitrificación), las cuales pueden ser asimiladas por el resto de los organismos. Asimismo, llevan a cabo la fijación de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) mientras liberan el oxígeno atmosférico, que a su vez es utilizado por los organismos aerobios, y, además, son parte de la base de la red trófica (WHO, 1999).

Las cianobacterias también son consideradas fuentes de recursos, pues son utilizadas como suministro de proteínas, agentes de biorremediación, fertilizantes naturales para las prácticas agrícolas, biocombustibles e incluso como recursos farmacéuticos (Carmichael, 1994; WHO, 1999; Zarull *et al.*, 2002).

A pesar de ser consideradas el producto de la unión entre bacterias y algas, este grupo presenta particularidades que lo diferencian de los otros dos: su historia evolutiva, su capacidad de realizar procesos fotoautotróficos y, para ciertas cianobacterias, heterotróficos (WHO, 1999), su variedad morfológica y su facilidad para desarrollarse (Pérez *et al.*, 2008). Morfológicamente, se hallan en formas unicelulares, filamentosas o coloniales. Muchas cianobacterias son capaces de crecer y desarrollarse en ambientes extremos; se han hallado desde el Círculo Polar Antártico, hasta en aguas termales, ácidas o alcalinas, así como en ambientes salobres, salados o dulceacuícolas (i.e. aquellos cuerpos epicontinentales que contienen menos de  $3 \text{ g L}^{-1}$  de sales), e inclusive en sustratos poco fértiles, como cenizas volcánicas y rocas (WHO, 1999; Pineda-Mendoza *et al.*, 2011; Muciño-Márquez *et al.*, 2015). Asimismo, las cianobacterias tienen una tasa de crecimiento más alta que otros organismos del fitoplancton cuando las intensidades de luz son bajas, no obstante, su máxima tasa de crecimiento se da cuando la intensidad lumínica es alta ( $320 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), intensidad letal para muchas especies (WHO, 1999). Esto las ha convertido en uno de los grupos más exitosos desde los inicios de la vida en el planeta.

Las cianobacterias se consideran organismos pancrónicos, ya que constituyen la evidencia de vida más antigua de la Tierra, y que podemos encontrar aún en nuestros días, ya que se ha hallado evidencia fosilífera de la existencia de cianobacterias en Warrawoona, Australia, en estructuras órgano-sedimentarias, conocidas como estromatolitos, de hace aproximadamente 3.5 mil millones de años. Por esta razón suelen utilizarse como paleoindicadores ambientales. Asimismo, proporcionan información sobre el origen de organelos en organismos eucariontes, como es el caso de los cloroplastos. Además, son las primeras especies productoras de oxígeno en la atmósfera terrestre (Carmichael, 1994; WHO, 1999; Beraldi, 2019).

La mayor biodiversidad y biomasa global se encuentra en el fitoplancton, por lo que, si algún factor altera el desarrollo y/o el proceso de fotosíntesis de este grupo funcional (que agrupa a las cianobacterias, diatomeas, dinoflagelados y coccolitofóridos, entre otros) (D'Ors de Blas, 2015), afectará la producción ecológica de tres cuartas partes del planeta, así como su producción oxigénica.

### 2.2.1 Florecimientos Algales Nocivos

El ser humano ha causado impactos negativos en la biósfera con el cambio global. El cambio climático, la contaminación causada por las industrias y los asentamientos humanos, la quema de combustibles fósiles que libera óxido nitroso (uno de los principales gases de efecto invernadero) a la atmósfera (Sutton *et al.*, 2011), la contaminación generada por la producción agrícola y la producción intensiva de ganado, han convertido ciertos ecosistemas acuáticos en sitios inhabitables (Arellano-Aguilar *et al.*, 2016).

En la agricultura industrial se utilizan toneladas de nutrientes sintéticos en forma de fertilizantes para aumentar la producción de los cultivos. Estos nutrientes (nitrógeno y fósforo, y sus derivados) son trasladados posteriormente por la lluvia y ríos o arroyos hacia cuerpos de agua lénticos, ya sean continentales u oceánicos, generando el proceso de eutrofización. Los cuerpos lénticos son sistemas que poseen un bajo rendimiento de afluentes y efluentes, y al incrementar los tiempos de residencia del agua, el área expuesta a la luz solar y la cantidad de nutrientes alóctonos (dependiendo de las descargas fluviales), las condiciones son favorables para el crecimiento del fitoplancton, lo que permite la formación de florecimientos algales (WHO, 1999; Pérez-Morales *et al.*, 2016). Cuando estos florecimientos tienen impactos negativos en la calidad del agua, en la vida acuática, en la vida terrestre circundante o en la salud humana, se les denomina florecimientos algales nocivos (FAN) (Heisler *et al.*, 2008). Las cianobacterias son conocidas por causar FAN cuando hay un crecimiento acelerado y una acumulación masiva de células (millones de células por litro) (Pérez-Morales *et al.*, 2016), y pueden liberar cianotoxinas al medio ambiente cuando ocurre la lisis celular.

En las últimas décadas, la frecuencia y duración de los FAN han aumentado significativamente en los cuerpos de agua de poca profundidad. Debido a que cada especie de fitoplancton requiere de una composición relativa de los nutrientes disponibles, éstos podrían determinar la composición de las especies, y su abundancia permanente o episódica en el medio acuático podría promover y/o mantener el desarrollo de los FAN (Heisler *et al.*, 2008). En los ecosistemas acuáticos epicontinentales, el fósforo es el nutriente limitante para el fitoplancton, mientras que el nitrógeno es el nutriente limitante en los ecosistemas marinos (Arellano-Aguilar *et al.*, 2016). En la Unión Europea, el impacto económico de la contaminación por nitrógeno en los ecosistemas acuáticos se ha estimado entre 70 mil millones y 320 mil millones de euros anuales, más del doble del valor estimado que agregan los fertilizantes nitrogenados a los ingresos agrícolas europeos (Sutton *et al.*, 2011), por lo que es más rentable evitar la escorrentía de los nutrientes sintéticos y con ello evitar los FAN, que remediar los problemas derivados por la eutrofización establecida en los cuerpos de agua (Heisler *et al.*, 2008).

Los FAN ponen en peligro el acceso al agua potable, alteran las características físicas y químicas del ecosistema y degradan la calidad del agua, lo que puede causar efectos adversos en la salud de las especies que interactúan con el cuerpo de agua, incluyendo la especie humana. Además, la respiración de las algas y la descomposición de la materia orgánica causan el agotamiento del oxígeno disuelto en el agua, de manera que se crean zonas hipóxicas o muertas (en las cuales la concentración de  $O_2$  es  $<60 \mu\text{mol kg}^{-1}$  [(Deutsch *et al.*, 2011), aproximadamente  $0.192 \text{ mg L}^{-1}$ ] en estuarios, lagos, ríos y aguas costeras marinas. Asimismo, la respiración de las algas aumenta la concentración de dióxido de carbono disuelto y, con ello disminuye el pH del agua (Wallace *et al.*, 2014; Arellano-Aguilar *et al.*, 2016). También pueden tener impactos en la salud pública y en la economía local y nacional, ya que pueden generar pérdidas económicas, principalmente en la actividad pesquera y turística, dependiendo de la gravedad del FAN.

La primera descripción académica de los efectos potencialmente letales de las cianobacterias fue realizada en 1878 por George Francis en el estuario del río

Murray, en Australia. En ella detalló que el crecimiento de las cianobacterias había vuelto insalubre el agua para el ganado y otros animales, como animales domésticos o aves, a tal grado que era mortal para éstos (Carmichael, 1994; WHO, 1999). Los FAN de cianobacterias (cianoFAN, denominación que será utilizada en este escrito) suceden cuando las condiciones ambientales son las más apropiadas para que la densidad celular se eleve exponencialmente. Estas condiciones son: velocidad del viento baja o casi nula, temperaturas cálidas (arriba de 25°C), alta concentración de nutrientes inorgánicos y orgánicos (eutrofización), baja relación nitrógeno:fósforo (N:P) [10-16 mol de N: 1 mol de P, en comparación de la relación óptima de 16-23 mol de N: 1 mol de P para algas eucariontes (WHO, 1999)], pH cercano a neutro o alcalino (de 6 a 9), disponibilidad de luz y estratificación de la columna de agua (Carmichael, 1994; Pérez *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2009; Muciño-Márquez *et al.*, 2015). De igual manera, es necesario que los tiempos de residencia de los cuerpos de agua se incrementen para que se pueda formar un florecimiento de cianobacterias, ya que estos organismos tienen tasas de crecimiento lentas. Una vez que los cianoFAN se establecen en un ecosistema acuático es complicado disminuir su densidad celular, ya que tienen pocos depredadores naturales y su capacidad de flotabilidad evita su sedimentación (WHO, 1999).

Las actividades antropogénicas han causado que los cianoFAN, sobre todo en cuerpos epicontinentales y zonas costeras, se presenten con mayor frecuencia. Estos en su mayoría son causados de manera artificial por la agricultura intensiva, el vertido de aguas residuales urbanas sin tratamiento, la lixiviación de detergentes y fertilizantes, la propagación de estiércol y la pérdida de suelos debido a la erosión causada por la deforestación (WHO, 1999; Heisler *et al.*, 2008; Maciel-Baltazar, 2015), lo que altera la calidad del agua en su transparencia, su nivel de oxígeno disuelto y sus concentraciones de nitrógeno y fósforo, situación que promueve los cianoFAN (Carmichael, 1994; Moschini-Carlos *et al.*, 2009).

Las cianotoxinas son sustancias tóxicas producidas por las cianobacterias; estas sustancias pueden tener un efecto negativo en la salud del ecosistema, pues irritan las branquias de los peces o los intoxican; además, se pueden bioacumular en otros organismos que forman parte de la red trófica, lo que puede afectar la

biodiversidad acuática. Pueden incluso causar mortandad en peces, moluscos, aves, reptiles, crustáceos, ganado, animales domésticos y seres humanos, por mencionar algunos (Pérez-Morales *et al.*, 2016). En el caso de los seres humanos, las intoxicaciones derivadas de un cianoFAN pueden resultar de la ingesta de mariscos y/o pescado contaminados, inhalación de aerosoles que contengan cianotoxinas y el uso de agua contaminada para consumo (D'Ors de Blas, 2015). Los síntomas que pueden causar en el humano son fiebre, irritaciones dérmicas, enfermedades gastrointestinales, molestias en el tracto respiratorio, reacciones alérgicas en ojos, oídos y garganta, e insuficiencia hepática, en función de la cianotoxina involucrada. Por ello, ahondaremos más en el tema de las toxinas responsables.

### 2.2.2 Cianotoxinas

Los procesos de bioacumulación y biomagnificación toman importancia cuando entramos al tema de las biotoxinas. Las cianotoxinas se dividen en función de su zona de acción en: (1) neurotóxicas: aquellas que atacan directamente el sistema nervioso y pueden causar parálisis en los músculos respiratorios, como las anatoxinas (ANA-a y ANA-a(s)) o las que causan intoxicaciones paralizantes por consumo de mariscos (PSP por sus siglas en inglés) como la saxitoxina (STX) y sus análogos; (2) hepatotóxicas: aquellas que acumulan la sangre en el hígado y conducen a un shock circulatorio fatal, como las microcistinas (MCs) (que consisten de siete aminoácidos) y las nodularinas (NODs) (que consisten de 5 aminoácidos); y (3) citotóxicas: aquellas que dañan las células, sin consecuencias fatales para organismos multicelulares, tales como las cilindrospermopsinas (CYNs) (Carmichael, 1997; Hiller *et al.*, 2007). También se dividen en función de su estructura química en péptidos cíclicos (MCs y NODs) y alcaloides (ANA-a, ANA-a(s), CYNs, lyngbyatoxina-a y STX y sus análogos) (Maciel-Baltazar, 2015; Pérez-Morales *et al.*, 2016; Bouaïcha *et al.*, 2019). A nivel mundial, los cianoFAN de hepatotoxinas son más recurrentes que los de neurotoxinas, puesto que los primeros se han reportado en todos los continentes, mientras que los segundos se han reportado únicamente en América del Norte, Australia y Europa (Carmichael, 1994; WHO, 1999).

Las intoxicaciones en humanos causadas por cianotoxinas suelen ser complicadas de analizar debido a la falta de información con respecto a sus vectores biológicos, así como de las circunstancias que puedan confirmar la presencia de estas toxinas en los alimentos para consumo humano y en los suministros de agua potable. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en Caruaru, Brasil, Carmichael y colaboradores (2001) analizaron muestras del sistema de tratamiento de agua y de tejido hepático de los pacientes de una clínica de diálisis, e identificaron MCs y CYNs. Estas hepatotoxinas causaron insuficiencia hepática aguda, así como la muerte de más de 50 personas por la exposición intravenosa del agua inyectada con microcistinas disueltas. La causa de contaminación con estas toxinas se debió a un mal tratamiento del agua, en el cual no se llevaba a cabo el proceso de ósmosis inversa (Carmichael *et al.*, 2001).

Las cianotoxinas son metabolitos secundarios —ya que no se ha demostrado que sean fundamentales para la supervivencia de las cianobacterias (Carmichael, 1994)— que se producen dentro de la célula, por ello los grandes aportes de cianotoxinas liberadas al medio ambiente suceden por medio de la lisis celular, cuando la célula muere. Estos metabolitos son producto de la formación de ftopigmentos, del desarrollo o del metabolismo celular, y se van acumulando en el citoplasma, por lo que la toxina que se produce en un cuerpo acuático es directamente proporcional a la biomasa de cianobacterias presente (Pérez-Linares, 2003). La toxicidad de las cianotoxinas es específica de cada especie y de la susceptibilidad de las especies afectadas; esto se debe a que su estructura química es muy compleja y particular, lo que hace que los efectos en los organismos afectados varíen de igual manera.

Tal como las plantas vasculares que producen taninos, fenoles, esteroides y alcaloides para defenderse de sus depredadores, algunos estudios sugieren que las cianobacterias producen toxinas para evitar ser consumidas por otras especies planctónicas, como el zooplancton. Son letales, en el caso de las neurotoxinas, o pueden disminuir la cantidad y el tamaño de la descendencia de sus depredadores. Sin embargo, es posible que este efecto de defensa sea accidental, pues es probable que las hepatotoxinas hayan jugado un papel importante en la evolución

de las cianobacterias al regular la proliferación de las células eucariontes, función crítica que se haya perdido en la evolución de estos organismos (Carmichael, 1994).

Sin embargo, es importante mencionar que no todas las especies de cianobacterias son tóxicas. En México, los géneros de cianobacterias productoras de toxinas reportados son: *Anabaenopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum* (prev. *Anabaena*), *Microcystis*, *Nodularia*, *Phormidium*, *Planktothrix* y *Pseudanabaena*, y la mayoría de estos géneros produce más de una toxina (Carmichael, 1994; Maciel-Baltazar, 2015; Pérez-Morales *et al.*, 2016).

La STX y varios de sus análogos actúan directamente bloqueando los canales de sodio regulados por voltaje ( $Na_v$ ), y de esta manera impiden el paso de iones  $Na^+$  al interior de la célula de tejidos excitables y no excitables, lo cual causa parálisis, convulsiones y paros respiratorios en mamíferos (Pérez-Linares, 2003). Por otro lado, la hepatotoxina MC es un potente inhibidor del proceso de mitosis, de la síntesis proteínica, del transporte de calcio, de la contracción muscular y de la señalización celular, entre otros. Es hepatotóxica porque afecta principalmente a las células del hígado, los hepatocitos, lo que causa una deformación hepática (D'Ors de Blas, 2015). Ciertas evidencias sugieren que las cianotoxinas pueden contribuir al desarrollo de cáncer, sin embargo, también se han considerado como tratamientos potenciales para el Alzheimer (Carmichael, 1994). En general, las cianotoxinas son termoestables y estables a los ácidos, por lo que su biodegradación es complicada.

En la actualidad, la detección más precisa de cianotoxinas se hace a través de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) acoplada a un detector de masas; sin embargo, esta detección toma tiempo y es costosa, por lo que, en nuestro país, con el fin de establecer alertas sanitarias de manera rápida, se llevan a cabo otras técnicas, como bioensayos con ratones. No obstante, el uso de esta técnica tiene un alto grado de imprecisión, y no es posible distinguir el tipo de cianotoxina presente. Otro método de detección son los inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), los cuales han probado ser exitosos y tienen la sensibilidad necesaria para identificar NODs y MCs. Por otro lado, las

técnicas espectrofotométricas para medir clorofila-a y el recuento de células son técnicas que se han utilizado únicamente de manera preventiva, pues éstos no dan información acerca de la toxicidad de un florecimiento de cianobacterias (Pérez-Linares, 2003; Maciel-Baltazar, 2015).

El método de cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) se utiliza para detectar, con alta precisión, cianotoxinas de distintos grupos químicos en una única separación cromatográfica, e incluso para muestras de plancton o de agua que tienen un procesamiento mínimo, aunque estas muestras, al tener baja o nula limpieza, pueden resultar en falsos positivos. Este método detecta un amplio intervalo de grupos funcionales o residuos de aminoácidos en ANAs, CYNs, MCs y NODs. También permite realizar una detección rápida de cianobacterias que presuntamente se esperan sean tóxicas, cuya composición taxonómica y cuyo perfil de toxinas son desconocidos (Hiller *et al.*, 2007; Bouaïcha *et al.*, 2019).

Actualmente hay muy pocas guías o normas donde se establezcan los estándares para los niveles permisibles de cianotoxinas en el agua potable, como las que sugiere la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, WHO). La única cianotoxina que tiene establecido un límite máximo permisible en agua potable y en suplementos alimenticios es la microcistina-LR, con  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (WHO, 1999). Hace falta realizar más estudios para establecer límites para las otras cianotoxinas, así como realizar actividades de prevención, manejo y mitigación de los cianoFAN.

### 2.2.3 Identificación molecular

Los FAN de cianobacterias se identifican por su especie dominante, la cual varía espacial y temporalmente. Las especies involucradas se pueden identificar morfológica, molecular, fisicoquímica e inmunológicamente, sin embargo, la identificación morfológica no permite discriminar correctamente entre especies debido a su plasticidad fenotípica, incluso en aquellas que han sido aisladas y mantenidas en condiciones de cultivo. Para realizar una identificación precisa entre especies se utiliza como marcador molecular el gen 16S del RNA ribosomal (rRNA)

(Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010; Pineda-Mendoza *et al.*, 2011). Sin embargo, debido a que los estudios sobre la identificación molecular de cianobacterias, incluso entre cepas, es relativamente joven, aún faltan por realizar más estudios que relacionen las técnicas moleculares con la toxicidad de las especies (Pérez-Linares, 2003).

El marcador universal 16S rRNA se utiliza para estudiar la filogenia y la taxonomía microbiana, ya que se halla en casi todas las bacterias y su función a lo largo del tiempo no ha cambiado. Empero, contiene regiones variables específicas de cada especie, y es lo suficientemente grande (alrededor de 1,500 pares de bases) para realizar análisis bioinformáticos (Janda & Abbott, 2007). Para realizar la metagenómica dirigida al gen 16S rRNA, se extrae el DNA ambiental y se amplifica el gen por PCR usando cebadores diseñados para amplificar la mayor diversidad de secuencias del gen 16S rRNA; no obstante, la identificación de los organismos está limitada a la universalidad de estos cebadores (Techtmann & Hazen, 2016).

Cada vez hay más taxa de bacterias reconocidos a través de la secuenciación del gen 16S rRNA, lo que amplía las bases de datos existentes y facilita la identificación de algún género, incluyendo aquellos organismos que no son cultivables o cuya tasa de crecimiento es baja. Los resultados de varios estudios sugieren que la secuenciación del gen 16S rRNA logra identificar más del 90% de los géneros; sin embargo, identifica entre un 65 y un 83% de las especies, hasta con un 14% no identificadas, por lo que el gen 16S rRNA actualmente se considera útil únicamente hasta el nivel de género (Drancourt *et al.*, 2000; Woo *et al.*, 2003; Mignard & Flandrois, 2006) y tiene un bajo poder filogenético en el nivel de especie.

En 1986, Pace y colaboradores propusieron por primera vez clonar DNA directamente de muestras ambientales para analizar las poblaciones de microorganismos, utilizando la secuenciación *shotgun* del gen 16S rRNA con el DNA purificado. De esta manera, establecieron que se puede recuperar la composición de la comunidad microbiana original (Pace *et al.*, 1986). Posteriormente, en 1998 Handelsman y colaboradores propusieron el término “metagenoma” para los microorganismos ubicados en el suelo que no son cultivables, pero que pueden

proporcionar información para nuevos productos, sobre todo con fines farmacéuticos (Handelsman *et al.*, 1998).

Para la obtención del contenido genómico total de una comunidad de organismos se utiliza la técnica de metagenómica *shotgun*, la cual permite analizar la ecología, la evolución y la diversidad microbiana en una muestra. La metagenómica es el análisis de todos los genomas contenidos en una muestra ambiental, y puede proporcionar información sobre las funciones de los genes analizados, así como de nuevos genes, biocatalizadores, enzimas, moléculas bioactivas o rutas metabólicas (Thomas *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2018). Para llevar a cabo la metagenómica *shotgun*, el DNA ambiental se extrae y se fragmenta para preparar bibliotecas de secuenciación, las cuales determinan el contenido genómico de la muestra. Sin embargo, para obtener un inventario completo de los genes en una muestra ambiental, esta técnica depende de la profundidad de la secuenciación (Teichmann & Hazen, 2016).

La metagenómica *shotgun* se divide en dos: funcional y estructural. La primera tiene como objetivo identificar los genes que codifican una función de interés, mientras que la segunda tiene como objetivo identificar la composición de las poblaciones microbianas y sus relaciones. Este análisis otorga mayor detalle que los que se basan en un solo gen, como el gen 16S rRNA, y para ello el DNA extraído de cada muestra debe ser representativo de todas las células presentes en cada muestra. Sin embargo, el análisis del gen 16S rRNA y los metagenomas son complementarios y permiten determinar el potencial funcional de un microbioma, ya que el primero tiene bases de datos más extensas (Thomas *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2018).

### **3 Área de estudio**

Del 23 al 26 de abril de 2019, durante la época de estiaje, se tomaron muestras en la región hidrológica-administrativa XIII subregión Tula, la cual mide aproximadamente 8,490 km<sup>2</sup> de superficie territorial (Figura 3) (Conagua, 2013). La

toma de muestras comprendió las latitudes 20°26'3" y 19°56'23.8"N y las longitudes 99°23'25" y 99°18'42.7"W, en el estado de Hidalgo.



Figura 3. Subcuencas hidrográficas de región hidrológica-administrativa XIII. Las presas de interés (indicadas con estrellas rojas) se encuentran en la subregión Tula, en las subcuencas Presa Requena, Presa Endhó y Río Alfajayucan. Fuente: Conagua, 2013.

Dentro de la zona de estudio se cuantificaron parámetros fisicoquímicos y se tomaron muestras ambientales de agua de cinco presas asociadas a la subregión

Tula de esta cuenca hidrológica, las cuales están interconectadas a través de ríos o canales de riego (de norte a sur): Vicente Aguirre (también conocida como Zozea), Javier Rojo Gómez, Dolores, Endhó y Requena (Figura 4). Estas presas son parte de una infraestructura hidroagrícola, la cual se construyó para tratar naturalmente el agua residual, transportándola a través de canales de riego y almacenándola en diferentes presas (Cortés-Muñoz *et al.*, 2011).

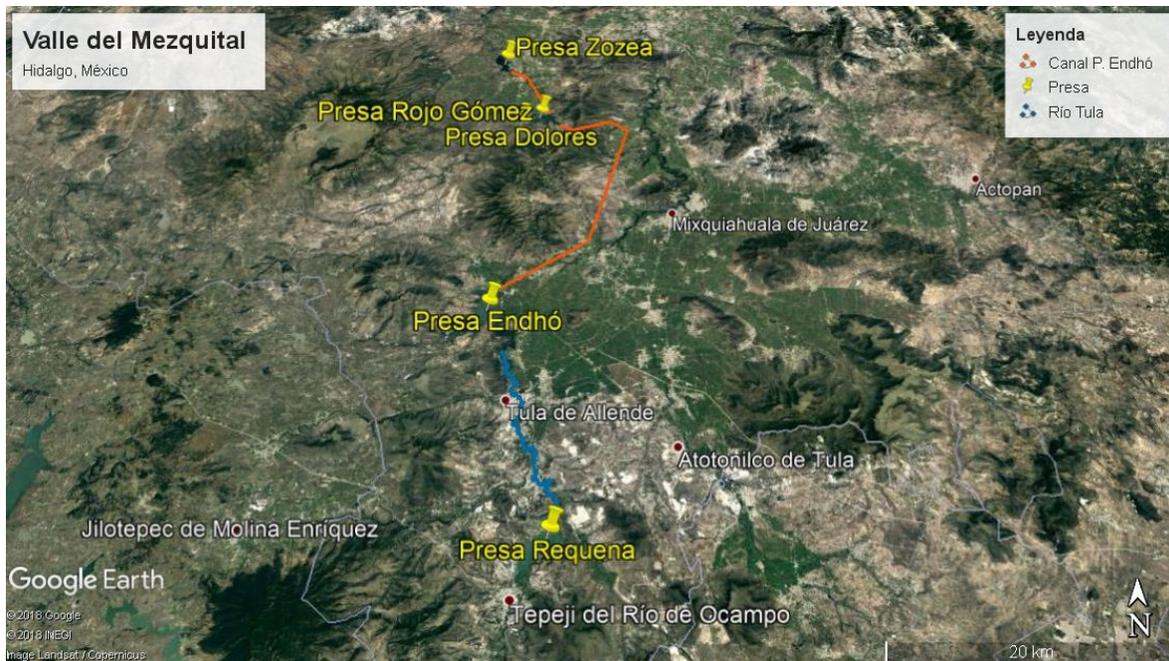


Figura 4. Vista satelital de la zona de estudio. De norte a sur: Zozea, Javier Rojo Gómez, Dolores, Endhó y Requena, así como el curso del río Tula y los canales construidos que llevan las aguas de la presa Endhó hacia el norte, a las presas J. Rojo Gómez y Zozea.

La corriente principal de la presa Requena, la segunda presa más antigua del Valle del Mezquital (construida en 1922, después de la presa Taxhimay) (Peña-García, 2012), es el río Tepeji, el cual recibe las aguas de desecho de industrias textiles y avícolas, así como de la ciudad Tepeji del Río de Ocampo. Sin embargo, tiene la capacidad de depurar por sí misma el agua que recibe, a través de biodegradación y filtración del suelo, y al autodepurarse, lleva esa agua hacia el río Tula a través de las descargas de su cortina (Gómez *et al.*, 2008).

Una vez que el agua de desecho de la Ciudad de México y la ZMCM es recolectada, parte de ella es dirigida hacia el Gran Canal de Desagüe y de ahí parte hacia la presa la presa Endhó (construida en 1951) (Conagua, 2013; Peña-García, 2012). Esta presa tiene más de 40 años recibiendo aguas residuales de la Ciudad de México y la ZMCM, así como el agua que sigue el curso del río Tula (Figura 4). Asimismo, recibe las descargas de agua de la refinería “Miguel Hidalgo” de PEMEX, de la termoeléctrica “Francisco Pérez Ríos” de la Comisión Federal de Electricidad (CFE), de tres plantas cementeras: Cruz Azul, Tolteca-CEMEX y Lafarge (Hernández-Durán, 2018), de la PTAR Atotonilco de Tula y de la Ciudad de Tula, debido a su gran capacidad de agua de 182 hm<sup>3</sup> (Conagua, 2011a). Actualmente presenta problemas por exceso de lirio acuático y, por lo tanto, por presencia del mosquito *Culex pipiens*, así como de la pulga acuática *Daphnia* sp. Debido a su problema de azolve, esta presa no tiene capacidad para autodepurarse (Tabla 1), por lo que sus descargas son de agua de mala calidad. Su agua se utiliza para irrigar zonas de cultivo, principalmente en la región de Alfajayucan, Hidalgo.

La presa Dolores se encuentra a un lado de la presa J. Rojo Gómez, pero a una altura de aproximadamente 40 metros sobre la segunda. Esta presa recibe únicamente aporte de agua pluvial a través de su río, por lo que no tiene contacto con las aguas residuales del río Tula, y sus compuertas, que dan hacia la presa Javier Rojo Gómez, tienen más de ocho años sin ser abiertas. Es una presa donde se realiza acuicultura de tilapia principalmente, la cual es consumida localmente, y es vigilada por su comité de pescadores.

En la subcuenca Alfajayucan, las presas Javier Rojo Gómez y Zozea represan el río Alfajayucan, afluente del norte del río Tula. Asimismo, la presa J. Rojo Gómez está conectada artificialmente con la presa Endhó a través del Canal del Centro, el cual transporta las aguas de la presa Endhó. Posteriormente, las descargas de Rojo Gómez llegan a la presa Zozea, también a través de un canal construido (Figura 4).

Por otro lado, el río Tula llega a la presa Zimapán y de ahí sigue su curso hacia el estado de San Luis Potosí, donde cambia de nombre a río Moctezuma.

Después, cuando este río llega a la frontera entre Veracruz y San Luis Potosí cambia por el nombre de río Pánuco y continúa su curso para desembocar en el Golfo de México. Por este motivo, se le denomina el sistema Tula-Moctezuma-Pánuco.

Tabla 1. Capacidad de almacenamiento y volúmenes de descarga de las presas Endhó, Requena, J. Rojo Gómez y Zozea.

Subcuenca hidrológica	Volumen medio anual de escurrimiento hacia aguas abajo (hm <sup>3</sup> )	Disponibilidad media anual en la subcuenca (hm <sup>3</sup> )	Nombre de la presa	Volumen al NAMO (hm <sup>3</sup> ) de embalses
Presa Requena	49	0.05	Requena	52
Presa Endhó	186	1.38	Endhó	175
Río Alfajayucan	54	1	Javier Rojo Gómez	32
			Zozea	22

NAMO = Nivel de Aguas Máximas Ordinarias, es decir, el máximo nivel al que pueden operar las presas para satisfacer las demandas. Fuente: Conagua, 2013.

#### 4 Hipótesis

La presencia de aguas con altas concentraciones de nutrientes provenientes de aguas residuales de la Ciudad de México y su zona metropolitana favorece el desarrollo de cianobacterias potencialmente tóxicas en las presas asociadas a la subregión Tula, de la región hidrológica-administrativa XIII, especialmente en las presas que reciben estas aguas residuales como la presa Endhó, Javier Rojo Gómez y Zozea. Dada la presencia de una alta concentración de contaminantes en la presa Endhó, la relación entre su baja calidad de agua y la dominancia de cianobacterias tóxicas será directa. Por otro lado, la distribución espacial dentro de cada presa establecerá diferencias en las abundancias de las cianobacterias tóxicas, donde la entrada de los ríos y los centros de las presas tendrán una mayor abundancia de estos organismos que las cortinas.

Por este motivo, será posible identificar estas cianobacterias por métodos moleculares, cultivarlas en condiciones de laboratorio y analizar su producción de toxinas por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem.

## 5 Objetivo general

Identificar por métodos moleculares las especies de cianobacterias potencialmente tóxicas presentes en las presas asociadas al río Tula para establecer el riesgo potencial de su florecimiento y construir una base de conocimiento sobre el fenómeno en el sistema acuático.

## 6 Objetivos particulares

- Obtener las muestras de agua y parámetros fisicoquímicos *in situ* de presas asociadas al río Tula en el estado de Hidalgo.
- Establecer cultivos de cianobacterias potencialmente tóxicas en condiciones de laboratorio en medio líquido BG-11o.
- Identificar molecularmente las especies de cianobacterias presentes en las muestras ambientales de agua, a través de la amplificación del marcador molecular 16S rRNA y de metagenomas.
- Analizar las cianotoxinas presentes en las muestras a través de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).
- Realizar un análisis de componentes principales para identificar si existe una relación entre las especies presentes en las distintas presas con los parámetros fisicoquímicos cuantificados y el tipo de relación que poseen.

## 7 Materiales y métodos

### 7.1 Obtención de muestras y medición de parámetros *in situ*

En abril de 2019 se colectaron muestras de agua subsuperficial (<1 m de profundidad) con botella Van Dorn en cada uno de los embalses y se colocaron en frascos de plástico de 50 y 500 mL. Las muestras se obtuvieron en la entrada de río, en el centro y en la cortina de cada embalse (Figuras 5-9). Se obtuvieron en

total 32 frascos etiquetados con muestras de agua, de los cuales 16, con un volumen de 40 mL c/u, fueron colocados en una hielera con hielo y sal. El resto, con un volumen de 500 mL c/u, fueron inmediatamente filtrados a través de una malla de nylon de 20  $\mu\text{m}$  de luz –con el fin de excluir a la mayoría de los organismos eucariontes, como las clorofitas–, se les agregaron 6 mL de la solución madre concentrada del medio de cultivo BG-11<sub>0</sub> y se conservaron en una hielera equipada con lámparas led con un fotoperiodo 12:12h (luz:oscuridad).

Los parámetros fisicoquímicos se registraron con un multisensor (YSI 556 MPS, Yellow Springs, OH, EE. UU.) en cada punto de muestreo. Estos parámetros fueron: temperatura del agua, pH, oxígeno disuelto, conductividad, sólidos totales y potencial redox. Para medir la profundidad en cada punto de muestreo se utilizó una cuerda con una pesa, marcada cada 10 cm y después del primer metro, marcada cada metro (Tabla 1). La transparencia en cada punto de muestreo se midió con el disco de Secchi. Al término de cada día de muestreo se realizó la medición de ortofosfatos, nitratos y amonio por espectrofotometría (HACH DR/2010, Loveland, CO, EE. UU.). Una vez en el Laboratorio de Química Ambiental del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM (LQA-ICML-UNAM), se cuantificó el fósforo total con el mismo equipo. El uso de este espectrofotómetro se realizó siguiendo las especificaciones del proveedor (métodos 8038 para el amonio, 8039 para el nitrato, 8048 para el ortofosfato y 8190 para el fósforo total).

Los puntos de muestreo de agua subsuperficial en cada presa se muestran en la Tabla 1.

Tabla 2. Puntos de muestreo en cada presa.

Presa	Punto de muestreo	ID	Coordenadas	Profundidad (m)	Transparencia (cm)	Profundidad de la muestra (cm)	Observaciones
Zoeza	Canal construido que descarga el agua de P. J. Rojo Gómez	Z1	20°25'21.7"N, 99°22'01.6"W	2	18	10	–
	Centro	Z2	20°25'54.2"N, 99°22'07.3"W	5	19	10	–
	Cortina	Z3	20°26'03"N, 99°22'22.3"W	7	25	15	–
	<b>Promedio DE</b>			<b>4.7</b> <b>2.5</b>	<b>21</b> <b>4</b>	<b>11.7</b> <b>2.9</b>	
J. Rojo Gómez	Túnel que descarga el agua de P. Endhó	RG1	20°21'06"N, 99°19'01"W	18	260	100	–
	Entrada de río	RG2	20°20'55"N, 99°20'30"W	6	200	100	–
	Centro	RG3	20°21'17"N, 99°19'32"W	5.5	240	100	–
	Cortina	RG4	20°21'25"N, 99°19'13"W	30	300	200	–
<b>Promedio DE</b>			<b>14.9</b> <b>11.6</b>	<b>250</b> <b>42</b>	<b>125</b> <b>50</b>		
Dolores	Entrada de río	D1	20°20'18"N, 99°20'45"W	7.2	20	10	–
	Centro	D2	20°20'22"N, 99°20'49"W	1.3	20	10	–
	Cortina	D3	20°20'37.4"N, 99°20'55.2"W	5.3	15	10	Sus compuertas no han sido abiertas desde hace más de 8 años.
<b>Promedio DE</b>			<b>4.6</b> <b>3</b>	<b>18</b> <b>3</b>	<b>10</b> <b>0</b>		
Endhó	Entrada del río San Miguel	E1	20°07'04"N, 99°23'25"W	4.5	20	10	Río cuyo aporte de agua es la lluvia local y tiene una mejor

Presa	Punto de muestreo	ID	Coordenadas	Profundidad (m)	Transparencia (cm)	Profundidad de la muestra (cm)	Observaciones
	Entrada del río Tula	E2	20°06'55.1"N, 99°22'34.9"W	1.2	10	Subsuperficial	calidad de agua con respecto al resto de la presa. Agua residual que ha recibido tratamiento (al 60%) en la PTAR Atotonilco de Tula mezclada con agua residual de la ciudad de Tula e industrias aledañas que no ha recibido tratamiento.
	Centro	E3	20°08'30"N, 99°21'59"W	25	15	Subsuperficial	–
	Cortina	E4	20°09'19.7"N, 99°21'39.4"W	28	15	Subsuperficial	–
	<b>Promedio DE</b>			<b>14.7</b> <b>13.8</b>	<b>15</b> <b>4</b>	– –	
Requena	Centro	Q1	19°56'23.8"N, 99°19'50.1"W	–	11	Subsuperficial	–
	Cortina	Q2	19°57'46"N, 99°18'42.7"W	–	36	20	–
	<b>Promedio DE</b>			– –	<b>24</b> <b>18</b>	– –	

Nota: En la presa Requena no se logró obtener una muestra de agua de la entrada del río de Tepeji ni medir la profundidad de los dos puntos de muestreo debido a la falta de acceso. DE = Desviación estándar.



Figura 5. Ubicación de los puntos de muestreo en la presa Zozea.



Figura 6. Ubicación de los puntos de muestreo en la presa Javier Rojo Gómez.



Figura 7. Ubicación de los puntos de muestreo en la presa Dolores.



Figura 8. Ubicación de los puntos de muestreo en la presa Endhó.



Figura 9. Ubicación de los puntos de muestreo en la presa Requena.

## 7.2 Establecimiento de cultivos

Se instaló una incubadora con paredes blancas y un foco led de luz blanca de 4W, con intensidad lumínica de  $7.81 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con fotoperiodo de 16:8 h (luz:oscuridad) e intervalo térmico de  $27.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$ , medido con termómetro de mercurio, como condiciones controladas para el crecimiento de las cianobacterias de interés.

Se preparó y se utilizó el medio de cultivo BG-11<sub>0</sub> modificado sin nitratos, para el crecimiento de cianobacterias (Andersen, 2005) (Anexos 1 y 2).

Asimismo, se preparó medio de cultivo BG-11<sub>0</sub> modificado con cicloheximida ( $\geq 95\%$  (HPLC), Sigma), para inhibir la síntesis de proteínas de organismos eucariontes y facilitar el crecimiento de procariontes (Cifuentes *et al.*, 1993; Jacinavicius *et al.*, 2013) (Anexo 3).

El Dr. Eberto Novelo Maldonado apoyó en la identificación morfológica de los cultivos de cianobacterias y en la captura de fotografías en el Laboratorio de Algas Continentales: Ecología y Taxonomía, de la Facultad de Ciencias, UNAM. La identificación se basó en la clave de Komárek, (2013). Las fotografías de los cultivos se capturaron en un microscopio Nikon E600 con contraste interdiferencial y con

una cámara Nikon DXM 1200. La fotografía de la Figura 32 se capturó en el Laboratorio de Ecología del Bentos, en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, sede Ciudad Universitaria, UNAM en un microscopio Zeiss Axio Imager.A2 y con una cámara Lumenera Infinity 1.

### 7.3 Análisis metagenómico

Las muestras ambientales congeladas se analizaron en el Laboratorio de Genómica Microbiana, en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), sede Mazatlán, bajo la supervisión del Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala. Éstas fueron procesadas para la extracción y el análisis de DNA total, conocido como análisis metagenómico, el cual se dividió en dos partes: análisis metagenómico dirigido a amplicones del gen 16S rRNA y análisis metagenómico estructural.

Se extrajo el DNA presente en las muestras de agua por el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés). El DNA obtenido se separó en geles de agarosa al 1% teñida con gel red en buffer TAE 1x como regulador de corrimiento electroforético. Los geles se corrieron durante 30 minutos a 100 V (Enduro 7.7, Labnet, EE. UU.) y las bandas se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta. Posteriormente, para asegurar la pureza del DNA extraído, se revisó que tuviera una concentración de 1.89-2.02 para la relación de absorbancias 260/280 nm con el uso de un espectrofotómetro/fluorómetro (DeNovix DS-11, Wilmington, DE, EE. UU.).

Se llevó a cabo la siguiente metodología para la metagenómica dirigida a amplicones del gen 16S rRNA en las muestras de DNA extraído y puro:

- Se introdujo el DNA puro de las muestras para llevar a cabo la amplificación de la región V3 para el gen 16S rRNA en un termociclador (ThermoFisher ProFlex PCR System, Carlsbad, CA, EE. UU.). Para la mezcla de reacción para la PCR de las muestras se utilizó: regulador de la enzima (1x), 1.5  $\mu\text{L}$  de buffer de la enzima, 0.1  $\mu\text{L}$  de 5 U  $\mu\text{L}^{-1}$  *Taq* polimerasa (ThermoScientific, Carlsbad, CA, EE. UU.), 0.6  $\mu\text{L}$  de dNTP, 1.6  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 8.4  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.6  $\mu\text{L}$  del primer 338f, 0.6  $\mu\text{L}$  del primer 533r y 1  $\mu\text{L}$  de DNA de cada muestra. Las condiciones de la reacción del termociclador fueron: una primera etapa

de desnaturalización inicial a una temperatura de 95°C por 3 min, una segunda etapa que consistió en 35 ciclos: desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 58°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s, y una tercera etapa de extensión final que consistió en una temperatura de 72°C durante 5 min. Al finalizar, el producto se mantuvo a 10°C.

- Una vez que se amplificó la región de interés V3 de las muestras de DNA (la cual contiene entre 110 y 150 pares de bases) para el gen 16S rRNA, se volvieron a separar en geles de agarosa para asegurar una longitud alrededor de 250 pares de bases (pb) en cada muestra.
- Posteriormente, se adicionó un índice a cada muestra amplificada con el objetivo de ser identificada durante la secuenciación *shotgun*.
- Se introdujeron nuevamente al mismo termociclador con nuevas condiciones de reacción: la primera etapa a 95°C durante 2 min, la segunda etapa consistió en 12 ciclos: desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 56°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s, y la tercera etapa a 72°C por 5 min. Al finalizar, el producto se mantuvo a 4°C.
- Se separó el DNA amplificado en la región V3 con índices en geles de agarosa para asegurar que todas las muestras tuvieran una longitud de 300 pb o mayor, y una vez que se obtuvieron, se purificaron con 0.8 µL de perlas magnéticas, de manera que éstas precipitaran todo aquello que tuviera una longitud menor a 300 pb.
- Se lavaron las muestras con etanol al 80% y agua 18 *ohms* para que el DNA se disolviera para su extracción.
- Por último, se cuantificó la concentración del DNA de las muestras (entre 1 y 2 ng µL<sup>-1</sup>) con un fluorómetro (Qubit 2.0 Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) para asegurar que la muestra fuera representativa.

Para la metagenómica estructural (metagenomas) se utilizó la siguiente metodología:

- Se cuantificaron entre 1 y 2 ng µL<sup>-1</sup> del DNA con el fluorómetro para asegurar que las 16 muestras tuvieran la misma concentración. Posteriormente, se

juntaron las muestras (*pool*) de cada presa: se mezclaron las muestras Z1, Z2 y Z3 para crear la muestra *Zozea*, las muestras RG1, RG2, RG3 y RG4 para crear la muestra *Rojo Gómez*, las muestras D1, D2 y D3 para crear la muestra *Dolores*, las muestras E1, E2, E3 y E4 para crear la muestra *Endhó* y las muestras Q1 y Q2 para crear la muestra *Requena*.

- Se volvió a cuantificar entre 1 y 2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  del DNA de cada muestra con el mismo fluorómetro, para asegurar nuevamente que todas tuvieran la misma concentración de DNA.
- Se fragmentó el DNA de cada muestra y, posteriormente, se colocaron índices a cada muestra para ser identificados por el secuenciador.
- Se introdujeron las cinco muestras de DNA fragmentado con índices, así como el control negativo y el control conocido (compuesto por una comunidad bacteriana del Laboratorio de Genómica Microbiana), en el mismo termociclador bajo las siguientes condiciones de reacción: una primera etapa de desnaturalización inicial a 72°C durante 3 min y 95°C por 30 s; una segunda etapa de 18 ciclos que constó de: desnaturalización a 95°C por 10 s, alineamiento a 55°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s; y una tercera etapa a 72°C durante 5 min.
- Finalmente, se purificaron las muestras con 0.6  $\mu\text{L}$  de perlas magnéticas para precipitar todo aquello que tuviera una longitud menor a 400 pb. Se separó el DNA en geles de agarosa y se revisó que las cinco muestras tuvieran al menos 400 pb.

Al terminar la preparación de las 16 muestras del gen 16S rRNA y de las cinco muestras de metagenomas, se colocaron todas en un mismo microtubo, junto con el control negativo y el control conocido, y se corrieron las muestras en el secuenciador Illumina Miniseq (Illumina Inc, San Diego, CA, EE. UU.). Al término de la secuenciación se obtuvieron secuencias del gen 16S rRNA con >20,000 pb y secuencias de metagenomas >1,000,000 pb.

### 7.3.1 Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas se limpiaron y se analizaron en el servidor bioinformático Biobacter del CIAD/Mazatlán.

Para la metagenómica dirigida al gen 16S rRNA, las secuencias pareadas (pair-end) generadas por Illumina se limpiaron, se ensamblaron con el programa PEAR v0.9.8 (Zhang *et al.*, 2014) (para formar secuencias largas (contigs) que puedan formar un genoma) y se eliminaron las secuencias quiméricas (aquellas que tenían menos de 3% de similitud con las secuencias de consulta de la base de datos SILVA\_132) en dicho servidor. Una vez que las secuencias estuvieron limpias, se analizaron y se clasificaron de acuerdo con la base de datos EzBioCloud-LGM 2018. Durante el análisis bioinformático se obtuvieron los índices alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) de cada muestra de metagenómica dirigida al gen 16S rRNA y se realizó el modelo de rarefacción para las comunidades bacterianas identificadas en cada punto de muestreo con el software PAST v. 3.25 (Hammer *et al.*, 2011).

Para clasificar todos los metagenomas, las secuencias pair-end Illumina obtenidas se limpiaron con el kit Nextera (Figuras 11 y 13) y se ensamblaron para la obtención de contigs con MEGAHIT v1.2.2-beta. Una vez que se obtuvieron los contigs de las cinco muestras de metagenomas, se analizaron con el programa Anvi'o 5.5. y se clasificaron de acuerdo con la base de datos ProGenomes (que contiene 25,038 genomas bacterianos y de arqueas) a través del clasificador taxonómico Kaiju.

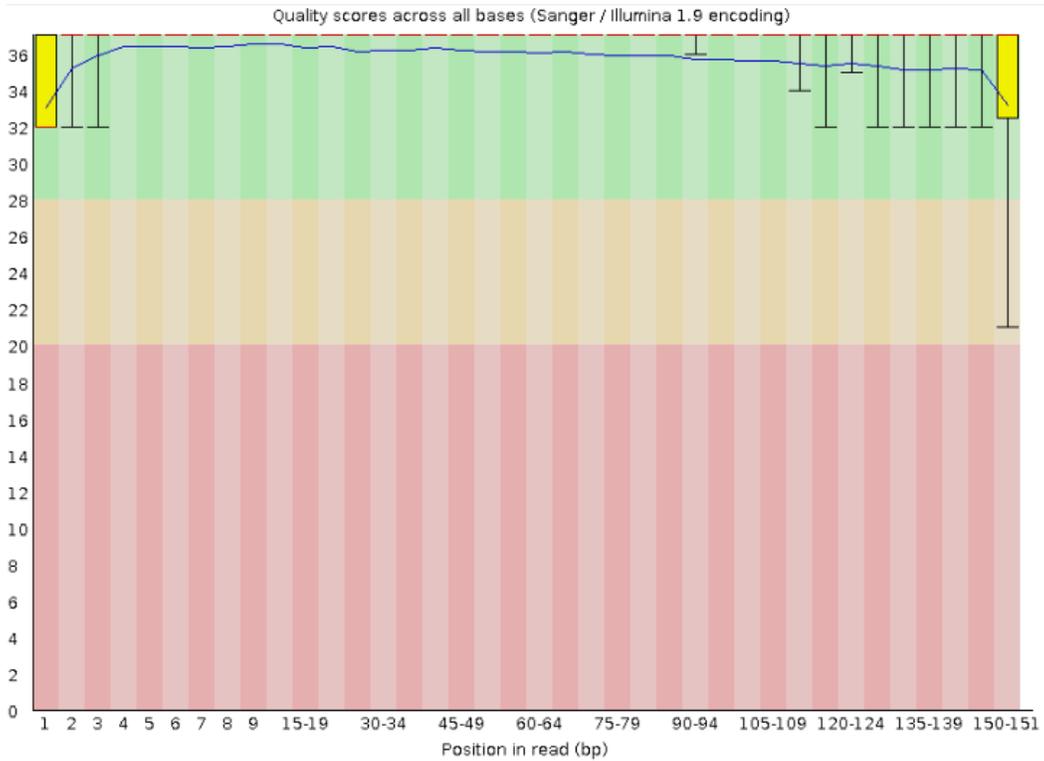


Figura 10. Secuencia del metagenoma de la presa Endhó antes de la limpieza. Se observa que los primeros y los últimos pb tienen una menor calidad. La zona verde indica buena calidad, la zona amarilla indica calidad regular y la zona roja indica mala calidad de las pb.

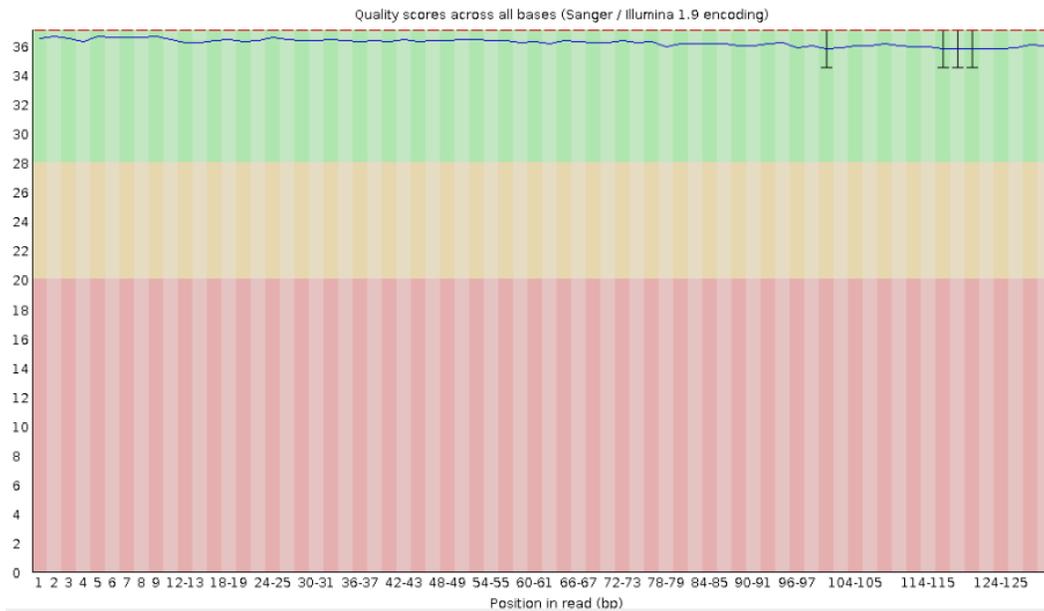


Figura 11. Secuencia del metagenoma de la presa Endhó después de la limpieza. El kit Nextera cortó y eliminó las primeras y las últimas pb que se observan en la Figura 10. Nótese que el tamaño inicial de 150 pb de la secuencia disminuyó a un tamaño de 125 pb.

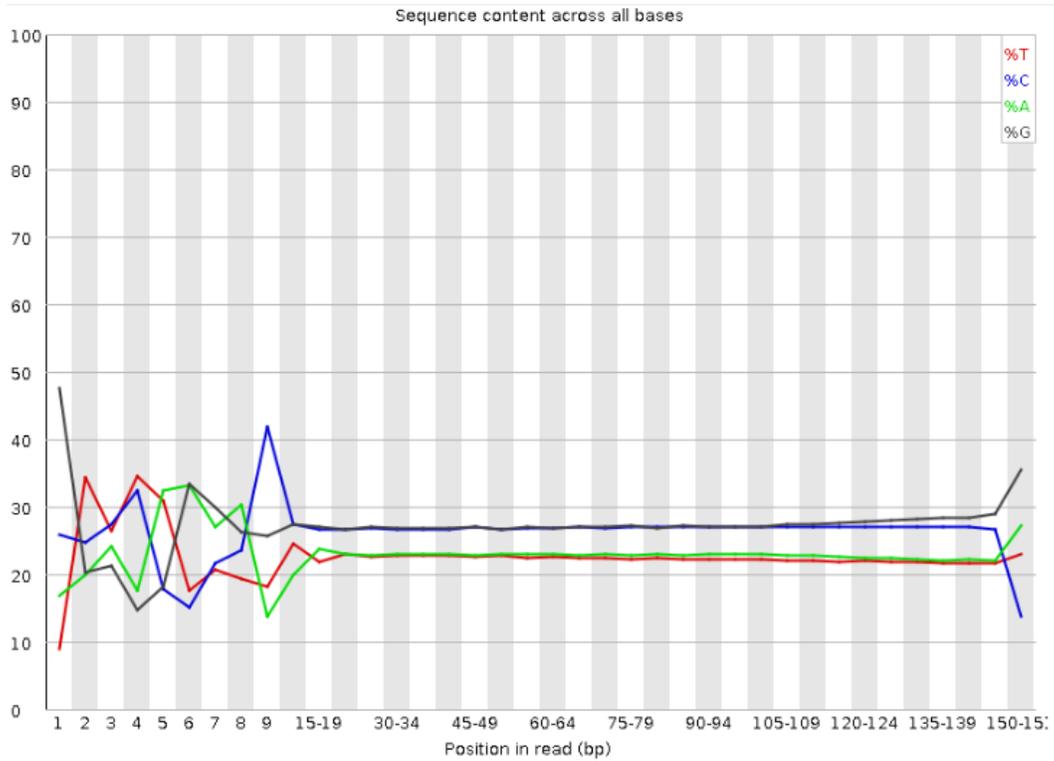


Figura 12. Secuencia del metagenoma de la presa Endhó con los porcentajes de bases nitrogenadas del DNA antes de la limpieza. Se observa que los primeros 20 pb, así como los últimos 10 pb (a partir del pb 140) podrían generar ruido durante el análisis del metagenoma, ya que se trata de adaptadores generados por el kit Nextera de Illumina.

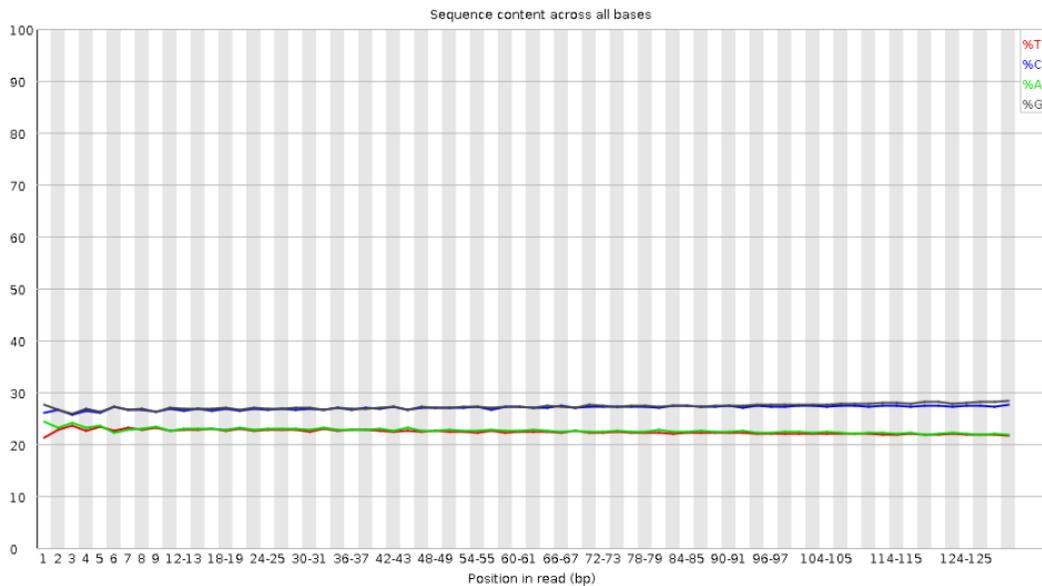


Figura 13. Secuencia del metagenoma de la presa Endhó después de la limpieza.

#### 7.4 Análisis de toxinas

Se filtró un matraz de 50 mL que contenía el único cultivo puro obtenido de cianobacterias (correspondiente al punto de muestreo Z3) en dos filtros de microfibra de vidrio Whatman GF/F de 0.7  $\mu\text{m}$  de poro, con una bomba de vacío. Se liofilizaron las muestras durante 24 horas en el Laboratorio Conjunto del Instituto de Ecología de la UNAM con el Dr. Marco Tulio Solano de la Cruz y posteriormente se enviaron para su análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) al *Centre for Environment Fisheries and Aquaculture Science* (CEFAS), en Reino Unido, con el Dr. Andrew Turner.

La preparación de las muestras para LC-MS/MS consistió en la extracción de uno de los filtros en metanol al 80% para el análisis de MCs y NODs y del otro en ácido acético al 1% para el análisis de toxinas hidrofílicas como STX, ANA-a y CYNs.

#### 7.5 Análisis de componentes principales (PCA)

Para el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) se utilizó el software de libre acceso RStudio v. 3.4.2 (RStudio Team, 2020), con el paquete *vegan* 2.5-4, el cual permite realizar análisis ecológicos.

Debido a que se relacionaron los parámetros fisicoquímicos (conductividad, oxígeno disuelto, pH, potencial redox, salinidad, sólidos totales disueltos, temperatura, transparencia, amonio, fósforo total, nitratos y ortofosfatos) con las abundancias de los phyla procariontes (Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria y Verrucomicrobia) y eucariontes (Euglenozoa, Heterokonta y Viridiplantae), todos las variables se escalaron a log normal, ya que los phyla no se distribuyen de manera normal.

Se realizó el modelo de *Broken Stick* para observar los ejes que representarían la mayor varianza o variabilidad de los datos. Posteriormente, se graficaron las variables por métodos de correlación de acuerdo con los componentes principales seleccionados.

## 8 Resultados y Discusión

### 8.1 Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos de interés para este estudio (Tabla 3) mostraron variación espacial, ya que se colectaron en diferentes puntos dentro de cada presa; no obstante, no se analizó la variación temporal, debido a que el muestreo se llevó a cabo en una única ocasión durante la época de estiaje. Por lo tanto, es importante destacar que los resultados obtenidos sólo representan las condiciones de las presas en el momento en que se obtuvieron las muestras. De igual manera, es importante resaltar que, de acuerdo con uno de los trabajadores del comité de vigilancia, la presa Endhó no estaba recibiendo las descargas de aguas residuales de la CDMX y ZMCM que suele recibir, debido a que era época de estiaje.

La temperatura promedio del agua registrada en las cinco presas fue de  $19.66 \pm 0.78^{\circ}\text{C}$  (Figura 15), sin embargo, debido a la capacidad de muestreo, cada una de estas temperaturas se cuantificaron en diferentes horarios: en Dolores a la 1 pm, en Endhó a las 9:30 am, en J. Rojo Gómez a las 9 am, en Requena a las 15:10 pm y en Zozea a las 10:30 am, aproximadamente. Se observaron ligeros cambios térmicos con una tendencia a la disminución de la temperatura del agua de las entradas de los ríos hacia las cortinas de cada presa (Tabla 3). Estas temperaturas se encuentran dentro del límite máximo permisible de  $40^{\circ}\text{C}$  de la NOM-001-SEMARNAT-1996, la cual establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales.

La transparencia promedio fue de  $20 \pm 0.05$  cm, con excepción de la presa J. Rojo Gómez, la cual presentó una mayor profundidad de la zona fótica, con un promedio de 2.5 m (Figura 14). Estos valores de transparencia concuerdan con los obtenidos por Rubio-Franchini y colaboradores (2016), valores típicos de un ecosistema con contaminación moderada por materia orgánica o eutrofización (Rubio-Franchini *et al.*, 2016). Asimismo, se observa una tendencia al aumento en la profundidad desde las entradas de los ríos hacia las cortinas de las presas (Tabla 2).

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos *in situ*.

Presa	ID	Ubicación en la presa	Transparencia (m)	Temperatura (°C)	pH	Oxígeno disuelto (mg·L <sup>-1</sup> )	Conductividad (mS·cm <sup>-1</sup> )	STD (g·L <sup>-1</sup> )	Potencial redox (mV)	Salinidad (‰)
Requena	Q1	Centro	0.11	20.9	8.6	-*	0.324	0.232	648.2	0.17
	Q2	Cortina	0.36	19.7	8.2	-*	0.248	0.215	634	0.16
		<b>Promedio</b>	<b>0.24</b>	<b>20.30</b>	<b>8.40</b>	<b>-*</b>	<b>0.29</b>	<b>0.22</b>	<b>641.10</b>	<b>0.17</b>
		<b>DE</b>	<b>0.18</b>	<b>0.85</b>	<b>0.28</b>	<b>-</b>	<b>0.05</b>	<b>0.01</b>	<b>10.04</b>	<b>0.01</b>
Endhó	E1	Entrada río San Miguel	0.2	19.16	8.13	4.2	1.479	1.081	627	0.84
	E2	Entrada río Tula	0.1	19.4	7.3	-*	1.88	1.37	601.5	1.09
	E3	Centro	0.15	18.7	8.1	5.25	1.467	1.08	591.3	0.85
	E4	Cortina	0.15	18.3	8.03	-*	1.45	1.087	560.5	0.85
		<b>Promedio</b>	<b>0.15</b>	<b>18.89</b>	<b>7.89</b>	<b>4.73</b>	<b>1.57</b>	<b>1.15</b>	<b>595.08</b>	<b>0.91</b>
	<b>DE</b>	<b>0.04</b>	<b>0.49</b>	<b>0.40</b>	<b>0.74</b>	<b>0.21</b>	<b>0.14</b>	<b>27.51</b>	<b>0.12</b>	
Dolores	D1	Entrada de río	0.2	21.16	7.94	4.8	0.303	0.214	677.3	0.16
	D2	Centro	0.2	19.63	7.87	5.94	0.294	0.213	683.5	0.16
	D3	Cortina	0.15	18.4	7.51	4.45	0.289	0.214	689.5	0.16
		<b>Promedio</b>	<b>0.18</b>	<b>19.73</b>	<b>7.77</b>	<b>5.06</b>	<b>0.30</b>	<b>0.21</b>	<b>683.43</b>	<b>0.16</b>
	<b>DE</b>	<b>0.03</b>	<b>1.38</b>	<b>0.23</b>	<b>0.78</b>	<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	<b>6.10</b>	<b>0.00</b>	
J. Rojo Gómez	RG1	Descargas de P. Endhó	2.6	18.74	7.55	2.51	1.021	0.754	692.9	0.58
	RG2	Entrada de río	2	19.09	7.76	1.37	1.039	0.758	597.9	0.58
	RG3	Centro	2.4	18.95	7.8	1.42	1.026	0.755	582.5	0.58
	RG4	Cortina	3	18.89	7.88	1.41	1.025	0.754	644.2	0.58
		<b>Promedio</b>	<b>2.50</b>	<b>18.92</b>	<b>7.75</b>	<b>1.68</b>	<b>1.03</b>	<b>0.76</b>	<b>629.38</b>	<b>0.58</b>
	<b>DE</b>	<b>0.42</b>	<b>0.15</b>	<b>0.14</b>	<b>0.56</b>	<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	<b>49.81</b>	<b>0.00</b>	
Zoea	Z1	Descargas de presa J. Rojo Gómez	0.18	20.01	9	3.91	0.937	0.676	681	0.52
	Z2	Centro	0.19	20.77	9.16	2.47	0.949	0.67	673	0.51
	Z3	Cortina	0.25	20.55	9.07	2.22	0.947	0.672	681.9	0.51
		<b>Promedio</b>	<b>0.21</b>	<b>20.44</b>	<b>9.08</b>	<b>2.87</b>	<b>0.94</b>	<b>0.67</b>	<b>678.63</b>	<b>0.51</b>
		<b>DE</b>	<b>0.04</b>	<b>0.39</b>	<b>0.08</b>	<b>0.91</b>	<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	<b>4.90</b>	<b>0.01</b>

\*El oxígeno disuelto no se logró cuantificar en algunos puntos debido a fallas técnicas con el equipo y a fuertes vientos. DE = desviación estándar.

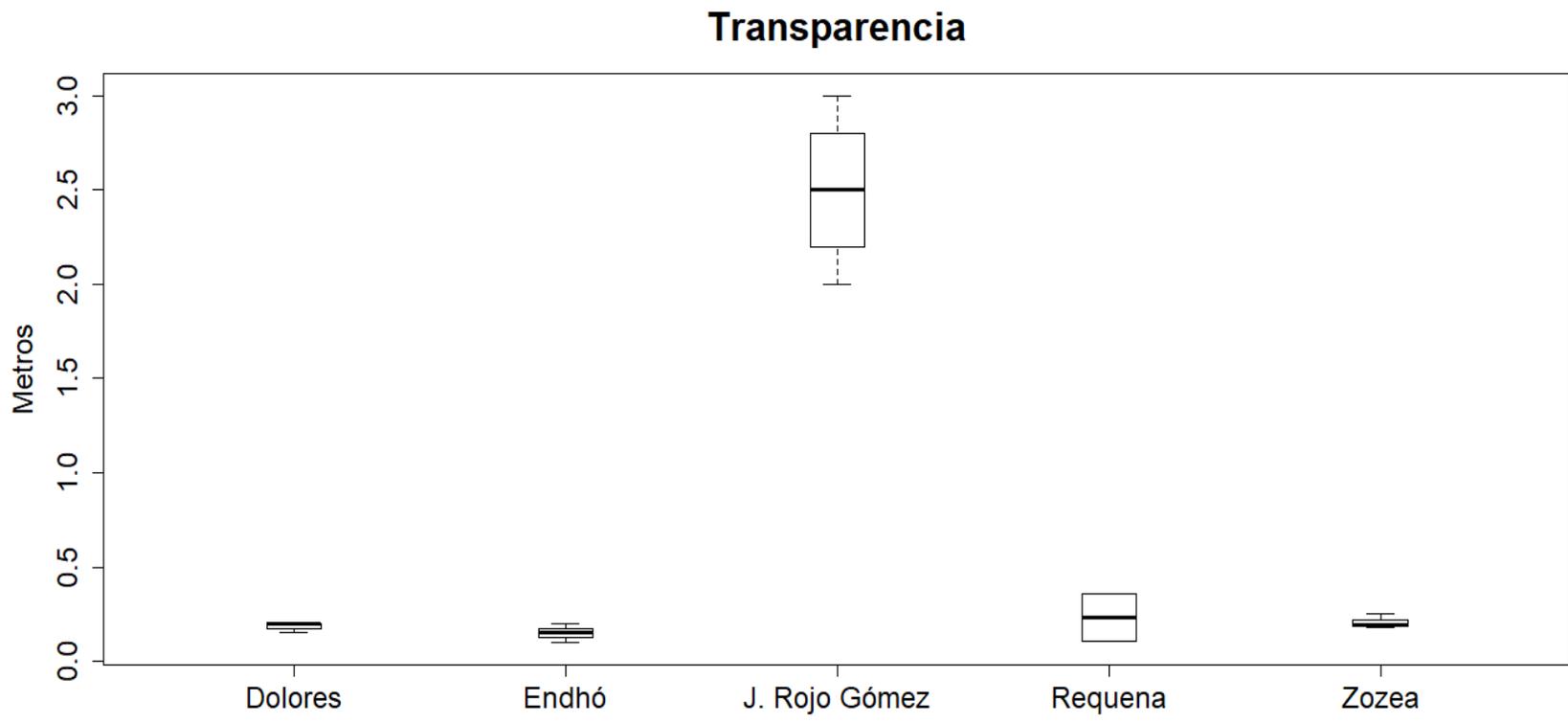


Figura 14. Comparación de la transparencia de las presas en función de la profundidad, de acuerdo con sus medianas y la dispersión de sus valores.

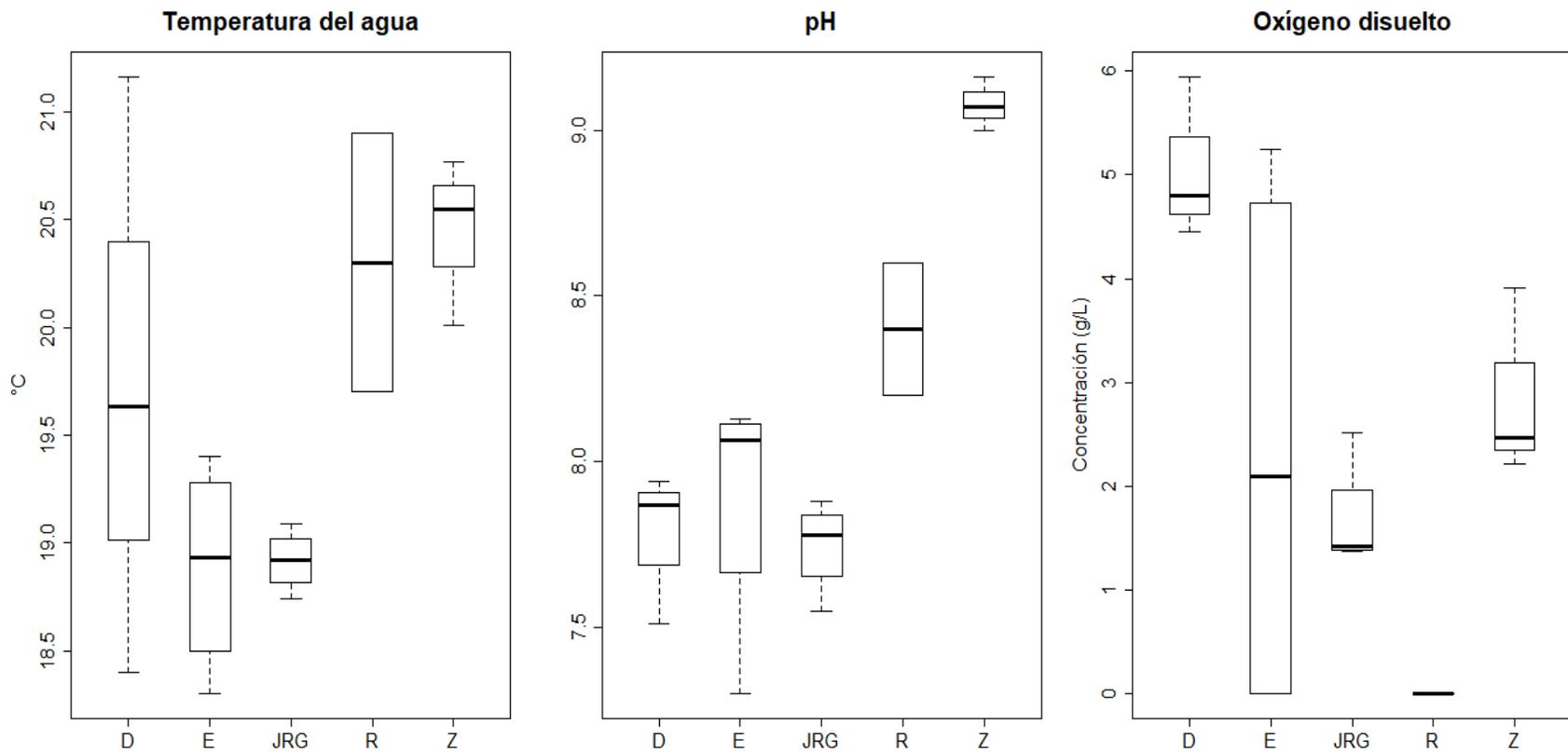


Figura 15. Temperatura del agua, potencial de hidrógeno (pH) y oxígeno disuelto de las presas, de acuerdo con sus medianas y la dispersión de sus valores.

La toma de temperatura se realizó en los siguientes horarios: D 1:00 pm, E 9:30 am, JRG 9:00 am, R 15:10 pm, Z 10:30 am.

D = Dolores, E = Endhó, JRG = J. Rojo Gómez, R = Requena, Z = Zozea

El pH osciló entre 7.8 y 9.1, siendo, en promedio, menor en J. Rojo Gómez y mayor en Zozea (Figura 15). El valor de pH más bajo se encontró en el punto E2 con 7.3 y el más alto en el punto Z2 con 9.2. Estos valores están dentro de los límites permisibles de pH (entre 5 y 10 unidades), de acuerdo con la NOM-001-SEMARNAT-1996. Sin embargo, existe una tendencia hacia la basicidad en las presas, característica de las descargas de aguas residuales (Montelongo-Casanova *et al.*, 2008).

La menor concentración de oxígeno disuelto se detectó en el punto RG2, con  $1.4 \text{ mg L}^{-1}$ , y su mayor concentración en el punto D2, con  $5.9 \text{ mg L}^{-1}$ , sin embargo, debido a fallas técnicas con el equipo y fuertes vientos no fue posible cuantificar este parámetro en la presa Requena ni en los puntos E2 y E4. La medición de oxígeno disuelto es importante, ya que indica el grado de contaminación y/o degradación de materia orgánica y el nivel de autodepuración (proceso natural de los cuerpos de agua para restablecer las condiciones ecológicas, y se relaciona con la capacidad de asimilación de contaminantes en sistemas acuáticos. Se puede basar en las tasas de desoxigenación, de reaireación, de sedimentación, de decaimiento de patógenos y de remoción de materia particulada (Rivera-Gutiérrez, 2016)). Las concentraciones menores a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  pueden afectar de manera negativa el funcionamiento y la supervivencia de las comunidades biológicas, y las condiciones por debajo de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  causan mortandad de la mayoría de los peces.

De las cuatro presas en las que se cuantificó el oxígeno disuelto, la presa Dolores fue la única que presentó niveles relativamente adecuados para la biota acuática, ya que no recibe descargas de aguas residuales ricas en materia orgánica y nutrientes, las cuales conducen a una disminución del oxígeno disuelto como resultado de la respiración microbiana y la descomposición de la materia orgánica (WHO, 1996). La baja concentración de oxígeno disuelto causa alarma, ya que en la presa Zozea, en donde han ocurrido muertes de peces debido a condiciones de hipoxia, hay estaciones piscícolas que ponen a la venta sus peces, y en la presa J. Rojo Gómez hay actividades de pesca para consumo local. En cuanto a la presa Endhó, la falta de medición en los otros dos puntos dio un promedio de  $4.7 \pm 0.6 \text{ mg L}^{-1}$ , mayor que en las presas J. Rojo Gómez y Zozea; sin embargo, se esperaba un

promedio más bajo, ya que desde hace 40 años no se practica la pesca en este lugar debido a que no se ha detectado presencia de peces. Por ello, se recomienda realizar muestreos más frecuentes para monitorear los cambios de este parámetro en las presas.

La conductividad más alta se detectó en la presa Endhó, con  $1.6 \text{ mS cm}^{-1}$  y la más baja en la presa Requena, seguida por la presa Dolores con valores de  $0.29$  y  $0.3 \text{ mS cm}^{-1}$ , respectivamente (Figura 16). De acuerdo con los límites propuestos por la OMS para cuerpos de agua epicontinentales, la conductividad debe encontrarse entre  $0.01$  y  $1 \text{ mS cm}^{-1}$ ; por arriba de  $1 \text{ mS cm}^{-1}$  el ecosistema se considera contaminado o es un indicador de que recibe grandes cantidades de escorrentía (WHO, 1996), caso observado en las presas Endhó y J. Rojo Gómez (Figura 16).

La conductividad se relaciona con la concentración de iones y de sólidos totales disueltos (STD), los cuales son materiales solubles orgánicos e inorgánicos que comúnmente provienen del vertido de aguas residuales y para los cuales no se han establecido límites máximos permisibles (WHO, 1996; Breton-Deval *et al.*, 2019). Los STD mostraron una concentración máxima de  $1.087 \text{ g L}^{-1}$  en el punto E4 y una concentración mínima de  $0.213 \text{ g L}^{-1}$  en el punto D2 (Tabla 3), comportamiento similar al que tuvo la salinidad (Figura 16), con concentración máxima de  $1.09\text{‰}$  en el punto E2 y mínima de  $0.16\text{‰}$  en los tres puntos de la presa Dolores (D1, D2 y D3) y Q2.

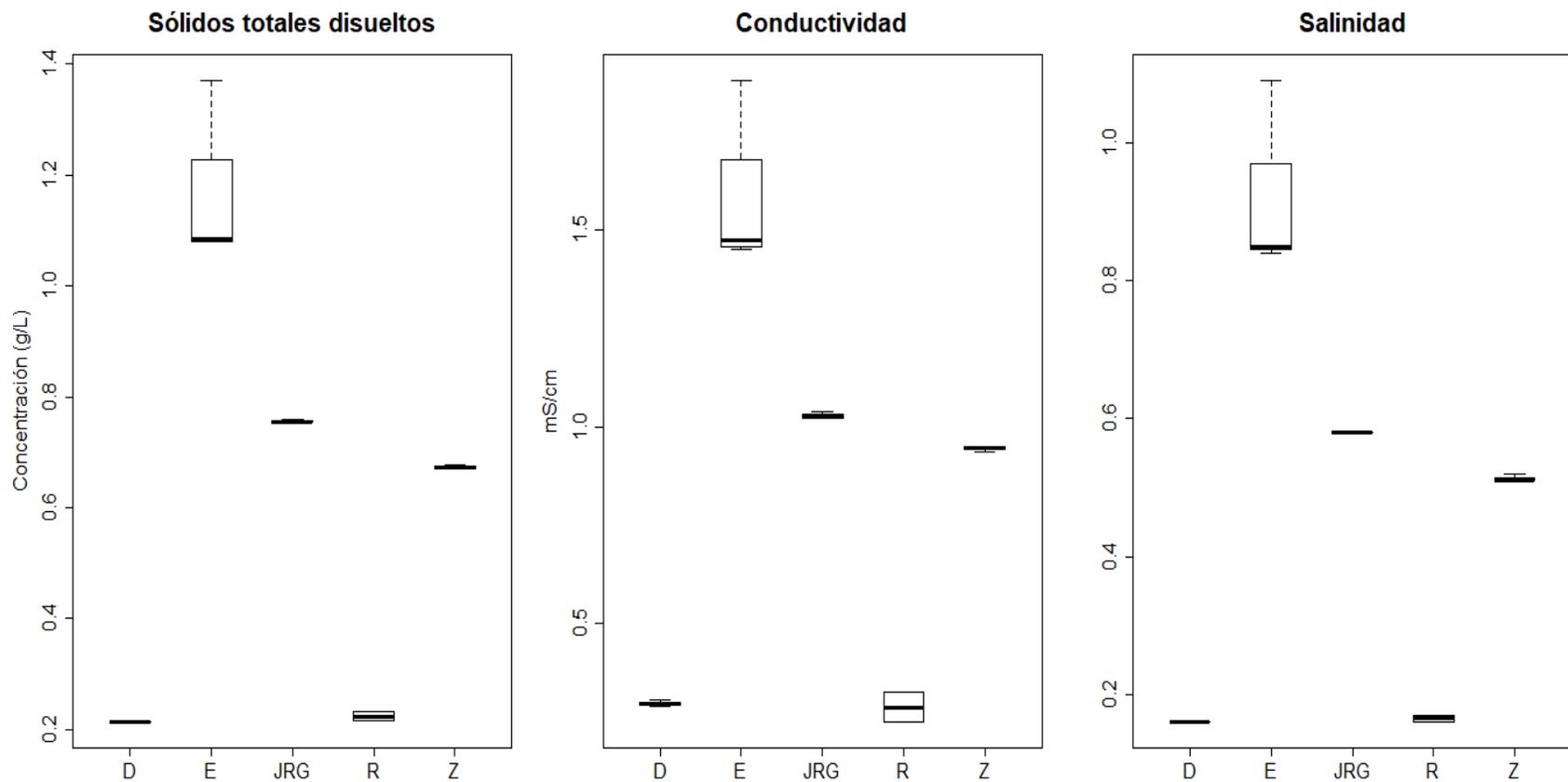


Figura 16. Sólidos totales disueltos, indicadores del nivel de contaminación, conductividad y salinidad de las presas, de acuerdo con sus medianas y la dispersión de sus valores.

D = Dolores, E = Endhó, JRG = J. Rojo Gómez, R = Requena, Z = Zozea

En la mayoría de los casos se observa una tendencia a la disminución en los parámetros fisicoquímicos (pH, oxígeno disuelto, conductividad, STD, potencial redox y salinidad) de las entradas de los ríos hacia las cortinas (Tabla 3). No obstante, con estos datos no se puede concluir sobre el comportamiento de la circulación de las aguas y cómo ésta influye en las condiciones ambientales, debido a que se requiere más información espacial y temporal.

La temperatura del agua es el principal factor que afecta los equilibrios fisicoquímicos y las reacciones biológicas en los ecosistemas acuáticos, ya que la velocidad de una reacción química es dos veces mayor con un aumento de temperatura de 10°C (Delpla *et al.*, 2009). En aguas cálidas, la tasa de respiración de la biota aumenta, lo que genera un incremento en el consumo de oxígeno, y con ello, una mayor descomposición de la materia orgánica. Asimismo, las altas temperaturas en el agua causan que las tasas de crecimiento aumenten, tanto de bacterias como del fitoplancton, lo que provoca una mayor turbidez en las aguas (WHO, 1996). En el caso de Requena, Endhó, J. Rojo Gómez y Zozea se observó una turbidez que se puede relacionar con la gran cantidad de materia orgánica proveniente de las aguas residuales, así como a la comunidad microbiana. En el caso de la presa Dolores, la turbidez observada se podría deber a la poca profundidad de la presa, así como a la materia orgánica suspendida, proveniente de la escorrentía natural.

La disolución de sales y gases disueltos, la degradación de la materia orgánica, la difusión de contaminantes y la evaporación, por mencionar algunos procesos, están directamente relacionados con la temperatura del agua. A mayor temperatura, mayor disolución de sales y menor concentración de gases, tales como CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> (Prathumratana *et al.*, 2008; Van Vliet & Zwolsman, 2008). En el caso de este último, su concentración de saturación disminuye cerca del 10% cuando la temperatura del agua aumenta en 3°C. El incremento de temperatura también puede incrementar el pH del agua, debido a la disminución del CO<sub>2</sub> disuelto (Delpla *et al.*, 2009). Este proceso se observó en todas las presas, con excepción de Dolores, siendo las presas Zozea y Requena las de mayor temperatura y las de mayor pH (Figura 15).

El incremento de la temperatura global debido al cambio climático acelerado por la liberación de gases de efecto invernadero, producto de las actividades humanas, puede conducir a nuevos patrones en la cantidad y la calidad del agua superficial de sistemas lóticos y lénticos (Prathumratana *et al.*, 2008), al disminuir el número de eventos de precipitación, pero aumentando la intensidad de estos eventos en países templados, o bien, en eventos de sequías más prolongados para los países en latitudes medias o bajas. Las inundaciones aumentarán los escurrimientos de agua y la cantidad de material sólido transportado, mientras que las sequías causarán una concentración mayor de sustancias disueltas en el agua (Bates *et al.*, 2008), lo que degradará su calidad. Asimismo, los cuerpos de agua poco profundos son los más vulnerables al cambio climático (Delpla *et al.*, 2009). Por lo tanto, una reducción hídrica en la cuenca de la subregión Tula como consecuencia de estos cambios en el ciclo del agua, podría provocar el incremento en la concentración de ciertos compuestos químicos, ya que la cuenca hidrológica se encuentra en una zona semiárida.

En la Tabla 4 se muestran los nutrientes inorgánicos (P- $\text{PO}_4^{3-}$ , N- $\text{NO}_3$ , N- $\text{NH}_4$  y fósforo total (PT)) cuantificados de las muestras de agua. De manera general, se observa una mayor concentración de los nutrientes en la presa Endhó y una menor concentración en la presa Dolores (Figura 17). Los ortofosfatos (P- $\text{PO}_4^{3-}$ ) tuvieron su máxima concentración en el punto RG1 con  $4.85 \text{ mg L}^{-1}$  y su mínima en el punto D2 con  $0.11 \text{ mg L}^{-1}$ . Los nitratos (N- $\text{NO}_3$ ) se presentaron en mayor concentración en el punto E4 con  $2.7 \text{ mg L}^{-1}$  y en menor concentración en el punto Z2 con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que en el caso del amonio (N- $\text{NH}_4\text{-N}$ ) su concentración más alta fue en el punto E4, con  $17.5 \text{ mg L}^{-1}$ , y la más baja en el punto Z2, con  $0.27 \text{ mg L}^{-1}$ . Por último, el fósforo total (PT) se presentó en mayor concentración en el punto E2, con  $15.05 \text{ mg L}^{-1}$  y en menor concentración en el punto D1, con  $0.79 \text{ mg L}^{-1}$ .

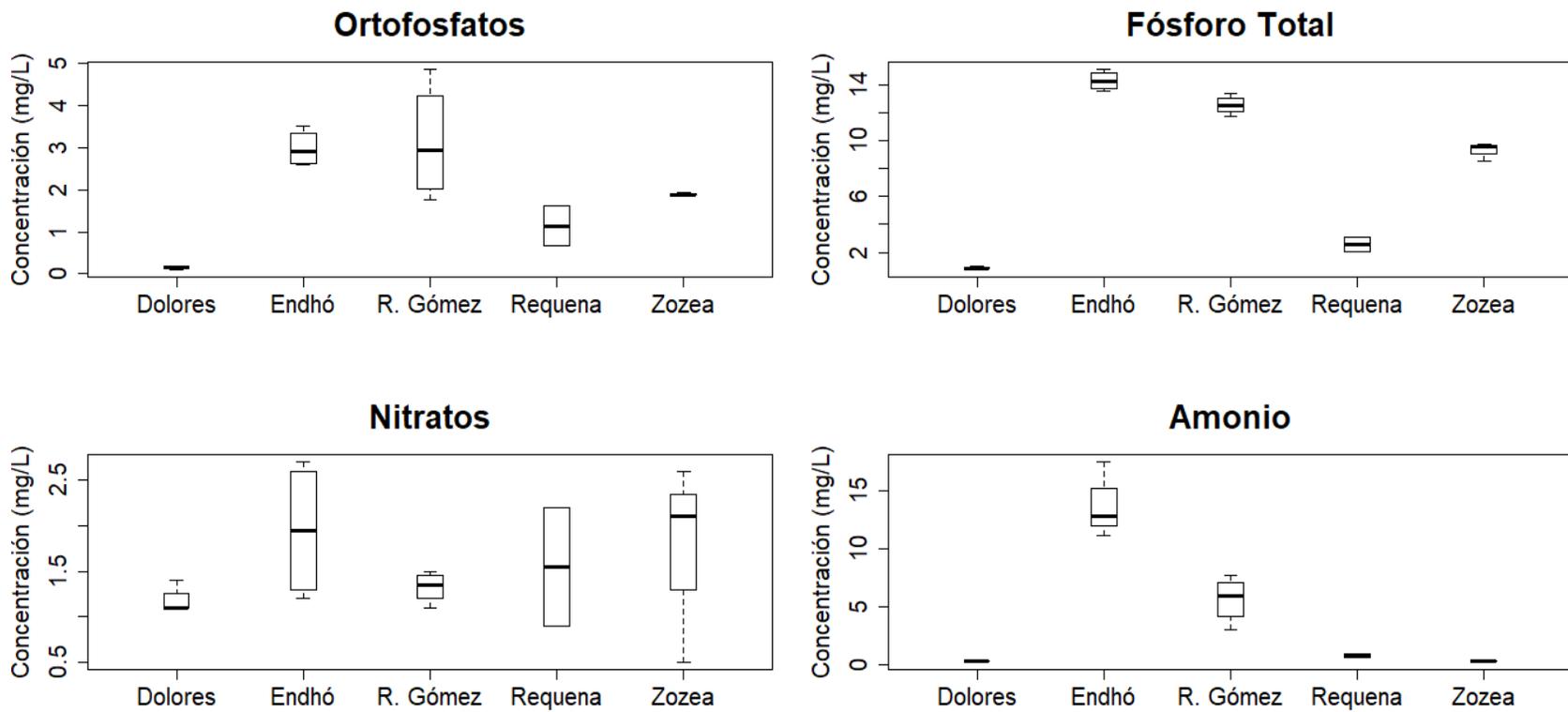


Figura 17. Comparación de los cuatro nutrientes cuantificados en las presas, de acuerdo con sus medianas y la dispersión de sus valores.

Las fuentes naturales de nitrógeno en aguas superficiales son la escorrentía de suelos y los detritus animales y vegetales, y su concentración no suele exceder de  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ . No obstante, esta concentración aumenta debido a los fertilizantes nitrogenados y las aguas residuales domésticas e industriales, incluyendo los lixiviados de zonas de eliminación de desechos y rellenos sanitarios. Las concentraciones de nitrato mayores a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  indican contaminación por desechos animales (incluyendo humanos) y/o por escorrentía de fertilizantes (WHO, 1996; Breton-Deval *et al.*, 2019). Por lo tanto, las presas no se pueden considerar contaminadas, ya que todas se encontraron por debajo de los  $5 \text{ mg L}^{-1}$  para estos sitios de muestreo y en esta única fecha. Sin embargo, se requieren más estudios espaciales y temporales en cada uno de los sistemas.

El amonio existe de manera natural en los cuerpos de agua debido a la descomposición de la materia nitrogenada en el suelo y el agua, y a las excretas de los organismos. De manera artificial se descarga como producto de procesos industriales y como componente de aguas residuales domésticas (WHO, 1996), por lo que la concentración más alta de este nutriente se registró en la presa Endhó. Por otro lado, el amonio se puede volatilizar considerablemente con un aumento del pH (WHO, 1996), proceso que se observa en algunas presas. Por ejemplo, la presa Zozea registró el mayor pH (9.1) y presentó la menor cantidad de amonio ( $0.3 \text{ mg L}^{-1}$ ); un caso similar se encontró en la presa Requena, con el segundo pH más alto (8.4) y una baja concentración de amonio ( $0.8 \text{ mg L}^{-1}$ ). Los cuerpos de agua sin contaminación tienen bajas concentraciones de amonio, como en el caso de la presa Dolores ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ). Las concentraciones de amonio mayores a  $3 \text{ mg L}^{-1}$  indican contaminación orgánica por aguas residuales domésticas e industriales y la escorrentía de fertilizantes (WHO, 1996), concentraciones que se observan en las presas Endhó y J. Rojo Gómez; sin embargo, hace falta seguimiento.

El fósforo se encuentra en los cuerpos de agua en forma de ortofosfatos y polifosfatos disueltos, así como fosfatos unidos orgánicamente. Los cambios entre estas formas de fósforo ( $\text{P-PO}_4$ ) ocurren por la descomposición y la síntesis entre formas inorgánicas oxidadas y orgánicas. Las fuentes naturales de fósforo en los sistemas acuáticos son la erosión de rocas que contienen fósforo y la

descomposición de la materia orgánica. Estas concentraciones naturales aumentan con las descargas de aguas residuales domésticas (especialmente aquellas que tienen detergentes ricos en fosfatos, como algunos detergentes (Richards *et al.*, 2015)), industriales y de fertilizantes. Sus concentraciones naturales en aguas superficiales van de los 0.005 a los 0.020 mg L<sup>-1</sup> P-PO<sub>4</sub> (WHO, 1996), niveles que fueron superados en todas las presas. No obstante, no existen límites establecidos para las cargas de este nutriente en los sistemas lénticos, ya que la sensibilidad de estos sistemas depende de la productividad del lago. Los lagos oligotróficos, por ejemplo, son más sensibles a pequeños aportes de fósforo y a su potencial de eutrofización que los lagos eutróficos (Scholz *et al.*, 2015; Arellano-Aguilar *et al.*, 2016).

Los compuestos fosfatados que se utilizan para la producción de fertilizantes (82%), cultivos para el ganado (5%), aditivos alimentarios (2-3%) y detergentes (~10%), se obtienen de los depósitos de roca fosfórica, un recurso no renovable que ha sido fuertemente explotado (Neset & Cordell, 2012). Si se recuperara el fósforo disuelto en las aguas residuales proveniente de la orina y de las heces fecales humanas, éste podría proporcionar el 22% de la demanda mundial de fósforo (Mihelcic *et al.*, 2011). Las presas J. Rojo Gómez, Zozea y, sobre todo, Endhó, podrían ser aprovechadas para el reciclamiento de nutrientes para la agricultura a través del saneamiento ecológico (ecosan, por su abreviación en inglés), ya que el 90% del nitrógeno y el fósforo presentes en la orina y las heces fecales podrían ser recuperados, lo que ayudaría a mejorar los rendimientos agrícolas (Andersson *et al.*, 2013; Arellano-Aguilar *et al.*, 2016) sin necesidad de seguir explotando los depósitos de roca fosfórica.

De acuerdo con la NOM-001-SEMARNAT-1996, los límites máximos permisibles de nitrógeno y fósforo totales en embalses para riego agrícola son de 40 y 20 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, por lo que las cinco presas se encontraron dentro de los límites máximos permisibles del fósforo total. Sin embargo, en la Tabla 4 se observa que la cantidad de fósforo en algunas presas es considerable y que sus concentraciones superan a los compuestos nitrogenados. En cuanto al nitrógeno total es necesario realizar el método Kjeldahl para poder comparar las

concentraciones de este nutriente en las presas con el límite máximo permitido por esta NOM. Sin embargo, las concentraciones de fósforo mayores a  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ , así como las concentraciones de nitrato mayores a  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  son indicadores de condiciones eutróficas y son suficientes para inducir cianoFAN (WHO, 1996, 1999), por lo que, de acuerdo con los datos de este muestreo, todas las presas tienen el riesgo potencial de inducir un florecimiento de cianobacterias.

En el Valle del Mezquital se utilizan las aguas residuales con alta concentración de nutrientes para regar las zonas de cultivo, lo que evita la necesidad de utilizar fertilizantes y contribuye al reciclaje de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo. El reciclaje de estos nutrientes favorece que haya un menor ingreso de nitrógeno reactivo antropogénico hacia los ecosistemas, ya que el 81% de las entradas de éste proviene de la agricultura (Sutton *et al.*, 2013). A nivel mundial, las descargas de aguas residuales, que incluyen los desechos humanos y detergentes a base de fósforo, contribuyen con menos del 1% de las aportaciones de nitrógeno a los ecosistemas acuáticos; sin embargo, a nivel regional son una fuente de contaminación importante (Arellano-Aguilar *et al.*, 2016) que debe considerarse para el riesgo de cianoFAN.

La acuicultura de peces genera residuos que se acumulan en los cuerpos de agua, lo que aumenta la carga de nutrientes y la actividad microbiana. En el sur de Asia en el año 2000, se calculaba que las emisiones de nutrientes en zonas de acuicultura de peces de agua epicontinental eran equivalentes al 9% de la carga de nitrógeno y 5% de la carga de fósforo de los ríos (Arellano-Aguilar *et al.*, 2016). Esto puede explicar la alta concentración de nutrientes en presas, como Zozea y J. Rojo Gómez, que puede ser aportada también por sus actividades acuícolas.

Tabla 4. Nutrientes cuantificados de las muestras de agua.

Presa	ID	Ubicación en la presa	Ortofosfatos	Nitratos		Fósforo total
				(mg·L <sup>-1</sup> )		
Requena	Q1	Centro	0.68	2.2	0.986	3.11
	Q2	Cortina	1.61	0.9	0.612	2.09
	<b>Promedio</b>		<b>1.15</b>	<b>1.55</b>	<b>0.80</b>	<b>2.60</b>
	<b>DE</b>		<b>0.66</b>	<b>0.92</b>	<b>0.26</b>	<b>0.72</b>
Endhó	E1	Entrada río San Miguel	3.2	1.2	12.8	14.55
	E2	Entrada río Tula	2.6	1.4	11.2	15.05
	E3	Centro	2.65	2.5	12.95	13.5
	E4	Cortina	3.5	2.7	17.5	13.95
	<b>Promedio</b>		<b>2.99</b>	<b>1.95</b>	<b>13.61</b>	<b>14.26</b>
<b>DE</b>		<b>0.44</b>	<b>0.76</b>	<b>2.71</b>	<b>0.68</b>	
Dolores	D1	Entrada de río	0.16	1.4	0.37	0.79
	D2	Centro	0.11	1.1	0.35	1.05
	D3	Cortina	0.19	1.1	0.38	0.85
	<b>Promedio</b>		<b>0.15</b>	<b>1.20</b>	<b>0.37</b>	<b>0.90</b>
<b>DE</b>		<b>0.04</b>	<b>0.17</b>	<b>0.02</b>	<b>0.14</b>	
J. Rojo Gómez	RG1	Descargas de P. Endhó	4.85	1.3	6.6	11.75
	RG2	Entrada de río	1.77	1.1	7.7	12.6
	RG3	Centro	2.28	1.4	5.4	12.45
	RG4	Cortina	3.6	1.5	3	13.4
	<b>Promedio</b>		<b>3.13</b>	<b>1.33</b>	<b>5.68</b>	<b>12.55</b>
<b>DE</b>		<b>1.38</b>	<b>0.17</b>	<b>2.02</b>	<b>0.68</b>	
Zozea	Z1	Descargas de P. J. Rojo Gómez	1.89	2.1	0.3	9.7
	Z2	Centro	1.84	0.5	0.27	9.6
	Z3	Cortina	1.93	2.6	0.37	8.55
	<b>Promedio</b>		<b>1.89</b>	<b>1.73</b>	<b>0.31</b>	<b>9.28</b>
<b>DE</b>		<b>0.05</b>	<b>1.10</b>	<b>0.05</b>	<b>0.64</b>	

DE = desviación estándar.

## 8.2 Extracción y secuenciación de DNA de muestras ambientales

Se obtuvieron entre 1 y 2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de DNA de cada muestra de agua (Figura 18). Después de realizar la metagenómica dirigida a la región del gen 16S rRNA y la metagenómica *shotgun* estructural del contenido genómico total, se realizó el análisis bioinformático de las especies presentes.

Con el análisis del gen 16S rRNA se identificaron 22 phyla bacterianos y 6 de eucariontes para la presa Zozea, 27 phyla bacterianos y 5 de eucariontes para la presa J. Rojo Gómez, 19 phyla bacterianos y 5 de eucariontes para la presa Dolores, 28 phyla bacterianos y 4 de eucariontes para la presa Endhó, y 19 phyla bacterianos y 4 de eucariontes para la presa Requena.

En el análisis de metagenómica *shotgun* se identificaron 49 phyla bacterianos y 6 de arqueas en todas las presas, con excepción de la presa Zozea, con 5 phyla de arqueas (para observar los phyla, tanto de eucariontes como de arqueas, ver Anexos 6 y 7).

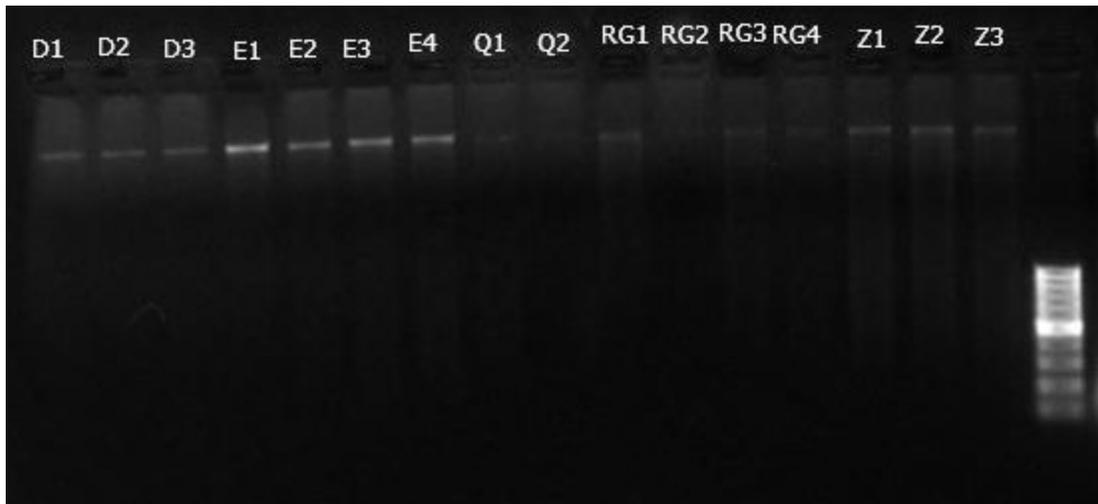


Figura 18. DNA extraído de las muestras de agua.

### 8.2.1 Amplificación del gen 16S rRNA

Se amplificó en la región de interés V3 para el gen 16S rRNA a 250 pb de las 16 muestras de agua (Figuras 19 y 20). Posteriormente, se añadieron los índices a las muestras (Figura 21) para ser identificados durante el análisis metagenómico.

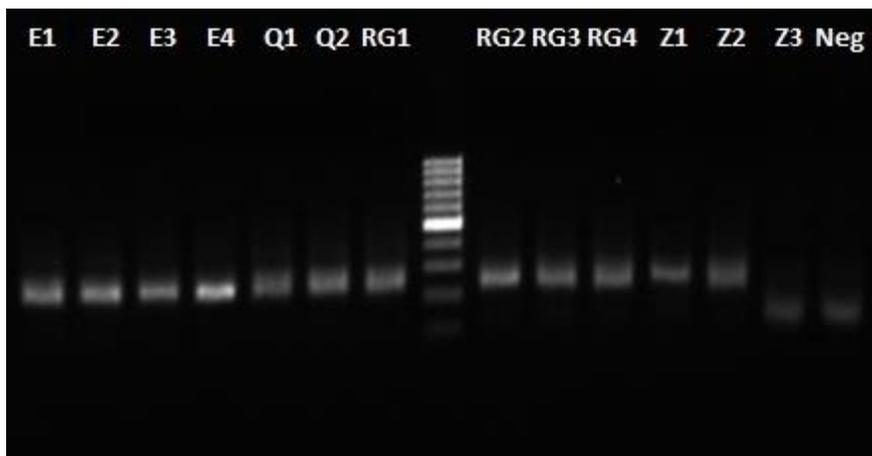


Figura 19. Amplificación de la región V3 para el gen 16S rRNA. Se muestra para los puntos E1, E2, E3, E4, Q1, Q2, RG1, RG2, RG3, RG4, Z1, Z2 y Z3.

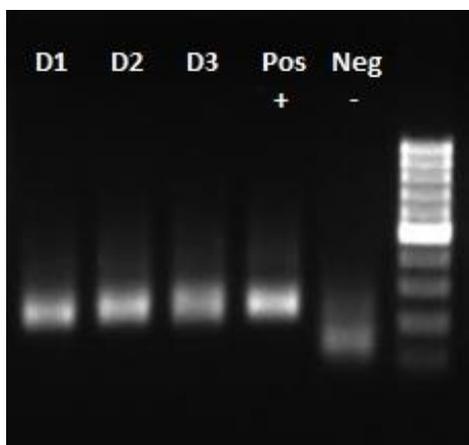


Figura 20. Amplificación de la región V3 para el gen 16S rRNA. Se muestra para los puntos D1, D2 y D3.

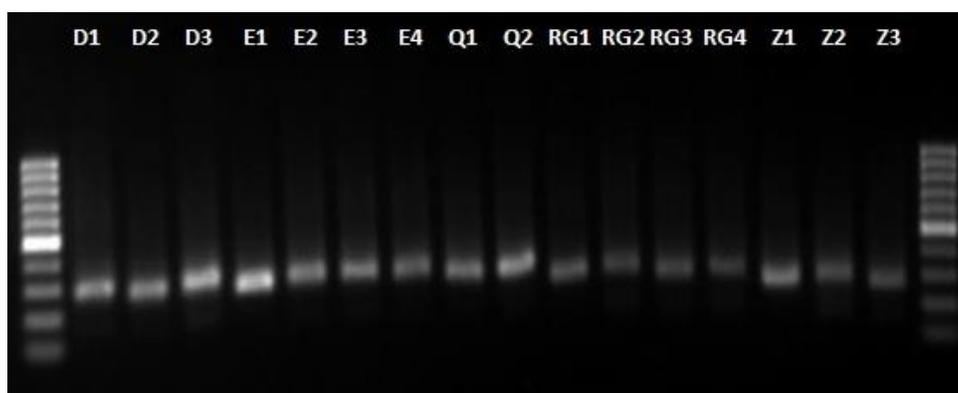


Figura 21. Amplificación de la región V3 con los índices en 300 pb.

Con el análisis bioinformático, los resultados de la identificación molecular de los microorganismos, a través de la clasificación de la base de datos EzBioCloud-LGM 2018 (Tabla 5 y Figura 22), muestran que los phyla bacterianos predominantes en las presas son Actinobacteria en la presa Zozea (35.03%) y J. Rojo Gómez (44.73%), Firmicutes en las presas Dolores (67.47%) y Requena (64.44%) y Proteobacteria en la presa Endhó (72.37%). Los géneros de cianobacterias predominantes (Tabla 6) son *Planktothrix* en las presas Zozea (51.71%) y J. Rojo Gómez (66.67%), *Prochlorococcus* en las presas Dolores (99.2%) y Endhó (48.6%). En la presa Requena hubo dos géneros predominantes: *Prochlorococcus* (33.33%) y *Dolichospermum* (33.33%).

De acuerdo con esta identificación molecular, todas las presas tienen géneros potencialmente tóxicos de cianobacterias, tales como *Dolichospermum*, *Fischerella*, *Limnothrix*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* y *Raphidiopsis* (Pérez-Morales *et al.*, 2016), por lo que se recomienda monitorear sus abundancias y sus relaciones con las condiciones ambientales. Es importante destacar que, a través de este análisis de metagenómica dirigida, el phylum Cyanobacteria no se presentó de manera abundante en las presas, y la abundancia relativa más alta se registró en la presa Dolores, con 8.05%, mientras que en las demás presas fue <1% (Tabla 5). Esta abundancia relativa mayor en la presa Dolores se ve reflejada en la concentración de oxígeno disuelto (>5 mg L<sup>-1</sup>), producto de especies fotosintéticas.

Algunos géneros de cianobacterias no se lograron clasificar por medio de este método (Anexo 4). Los motivos por los que en ocasiones el género y la especie no se identifican a través de la secuenciación del gen 16S son los nuevos taxa que no están en las bases de datos de nucleótidos, las pocas secuencias en dichas bases de datos y que las especies poseen secuencias de 16S rRNA similares o idénticas entre sí, o bien, no puede distinguir entre especies que divergieron recientemente (Janda & Abbott, 2007). Otros aspectos que afectan las identificaciones finales de los géneros a través de este gen son brechas en las secuencias obtenidas en el proceso, la pureza del aislamiento, los métodos de extracción del DNA y la formación de moléculas quiméricas (Tang *et al.*, 1998; Woo *et al.*, 2003; Heikens *et al.*, 2005).

Tabla 5. Abundancias relativas de los phyla bacterianos.  
En función del análisis del gen 16S rRNA, de acuerdo con la base de datos EzBioCloud-LGM 2018.

Presa	Actinobacteria	Bacteroidetes	Chloroflexi	Cyanobacteria	Firmicutes	Planctomycetes	Proteobacteria	Verrucomicrobia	Otros
Requena	5.84%	0.71%	0.18%	0.04%	<b>64.44%</b>	0.49%	27.25%	0.55%	0.50%
Endhó	3.38%	2.89%	0.08%	0.23%	19.24%	0.01%	<b>72.37%</b>	0.24%	0.59%
Dolores	12.26%	0.75%	0.25%	8.05%	<b>67.47%</b>	0.29%	9.90%	0.59%	0.44%
J. Rojo Gómez	<b>44.73%</b>	3.12%	1.01%	0.04%	12.69%	—	37.55%	0.51%	0.35%
Zoea	<b>35.03%</b>	1.28%	0.91%	0.79%	29.93%	3.36%	27.04%	0.96%	0.70%

\*Se señalan en negritas los phyla más abundantes para cada presa.

Tabla 6. Abundancias relativas de los géneros de cianobacterias.  
En función del análisis del gen 16S rRNA, de acuerdo con la base de datos EzBioCloud-LGM 2018.

Presa	<i>Dolichospermum</i>	<i>Fischerella</i>	<i>Limnothrix</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Nodularia</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Planktothrix</i>	<i>Prochlorococcus</i>	<i>Raphidiopsis</i>	Otros
Requena	<b>33.33%</b>	—	—	—	—	—	—	<b>33.33%</b>	—	33.33%
Endhó	—	—	—	—	—	—	2.40%	<b>48.60%</b>	—	49.00%
Dolores	0.40%	0.10%	—	—	0.10%	—	—	<b>99.20%</b>	—	0.30%
J. Rojo Gómez	—	—	—	—	6.67%	—	<b>66.67%</b>	—	—	26.67%
Zoea	—	—	2.10%	13.91%	—	1.05%	<b>51.71%</b>	24.93%	4.72%	1.57%

\*Se señalan en negritas los géneros más abundantes para cada presa.

Para consultar la tabla completa que desglosa los géneros contenidos en la columna 'Otros' consultar Anexo 4.

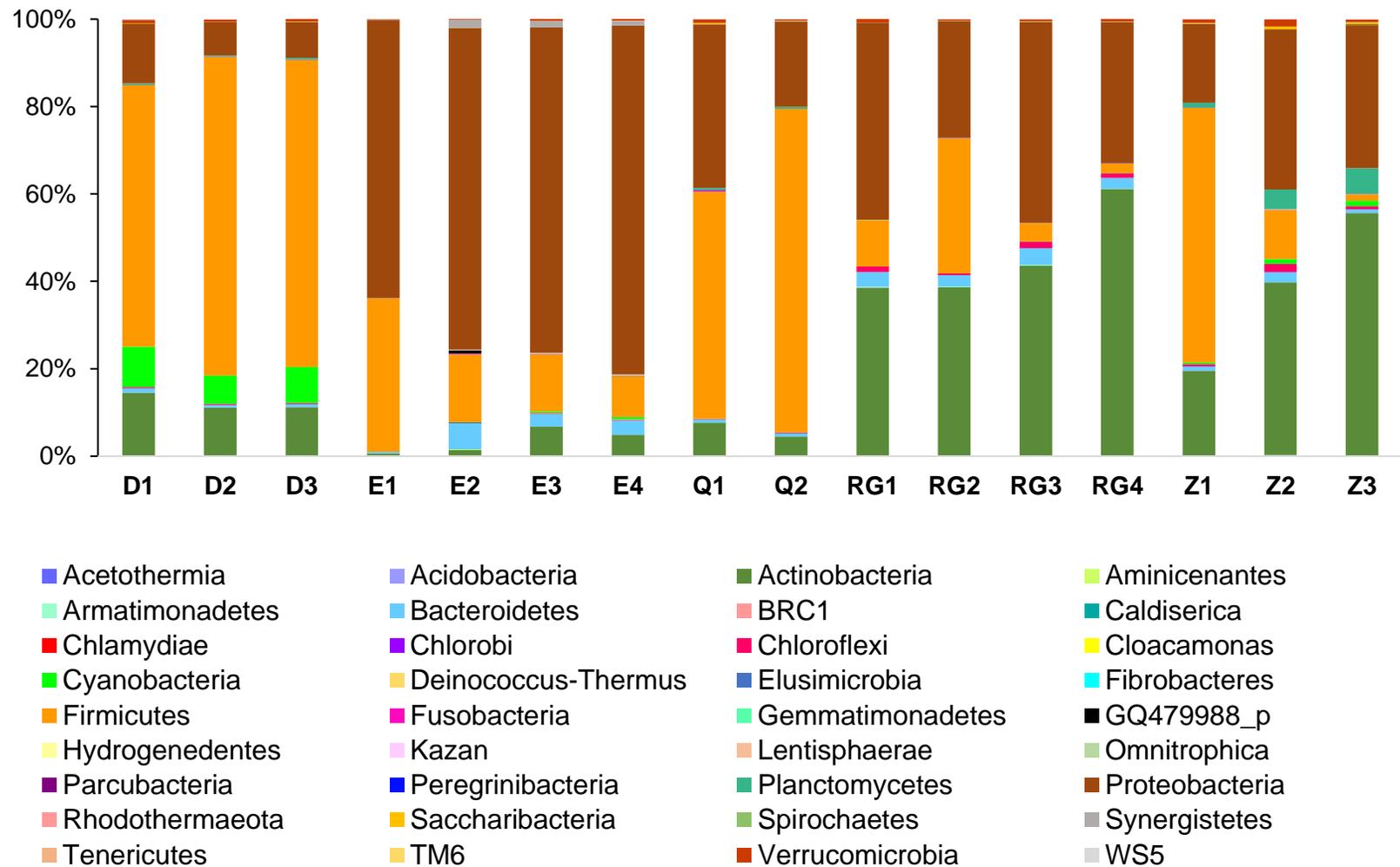


Figura 22. Distribución y abundancia de los phyla bacterianos en cada punto de muestreo. En función del análisis del gen 16S rRNA, de acuerdo con la base de datos EzBioCloud-LGM 2018.

La diversidad alfa ( $\alpha$ ) es la riqueza (número total de especies) en una comunidad en particular, y refleja la división de recursos entre las especies. Para calcularla se utilizan diferentes índices de diversidad como el índice de Berger-Parker y Simpson y Shannon, entre otros. Por otro lado, la diversidad beta ( $\beta$ ) es la tasa de cambio en la composición de especies entre sitios o comunidades adyacentes (recambio espacial), a lo largo de un gradiente ambiental. Esta diversidad refleja el grado de la selección o especialización de un hábitat e identifica zonas de transición, y para calcularla se utiliza el coeficiente de similitud de Jaccard (Whittaker, 1960; Sepkoski, 1988; Badii *et al.*, 2008). Las diversidades  $\alpha$  y  $\beta$  en este trabajo se calcularon a partir de los resultados obtenidos en la clasificación taxonómica a nivel de especie de la amplificación del gen 16S rRNA, considerando aquellos de la categoría taxonómica “No asignado”.

Para comparar índices de diversidad  $\alpha$  obtenidos durante el análisis bioinformático de las muestras analizadas (gen 16S rRNA), es necesaria la distribución proporcional del valor de importancia de cada especie. Uno de los métodos de riqueza es el modelo de rarefacción de una comunidad (Carmona-Galindo & Carmona, 2013). En la curva de rarefacción (Figura 23), la curva de acumulación de especies en cada punto indica que todas las muestras alcanzaron la asíntota, con lo que se comprueba que la secuenciación de las muestras ambientales se realizó a una profundidad de lectura adecuada y sugiere que se cuantificaron todas las especies representativas en cada punto.

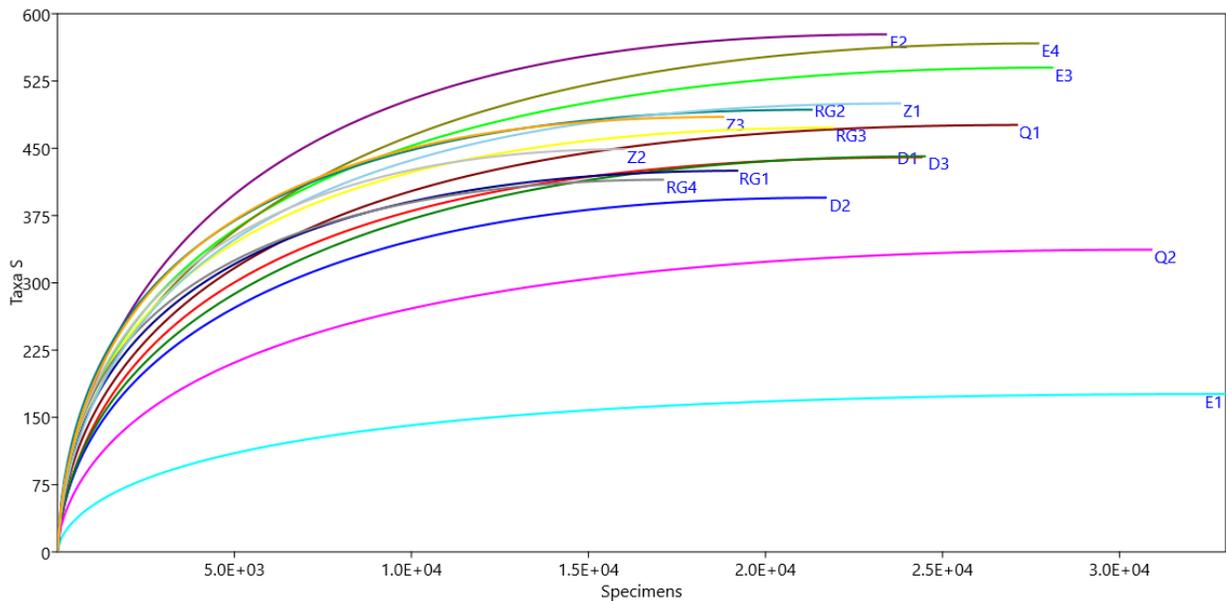


Figura 23. Modelo de rarefacción.  
Curva de acumulación de especies microscópicas en cada punto de muestreo.

Por otro lado, para analizar la estructura de una comunidad se utilizan los índices de diversidad. En la Tabla 7 se muestran las abundancias y riquezas, así como los índices de diversidad que comparan la homogeneidad o heterogeneidad de cada punto de muestreo. En ella se observa que el punto de muestreo que presentó mayor abundancia fue E1, sin embargo, este mismo punto de muestreo fue el que presentó menor riqueza (menor diversidad  $\alpha$ ), mientras que el punto de muestreo que presentó una mayor riqueza fue E2 (mayor diversidad  $\alpha$ ) (Figura 23), ubicado dentro de esta misma presa, pero en la entrada del río Tula. Por otro lado, el punto RG1 fue el que presentó menor abundancia. Esto puede deberse al grado de contaminación de los puntos de muestreo. Por ejemplo, en el punto E1 en la presa Endhó, donde el río San Miguel descarga agua de buena calidad, las bacterias presentes deben estar adaptadas a condiciones de buena a muy baja calidad del agua, por lo que podría suponer en una reducción en el número de especies capaces de soportar estos cambios ambientales del agua. Por otro lado, en el punto E2, el río Tula descarga agua de muy baja calidad, pero rica en nutrientes, lo que podría resultar en una mayor riqueza de especies capaces de desarrollarse bajo estas condiciones.

El índice de dominancia de Simpson (1949) mide la probabilidad de obtener al azar dos individuos de la misma especie dentro de la comunidad de interés. Este índice indica que, a valores cercanos a 1, hay mayor dominancia de alguna especie y a valores cercanos a 0, hay mayor diversidad de especies (Badii *et al.*, 2008). De acuerdo con este índice, el punto de muestreo RG2 (que corresponde a la entrada de río de la presa J. Rojo Gómez, cuyo caudal se abastecía de las compuertas de la presa Dolores que no han sido abiertas desde hace más de ocho años) resultó ser el de mayor dominancia, y el punto E1 (que corresponde a la entrada del río San Miguel a la presa Endhó, cuya calidad de agua es mejor que en el resto de la presa) tiene una abundancia repartida de manera más uniforme entre los taxa.

El índice de dominancia de Berger-Parker (1970) se basa en la máxima densidad de una especie con respecto a las densidades de todas las especies. Los valores cercanos a 1 establecen la diversidad más alta, mientras que los valores cercanos a 0 establecen la diversidad más baja (Badii *et al.*, 2008). De acuerdo con este índice, el punto RG2 presentó la diversidad más baja, mientras que el punto D1 presentó la más alta.

Por otro lado, el índice de Jaccard permite analizar la similitud entre comunidades y determinar asociaciones. Éste se basa en la relación de presencia-ausencia entre las especies que comparten dos comunidades y el total de especies (Badii *et al.*, 2008). En la Tabla 8 se observa el coeficiente de similitud de Jaccard para cada uno de los puntos de muestreo con respecto a los demás. Los puntos de muestreo que comparten una mayor similitud taxonómica son RG3 con E1 (el centro de la presa J. Rojo Gómez con el punto de descarga del río San Miguel en la presa Endhó), RG4 con E1 (la cortina de la presa J. Rojo Gómez con el punto de descarga del río San Miguel en la presa Endhó) y Z3 con E1 (la cortina de la presa Zozea con el punto de descarga del río San Miguel en la presa Endhó). Por otro lado, los puntos de muestreo que presentan una mayor diversidad  $\beta$  (i.e. comparten una menor similitud taxonómica) son D2 con D3 (el centro de la presa Dolores con respecto a su cortina), seguido por los puntos E3 con E4 (el centro de la presa Endhó con respecto a su cortina) y Z2 con Z3 (el centro de la presa Zozea con respecto a su

cortina), puntos que pertenecen a las mismas presas, unos al centro y los otros en la cortina.

Tabla 7. Índices de dominancia y equidad para la diversidad alfa (gen 16S rRNA).

<b>Muestra</b>	<b>Individuos (Abundancia)</b>	<b>Riqueza</b>	<b>Simpson</b>	<b>Berger-Parker</b>
Q1	17415	319	0.945	0.176
Q2	21741	235	0.868	0.274
E1	31778	121	0.696	0.422
E2	19277	408	0.933	0.199
E3	17300	326	0.908	0.221
E4	17546	345	0.903	0.228
D1	23179	283	0.719	0.522
D2	19802	266	0.871	0.246
D3	18585	275	0.899	0.234
RG1	11494	224	0.955	0.128
RG2	14604	301	0.973	0.079
RG3	13033	256	0.960	0.119
RG4	14076	243	0.941	0.182
Z1	21462	286	0.906	0.252
Z2	11674	273	0.944	0.165
Z3	14048	250	0.917	0.229

Tabla 8. Coeficiente de similitud de Jaccard para la diversidad beta (gen 16S rRNA).

<i>Muestra</i>	<b>D1</b>	<b>E1</b>	<b>Q2</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>Q1</b>	<b>RG1</b>	<b>RG4</b>	<b>RG3</b>	<b>RG2</b>	<b>Z1</b>	<b>Z2</b>	<b>Z3</b>
<b>D1</b>	0	0.743	0.792	0.938	0.946	0.943	0.848	0.849	0.912	0.898	0.927	0.920	0.867	0.897	0.931	0.937
<b>E1</b>	0.743	0	0.830	0.821	0.834	0.798	0.978	0.981	0.935	0.947	0.993	0.994	0.966	0.964	0.989	0.992
<b>Q2</b>	0.792	0.830	0	0.890	0.910	0.907	0.880	0.897	0.851	0.933	0.957	0.961	0.928	0.937	0.958	0.964
<b>E2</b>	0.938	0.821	0.890	0	0.823	0.793	0.970	0.978	0.901	0.925	0.985	0.985	0.952	0.947	0.974	0.977
<b>E3</b>	0.946	0.834	0.910	0.823	0	0.656	0.970	0.972	0.908	0.921	0.967	0.970	0.942	0.940	0.959	0.957
<b>E4</b>	0.943	0.798	0.907	0.793	0.656	0	0.975	0.976	0.911	0.919	0.973	0.972	0.946	0.941	0.967	0.965
<b>D2</b>	0.848	0.978	0.880	0.970	0.970	0.975	0	0.512	0.855	0.942	0.945	0.950	0.923	0.913	0.934	0.939
<b>D3</b>	0.849	0.981	0.897	0.978	0.972	0.976	0.512	0	0.858	0.945	0.949	0.950	0.926	0.914	0.931	0.932
<b>Q1</b>	0.912	0.935	0.851	0.901	0.908	0.911	0.855	0.858	0	0.929	0.938	0.939	0.930	0.942	0.928	0.920
<b>RG1</b>	0.898	0.947	0.933	0.925	0.921	0.919	0.942	0.945	0.929	0	0.728	0.788	0.779	0.931	0.943	0.943
<b>RG4</b>	0.927	0.993	0.957	0.985	0.967	0.973	0.945	0.949	0.938	0.728	0	0.745	0.765	0.960	0.936	0.940
<b>RG3</b>	0.920	0.994	0.961	0.985	0.970	0.972	0.950	0.950	0.939	0.788	0.745	0	0.778	0.950	0.932	0.937
<b>RG2</b>	0.867	0.966	0.928	0.952	0.942	0.946	0.923	0.926	0.930	0.779	0.765	0.778	0	0.898	0.932	0.944
<b>Z1</b>	0.897	0.964	0.937	0.947	0.940	0.941	0.913	0.914	0.942	0.931	0.960	0.950	0.898	0	0.787	0.779
<b>Z2</b>	0.931	0.989	0.958	0.974	0.959	0.967	0.934	0.931	0.928	0.943	0.936	0.932	0.932	0.787	0	0.695
<b>Z3</b>	0.937	0.992	0.964	0.977	0.957	0.965	0.939	0.932	0.920	0.943	0.940	0.937	0.944	0.779	0.695	0

## 8.2.2 Metagenomas

La metagenómica *shotgun* (metagenomas) secuencia todo el DNA presente en una muestra y realiza una clasificación taxonómica hasta nivel de cepa y una clasificación funcional (describe los genes presentes en una muestra). El DNA ambiental se fragmentó y se elevó a las 400 pb debido a la adición de los índices (Figura 24), para posteriormente poder ser secuenciado por el equipo Illumina Miniseq.

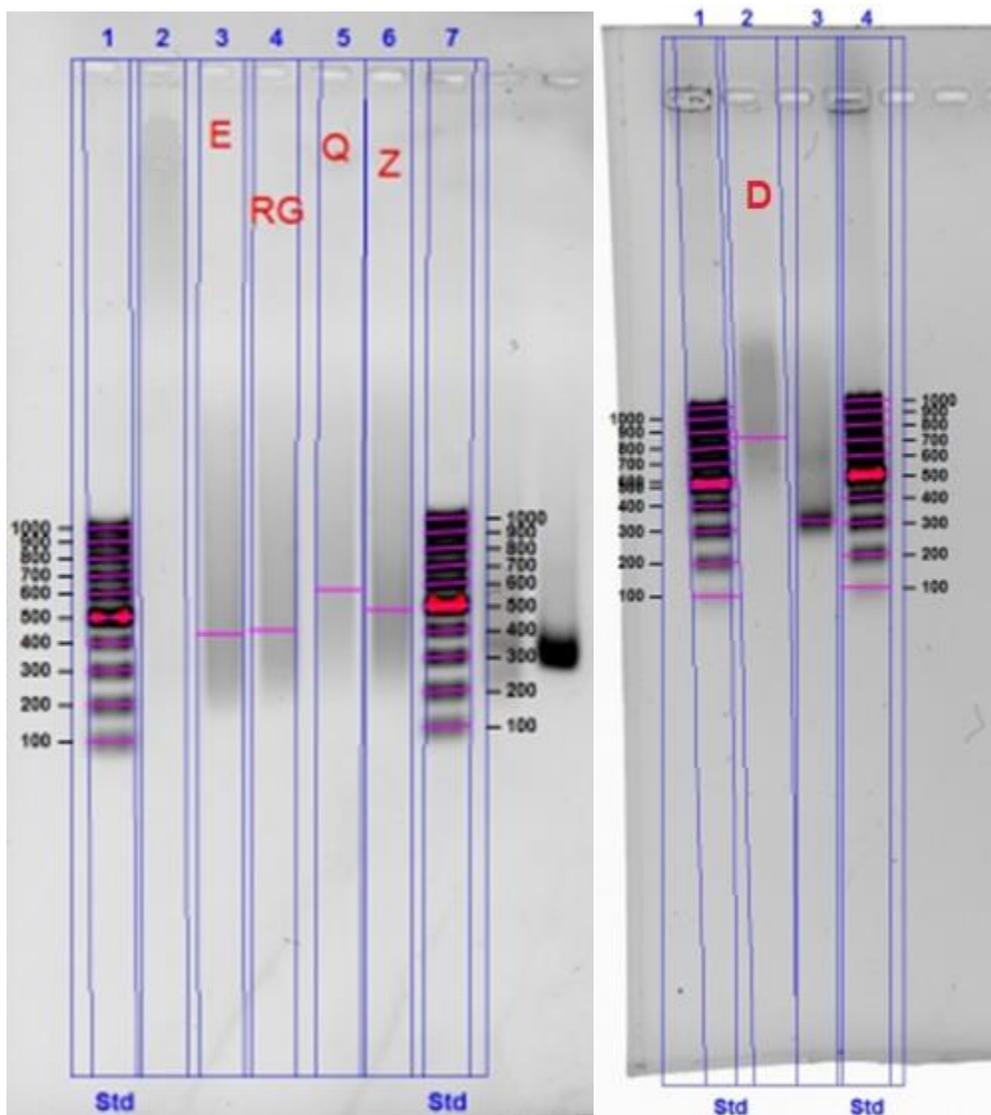


Figura 24. DNA extraído de cada presa para realizar el proceso de metagenomas. En la figura de la izquierda se observa que cuatro de las cinco muestras de metagenomas tuvieron 400 pb o más [presas Endhó (E), Requena (Q), J. Rojo Gómez (RG) y Zozea (Z)]. El DNA de la presa Dolores (D) se muestra en la figura de la derecha.

Los resultados del análisis bioinformático, de acuerdo con la clasificación de la base de datos ProGenomes, indicaron que los phyla bacterianos predominantes en las presas son Actinobacteria en la presa Zozea (42.5%) y Proteobacteria en las presas J. Rojo Gómez (45.07%), Dolores (40.5%), Endhó (78.89%) y Requena (46.79%) (Tabla 9). Algunos de estos resultados, como la presa Zozea y Endhó, concuerdan con la clasificación de la metagenómica dirigida al gen 16S rRNA, pero no sucede con el resto de las presas. El género de cianobacteria predominante en todas las presas (Tabla 10) es *Synechococcus*: Zozea (18.08%), J. Rojo Gómez (18.12%), Dolores (53.2%), Endhó (25.42%) y Requena (16.68%). Este género, de acuerdo con la amplificación del gen 16S rRNA, tuvo la abundancia relativa más alta únicamente en la presa Requena, con 0.52%. Las diferencias, tanto para los phyla bacterianos como para los géneros de cianobacterias entre la metagenómica dirigida y la metagenómica estructural, se deben a las diferencias en las bibliotecas de secuencias de cada base de datos, por lo que los resultados de ambas técnicas se utilizan de manera complementaria.

De la misma manera que en los resultados de la metagenómica dirigida al gen 16S rRNA, se encontraron géneros de cianobacterias potencialmente tóxicos en todas las presas: *Arthrospira*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Dolichospermum*, *Fischerella*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Pseudanabaena* y *Raphidiopsis* (Pérez-Morales *et al.*, 2016; Morales *et al.*, 2017), los cuales mostraron una abundancia relativa considerable con respecto a los demás géneros de cianobacterias: *Leptolyngbya*, con 6.15% en Requena, 6.38% en Endhó y 7.16% en J. Rojo Gómez, y *Microcystis* y *Planktothrix* en Zozea, con 5.85% y 8.69%, respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos con la amplificación del gen 16S rRNA, la presa que tuvo la mayor abundancia relativa de cianobacterias fue Dolores, con 12.29%, seguida de Zozea con 1.77%, mientras que las demás presas tuvieron abundancias relativas <1% (Tabla 9).

Asimismo, a través de la metagenómica estructural se identificaron abundancias en todas las presas de cuatro especies de cianobacterias potencialmente tóxicas reportadas en nuestro país: *Planktothrix agardhii*,

*Microcystis aeruginosa*, *Leptolyngbya boryana* y *Nostoc carneum* (Pérez-Morales *et al.*, 2016) (esta última no se presentó en la presa J. Rojo Gómez). Ambas técnicas establecen que existe un peligro potencial de desarrollo de cianoFAN en estos cuerpos de agua, y por este motivo, se sugiere realizar monitoreos frecuentes, tanto de las poblaciones de cianobacterias como de las condiciones ambientales.

Se observa una fuerte relación entre la alta cantidad de fósforo y la baja cantidad de cianobacterias (Tablas 4, 5 y 9) en las presas Endhó, J. Rojo Gómez y Zozea, mientras que la presa Dolores presenta un mayor porcentaje de cianobacterias y la menor cantidad de fósforo total. Se debe considerar que las cianobacterias responden de diferente manera a los nutrientes limitantes presentes en los cuerpos de agua epicontinentales (Heisler *et al.*, 2008), por lo que, a pesar de que hay cianobacterias presentes en las presas estudiadas, éstas no se presentan en abundancia a pesar de que hay nutrientes disponibles. Probablemente esto se deba a la competencia por los recursos entre las cianobacterias con el resto de la comunidad bacteriana.

Es importante subrayar que la presa Dolores, cuya calidad de agua es mejor con respecto a las otras cuatro presas, presentó abundancias relativas menores al 1% de los géneros potencialmente tóxicos; sin embargo, dentro de la comunidad bacteriana fue la presa que presentó una mayor abundancia relativa de cianobacterias, lo cual podría ser el resultado de presentar una menor cantidad de materia orgánica disuelta, ya que no recibe descargas de aguas residuales, y por ende, tendría una menor actividad bacteriana encargada de la descomposición de dicha materia. Por lo tanto, de acuerdo con nuestros resultados, es posible que la abundancia de cianobacterias pueda ser utilizada como indicadora de la calidad de agua de sistemas lénticos.

Debido a que uno de los objetivos particulares de este trabajo fue identificar molecularmente las especies de cianobacterias en las muestras ambientales, no se realizó la metagenómica funcional que describe la función de los genes presentes en las muestras, únicamente se realizó la metagenómica estructural que clasifica taxonómicamente el DNA presente en las muestras.

Tabla 9. Abundancias relativas de los phyla bacterianos presentes (metagenomas).  
De acuerdo con la base de datos ProGenomes.

Presa	Actinobacteria	Bacteroidetes	Cyanobacteria	Firmicutes	Planctomycetes	Proteobacteria	Synergistetes	Verrucomicrobia	Otros
Requena	14.91%	2.78%	0.83%	27.36%	4.18%	<b>46.79%</b>	0.05%	1.23%	1.87%
Endhó	6.62%	3.99%	0.83%	6.78%	0.35%	<b>78.89%</b>	0.44%	0.51%	1.58%
Dolores	19.33%	3.26%	12.29%	16.61%	3.31%	<b>40.50%</b>	0.08%	1.64%	2.97%
J. Rojo Gómez	34.98%	9.19%	0.99%	5.48%	0.48%	<b>45.07%</b>	0.08%	1.15%	2.58%
Zoea	<b>42.50%</b>	3.21%	1.77%	6.33%	5.06%	36.08%	0.08%	1.60%	3.38%

\*Se señalan en negritas los phyla más abundantes para cada presa.

Tabla 10. Abundancias relativas de los géneros de cianobacterias presentes (metagenomas)  
De acuerdo con la base de datos ProGenomes.

Presa	<i>Cyanothece</i>	<i>Dolichospermum</i>	<i>Fischerella</i>	<i>Leptolyngbya</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Planktothrix</i>	<i>Pseudanabaena</i>	<i>Synechococcus</i>
Requena	5.52%	1.76%	3.93%	6.15%	2.05%	3.30%	3.30%	0.68%	2.39%	<b>16.68%</b>
Endhó	4.41%	—	3.03%	6.38%	0.87%	2.07%	2.20%	0.78%	1.74%	<b>25.42%</b>
Dolores	0.54%	0.31%	0.35%	0.69%	0.13%	0.33%	0.29%	0.15%	0.23%	<b>53.20%</b>
J. Rojo Gómez	2.87%	0.82%	3.38%	7.16%	1.13%	2.76%	2.87%	4.40%	1.94%	<b>18.12%</b>
Zoea	4.08%	1.39%	5.15%	4.23%	5.85%	2.31%	2.62%	8.69%	1.92%	<b>18.08%</b>

\*Se señalan en negritas los géneros más abundantes para cada presa.

Únicamente se muestran los géneros que presentaron las mayores abundancias. Para consultar la tabla completa ver Anexo 5.

### 8.3 Establecimiento de cultivos de cianobacterias

Se obtuvieron dieciséis cultivos de las muestras de agua con medio de cultivo BG-11<sub>0</sub>. Los primeros meses de los cultivos en condiciones de laboratorio se observó una predominancia de clorofitas (*Viridiplantae*), y en menor medida de euglénidos (*Euglenozoa*), con respecto a las cianobacterias presentes en las muestras, a pesar de estar en contacto con un medio de cultivo sin nitratos. Por ello se realizaron dieciséis cultivos de las muestras de agua, además de los dieciséis cultivos iniciales, con medio de cultivo BG-11<sub>0</sub> con cicloheximida ( $\geq 95\%$  (HPLC), Sigma) para eliminar los organismos eucariontes de los cultivos; sin embargo, debido a que las clorofitas predominaban y la densidad celular de las cianobacterias era baja, no se lograron recuperar suficientes cianobacterias para poder realizar cultivos puros con este reactivo adicional.

No obstante, después de aproximadamente cuatro meses de resembrar los cultivos de las muestras de campo que tenían únicamente medio BG-11<sub>0</sub> e intensidades lumínicas relativamente bajas, se logró obtener un cultivo puro de una cianobacteria identificada morfológicamente como perteneciente al género *Dolichospermum*, correspondiente al punto de muestreo Z3: la cortina de la presa Zozea (Figura 25).

La falta de compuestos nitrogenados en el medio de cultivo favoreció el desarrollo de esta cianobacteria diazótrofa frente a las microalgas eucariontes. De igual manera, las bajas intensidades lumínicas le permitieron a la cianobacteria ser mejor competidora que las clorofitas o los euglénidos y crecer mejor en los cultivos de laboratorio después de meses de resiembras, considerando que la tasa de crecimiento de las cianobacterias es más baja con respecto a otras especies de algas. Se ha demostrado que la biomasa de las microalgas eucariontes (así como la eutrofización) aumenta la turbidez y disminuye la disponibilidad de luz, condiciones que podrían favorecer a las cianobacterias frente a las demás especies fitoplanctónicas, lo que las puede convertir en el phylum dominante (Van Liere & Mur, 1979). A pesar de que no alcanzan sus tasas máximas de crecimiento a bajas intensidades lumínicas, en estas condiciones su tasa de crecimiento es mayor que

la de las clorofitas y los euglénidos debido a sus pigmentos accesorios, como las ficobiliproteínas (que contienen aloficocianina, ficocianina y ficoeritrina) (Figura 27), que les permiten captar la luz correspondiente a la zona verde, amarilla y naranja del espectro electromagnético (500-650 nm), que difícilmente es utilizada por otras especies del fitoplancton (WHO, 1999).

A pesar de todos los géneros de cianobacterias identificados a través del análisis metagenómico (Sección 8.2), únicamente se obtuvo una especie en cultivo puro, tomando en consideración que la mayoría de los microorganismos de los ambientes no son cultivables, o bien, requieren condiciones específicas para poder crecer en condiciones de laboratorio (Breton-Deval *et al.*, 2019).

Este cultivo presenta las características generales del phylum Cyanobacteria y las características particulares del género *Dolichospermum*: células de color azul verdoso y tonalidades rojas, filamentosas, con acinetos –célula reproductiva asexual que está envuelta en una pared gruesa y que se le conoce como espora de resistencia debido a que se genera cuando las condiciones del ambiente causan estrés– y heterocistos –células reproductivas que pueden estar de forma intercalar o terminal y que poseen nódulos polares que están en contacto con células vecinas y se les asocia a la fijación de nitrógeno atmosférico– (Figura 26). Además, poseen aerótopos –vesículas de gas que regulan la posición de la cianobacteria en la columna de agua– y ficoeritrina –pigmento biliproteínico rojo– (Figura 27) (Parra *et al.*, 1983; Komárek & Komárková-Legnerová, 2002; Komárek, 2013; González & Inostroza, 2017). Los heterocistos intercalares y los acinetos observados en el cultivo de Z3 registraron las siguientes dimensiones medias: 10.63  $\mu\text{m}$  de largo y 7.5  $\mu\text{m}$  de ancho, y 18.75  $\mu\text{m}$  de largo, 6.25  $\mu\text{m}$  de ancho y para acinetos esféricos 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, respectivamente.

Considerando que el medio de cultivo BG-11<sub>0</sub> utilizado para el crecimiento de esta cianobacteria no contenía compuestos nitrogenados, las condiciones de desarrollo estaban limitadas de nitrógeno, pero con otros nutrientes disponibles (ver

Anexos 1 y 2), lo que favoreció el crecimiento de la cianobacteria correspondiente al género *Dolichospermum*, especie fijadora de nitrógeno (WHO, 1999).

Por otro lado, se observaron cianobacterias del orden Oscillatoriales en cultivos que no se lograron purificar, de las muestras de la cortina de la presa Zozea (Z3) (Figura 31) y en el centro de la presa Requena (Q1) (Figura 32), que presentaron tricomas rectos y catenados, con los extremos redondeados y cuyo color azul verdoso está presente en el contorno de las células, mientras que el centro parece transparente (por lo que se descarta que pertenezcan al género *Planktothrix*). Probablemente, las cianobacterias de las muestras Z3 y Q1 (Figuras 31 y 32) pertenezcan a los géneros *Phormidium* o *Pseudoanabaena*.

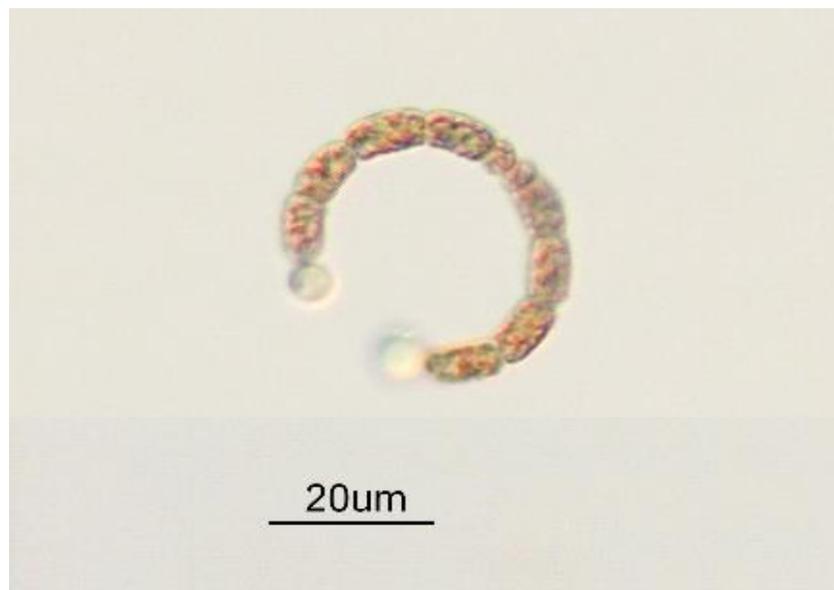


Figura 25. Cultivo puro de cianobacterias nostocales Z3 en condiciones de laboratorio.

Este organismo fue identificado morfológicamente como perteneciente al género *Dolichospermum* y muy probablemente a la especie *D. fallax*.



Figura 26. Cultivo de *Dolichospermum* Z3.  
En la parte superior de la fotografía se observa el heterocisto, característica particular del orden Nostocales, y en la parte inferior se observa un segmento elongado correspondiente al acineto.



Figura 27. Cultivo de *Dolichospermum* Z3.  
En la parte superior se observa el polo del heterocisto a través del cual se fija el nitrógeno inorgánico. Seguido de esta estructura se halla el acineto, y dentro de éste se observa la fycocitrina (puntos rojos), pigmento accesorio que contiene las fycobiliproteínas. En el siguiente acineto, en la parte inferior, se observan adentro de éste los aerótopos (puntos negros).



Figura 28. Polo del heterocisto (superior derecha) que está en contacto con el resto de la cianobacteria.



Figura 29. Polo del otro heterocisto (inferior izquierda).



Figura 30. Heterocistos intercalares.



Figura 31. Cultivo sin purificar de cianobacteria del orden Oscillatoriales. Probablemente de la familia Phormidiaceae o Pseudanabaenaceae, del punto de muestreo Z3.



Figura 32. Cultivo sin purificar de la cianobacteria del orden Oscillatoriales. Probablemente de la familia Phormidiaceae o Pseudanabaenaceae del punto de muestreo Q1 (centro de la presa Requena) con aumento de 1000x.

#### 8.4 Análisis de toxinas

Se analizaron las muestras extraídas, tanto en metanol al 80% como en ácido acético al 1%, con los estándares de las toxinas MCs, NODs, STX, ANA-a y CYNs en LC-MS/MS. Al término del análisis, no se observaron transiciones detectables en el monitoreo de reacción múltiple (MRM) correspondientes a las toxinas mencionadas, es decir, no se encontraron cianotoxinas en el cultivo de *Dolichospermum* perteneciente a la cortina de la presa Zozea.

No obstante, es importante resaltar que el género *Dolichospermum* es reconocido como productor de ANA-a, ANA-a(s), STX y MCs (Pérez-Morales *et al.*, 2016), por lo que la presencia de esta cianobacteria en la presa Zozea implica un riesgo potencial de toxicidad para el ecosistema acuático si las condiciones del lugar son idóneas para su florecimiento.

Se ha detectado que este género es capaz de causar cianoFAN letales por altas concentraciones de MCs ( $3,000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) en lagos de latitudes medias y altas (Dreher *et al.*, 2019). La expresión de los genes de MCs (gen *mcy*) depende de factores ambientales, como la disponibilidad de nutrientes y de luz, la limitación de hierro, la temperatura y el pH del contenido celular. Estos factores pueden suprimir o activar la expresión del gen *mcy*, lo que genera el aumento o la disminución en la producción de MCs (Bouaïcha *et al.*, 2019). Por ejemplo, se ha observado que en condiciones limitantes de nitrógeno, disminuye la concentración de MCs (Horst *et al.*, 2014), lo cual concuerda con el cultivo Z3, que se desarrolló en un medio de cultivo sin nitratos.

De igual modo, se debe considerar que, durante el florecimiento de una especie de cianobacteria, pueden encontrarse cepas productoras y no productoras de toxinas, o una mezcla de ambas. Una cepa es un subgrupo genético específico dentro de una especie, y una especie puede abarcar decenas o cientos de cepas. Existen cepas que son tres veces más tóxicas que otras y, aunque no sean tan abundantes como las cepas no tóxicas, pueden ocasionar que un florecimiento de cianobacterias sea tóxico (WHO, 1999). Sin embargo, las causas de estos cianoFAN y los factores que influyen en la dinámica de cepas tóxicas y no tóxicas han sido poco estudiados (Davis *et al.*, 2009). Por ello es importante resaltar que la toxicidad de un cianoFAN depende de las cepas presentes y no únicamente del género o la especie.

A pesar de que los resultados del análisis de toxinas no fueron positivos para ninguna de ellas, no se descarta la posibilidad de que se estén produciendo cianotoxinas y pueda existir un cianoFAN en la presa Zozea (para las otras presas sería necesario poder obtener un cultivo puro de cianobacterias para realizar un análisis similar). Por ello, se recomienda realizar análisis similares durante la época de lluvias, así como un monitoreo frecuente de las especies que predominan en la presa, considerando que las acumulaciones de cianobacterias en los cuerpos acuáticos pueden variar con el tiempo (en algunos casos en cuestión de horas) y el espacio. De igual manera, se recomienda llevar a cabo la metagenómica funcional

de las muestras analizadas para observar si hay presencia de los genes que expresan las cianotoxinas.

### 8.5 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica exploratoria multivariante que reduce la dimensionalidad de un conjunto de datos, procurando perder la menor cantidad de información posible para preservar la mayor cantidad de variación original. Los componentes principales producto de esta reducción son una combinación lineal de las variables originales y son independientes o no están correlacionadas entre sí. Se ordenan de manera que los primeros explican la mayor variación de los datos originales (Everitt & Hothorn, 2011).

El modelo de *Broken Stick* (Figura 33) obtenido a través del software R v. 3.4.2 (RStudio Team, 2020) muestra que los primeros dos componentes principales explican la mayor variación de los datos originales. El análisis de la matriz de correlaciones (Tabla 11) (matriz que muestra las correlaciones entre las variables a la misma escala y con ello información redundante, por lo que pocos factores explicarán gran parte de la variabilidad total (Everitt & Hothorn, 2011)) muestra que los primeros dos componentes principales explican el 64.42% de la variabilidad del conjunto de los datos, y sobre estos dos se realizó el PCA (Figura 34).

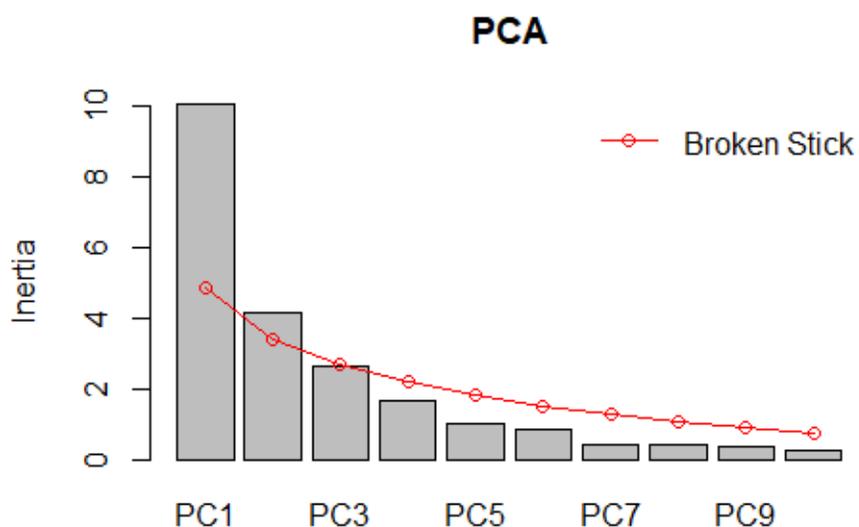


Figura 33. Modelo de Broken Stick.

Tabla 11. Análisis de la matriz de correlaciones en el conjunto de datos.  
Parámetros fisicoquímicos y biológicos.

<b>Variable</b>	<b>PC1</b>	<b>PC2</b>	<b>PC3</b>	<b>PC4</b>	<b>PC5</b>	<b>PC6</b>
<b>Transparencia</b>	-0.30633	0.220635	-0.76813	0.1285663	-0.0983236	-0.20392
<b>Temperatura</b>	0.48029	0.384890	0.39207	0.2050702	0.1070830	0.13145
<b>pH</b>	0.18715	0.608986	0.54947	0.1408428	-0.0452167	-0.16939
<b>Oxígeno disuelto</b>	0.28959	0.123733	-0.06800	-0.7574134	-0.0137310	-0.28211
<b>Conductividad</b>	-0.85722	0.064989	0.14877	-0.2059721	0.1063981	0.02195
<b>STD</b>	-0.86464	0.030728	0.14552	-0.1894230	0.1095693	0.02213
<b>Potencial redox</b>	0.64422	0.373909	-0.01876	-0.2316376	0.0921039	-0.20233
<b>Salinidad</b>	-0.86268	0.008439	0.15210	-0.1925930	0.1134733	0.03420
<b>Ortofosfatos</b>	-0.80489	0.210951	-0.04605	0.1029647	0.0767300	-0.21820
<b>Fósforo</b>	-0.85368	0.244498	0.04584	-0.0006259	0.0670040	-0.12225
<b>Nitratos</b>	-0.29615	-0.028238	0.39363	-0.0004281	-0.7379394	0.01933
<b>Amonio</b>	-0.79827	-0.374900	-0.07083	-0.0299215	0.0006491	-0.03007
<b>Actinobacteria</b>	0.09583	0.687151	-0.47990	-0.0279705	-0.2620022	0.02708
<b>Firmicutes</b>	0.57440	-0.493440	0.14804	0.0271897	0.2697328	-0.13092
<b>Proteobacteria</b>	-0.81495	0.036683	0.22153	0.1744553	0.0387315	0.05256
<b>Bacteroidetes</b>	-0.67912	0.079699	-0.29859	0.0170133	0.0785468	0.47321
<b>Verrucomicrobia</b>	0.37172	0.705282	-0.01824	0.0189111	0.0707314	0.20772
<b>Chloroflexi</b>	-0.07390	0.766238	-0.42963	-0.0166877	0.1224949	0.04640
<b>Cyanobacteria</b>	0.66629	-0.117462	-0.03475	-0.4836384	-0.1021282	0.29203
<b>Euglenozoa</b>	-0.63585	-0.421750	-0.23493	-0.3303699	-0.0797000	0.03937
<b>Heterokonta</b>	0.75430	-0.395063	-0.17929	-0.0311413	0.0444571	0.15942
<b>Viridiplantae</b>	0.26609	-0.538785	-0.47065	0.3875740	-0.0826534	-0.14828
<b>Eigenvalue</b>	10.031	4.1413	2.6240	1.64675	0.99023	0.84551
<b>Proporción explicada</b>	0.456	0.1882	0.1193	0.07485	0.04501	0.03843
<b>Proporción acumulada</b>	0.456	0.6442	0.7635	0.83832	0.88333	0.92176

Nota: Para ver todos los componentes principales con sus respectivos valores propios, la proporción de varianza explicada y la varianza explicada acumulada al 100%, ver Anexo 8.

En la Figura 34 se presenta el PCA de las cinco presas, donde se analizan la variabilidad y las relaciones entre los parámetros fisicoquímicos y los parámetros biológicos. Los parámetros cuantificados que presentan una menor variabilidad o varianza en las cinco presas son la transparencia, el oxígeno disuelto y los nitratos, principalmente, mientras que la mayoría de los parámetros cuantificados presentan una mayor variabilidad o varianza.

Las relaciones directas resultado de este PCA son:

- Entre el amonio y los euglénidos: Entre mayor concentración de amonio hay en las presas, se espera una mayor cantidad de euglénidos. Existe una

relación menos directa entre el nitrato y estos organismos, por lo que se concluye que los nutrientes limitantes para ellos son los compuestos nitrogenados. Esto concuerda con los resultados obtenidos por García-Rodríguez y colaboradores en el lago del Parque Alameda de la Solidaridad, Morelos, donde encontraron una gran abundancia de euglénidos, asociada a la alta concentración de amonio disuelto en agua, debido a una gran cantidad de materia orgánica en descomposición (García-Rodríguez *et al.*, 2015).

- Entre la salinidad, los STD, la conductividad, los nitratos y los phyla Proteobacteria y Bacteroidetes: Estos dos phyla se ven favorecidos en su desarrollo por aguas ricas en sólidos disueltos. En menor medida, también tienen una relación directa con el fósforo y el ortofosfato, por lo que nuestros resultados sugieren que son phyla predominantes de sistemas eutróficos o contaminados. En los lagos oligotróficos se esperaría entonces una menor cantidad de estas bacterias. Existen géneros de Proteobacteria (*Nitrosomonas*) que, a través de la quimiosíntesis, transforman amonio en nitrito (De Bie *et al.*, 2001) y éste, a su vez, se oxida a nitratos. Por otro lado, se ha reportado que los Bacteroidetes marinos crecen unidos a partículas suspendidas, superficies o células de algas (Fernández-Gomez *et al.*, 2013). Tanto Proteobacteria como Bacteroidetes suelen encontrarse más en sedimentos (ambientes bentónicos) que en la columna de agua, lo cual puede deberse al gradiente en el potencial de oxidación-reducción entre el agua y los sedimentos y ambos phyla tienen representantes anaerobios, como los reductores de sulfato (Tamaki *et al.*, 2005). La presencia de estos dos phyla en la zona fótica de las presas puede deberse a la alta cantidad de materia orgánica suspendida en la columna de agua.
- Entre el pH y los phyla Chloroflexi, Actinobacteria y Verrucomicrobia: En el caso de las bacterias Chloroflexi se ha reportado que su crecimiento se ve severamente limitado en condiciones de pH inferior a 7; su rango de crecimiento se encuentra en pH de entre 7 y 9 (con excepción de las termofílicas) (Garrity *et al.*, 2001). Por otro lado, se han reportado bacterias metanotróficas pertenecientes al phylum Verrucomicrobia que crecen de

manera óptima en pH bajos (entre 1 y 3.5) (Lindström *et al.*, 2005; Dunfield *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2008), lo cual sugiere que las bacterias Verrucomicrobia halladas en la columna de agua de las presas no son metanotróficas. Para el caso del phylum Actinobacteria no se encontró algún trabajo que reporte la relación entre estas bacterias y el pH.

- Entre la temperatura, el potencial redox y el oxígeno disuelto: La relación directa entre la temperatura del agua y el oxígeno disuelto no es clara, ya que, a mayor temperatura, existe una menor disolución de los gases en el agua. La concentración de oxígeno disuelto en muestras de agua subsuperficiales depende de factores como la tasa fotosintética y el contacto con la atmósfera a través de la turbulencia superficial provocada por el viento, además de la temperatura. Es importante resaltar que el oxígeno disuelto no se logró cuantificar en todos los puntos de muestreo, por lo que se espera que esta relación pudiera cambiar. Por otro lado, el potencial redox aumenta cuando la concentración del oxígeno disuelto aumenta (WHO, 1996), lo que resulta en esta relación directa.

Las relaciones inversas resultado de este PCA son:

- Entre el oxígeno disuelto, el potencial redox y la temperatura con el amonio (y en menor medida con el nitrato) y los euglénidos: Esto se debe a que la descomposición de materia orgánica rica en nutrientes causa una disminución del oxígeno disuelto y, con ello, del potencial redox, por lo que los euglénidos se convierten en las especies dominantes en condiciones eutróficas e hipertróficas (García-Rodríguez *et al.*, 2015).
- Entre las cianobacterias con los compuestos fosfatados: Estos compuestos que funcionan como nutrientes regulan el crecimiento y desarrollo de las cianobacterias. Esta relación se explicará más adelante.

Por último, no se observan relaciones (directas o inversas) entre las bacterias del phylum Verrucomicrobia con la transparencia, del el phylum Cyanobacteria con los phyla Chloroflexi y Actinobacteria, entre las bacterias Chloroflexi y los nitratos, así como los nitratos con el phylum Viridiplantae.

En la Figura 34 se observa que las cianobacterias tienen una clara relación inversa con el fósforo total y los ortofosfatos, y, en menor medida, con los compuestos nitrogenados: nitratos, seguidos por el amonio. Esto concuerda con otros estudios, en los que se observa que el fósforo es el principal nutriente que controla la aparición de cianoFAN y, a su vez, la biodisponibilidad del fósforo está limitada por las cianobacterias. No obstante, los compuestos nitrogenados también suelen ser relevantes en ocasiones para determinar los florecimientos de cianobacterias. Es importante resaltar que esto se debe a que existen varias especies capaces de fijar nitrógeno atmosférico (WHO, 1999), por lo que no dependen de los compuestos nitrogenados disueltos en el agua.

En la misma figura se observa que, como parte de los organismos fotosintéticos (Euglenozoa, Heterokonta, Viridiplantae y Cyanobacteria), las cianobacterias son las que tienen la relación inversa con los compuestos nitrogenados y fosfatados. Se ha demostrado que la afinidad de muchas cianobacterias por el nitrógeno y el fósforo es mayor que la de muchos otros organismos fotosintéticos. Éstas pueden competir con otros organismos fitoplanctónicos en condiciones limitantes de estos nutrientes (WHO, 1999)

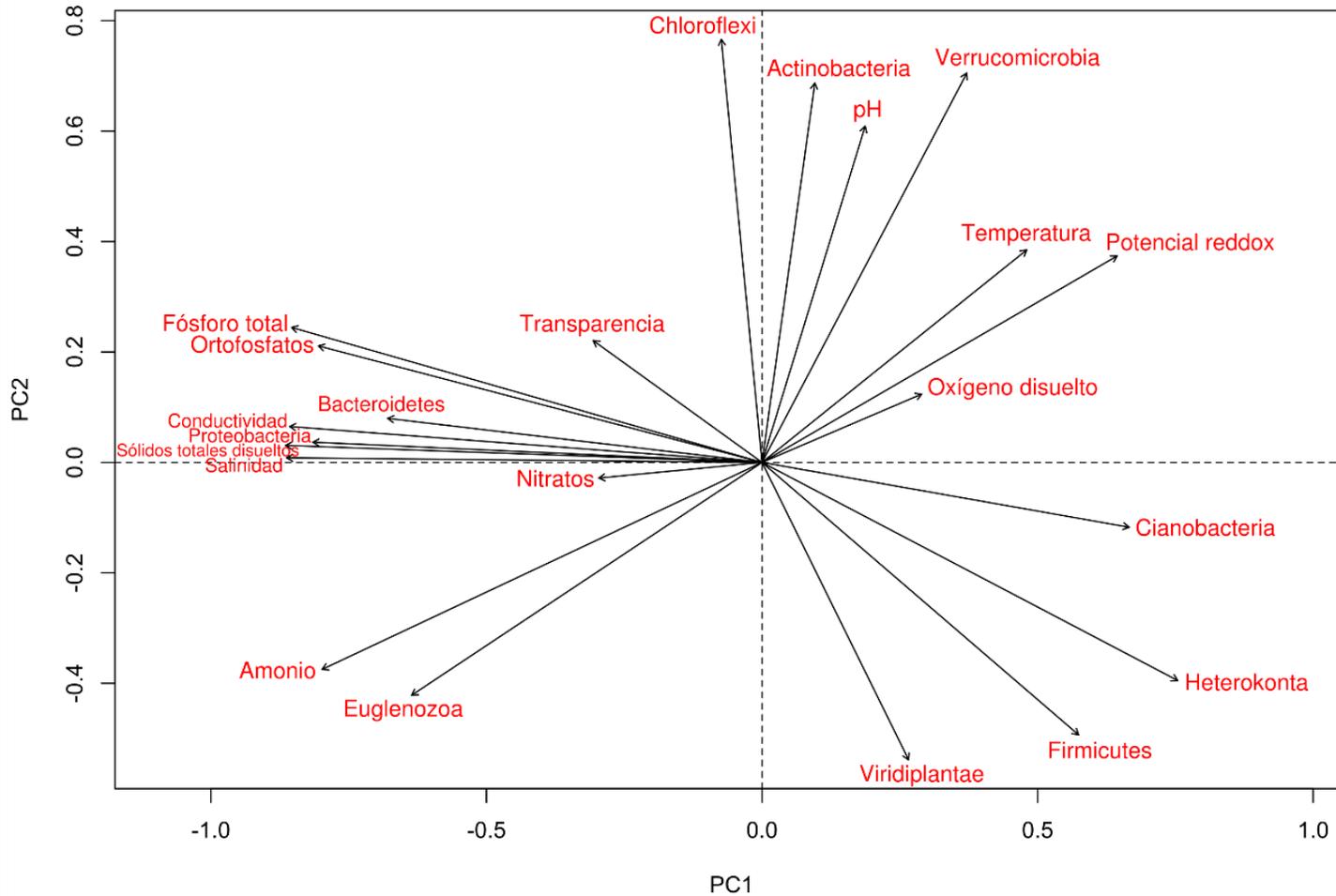


Figura 34. Análisis de componentes principales realizado en este estudio.

Se relacionan tanto phyla procariontes (Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Verrucomicrobia), como eucariontes (Euglenozoa, Heterokonta, Viridiplantae), con los parámetros fisicoquímicos *in situ* (conductividad, oxígeno disuelto, pH, potencial redox, salinidad, sólidos totales disueltos, temperatura del agua, transparencia) y nutrientes (amonio, fósforo total, nitratos, ortofosfatos).

## 9 Conclusiones

De acuerdo con los objetivos de este trabajo, se concluye que las cinco presas analizadas del Valle del Mezquital (cuatro de ellas asociadas con las descargas de aguas residuales), presentaron variaciones térmicas y de pH dentro de los límites permisibles de la NOM-001-SEMARNAT-1996. Asimismo, en el momento de muestreo se encontraron en condiciones eutróficas de baja transparencia y altas concentraciones de nutrientes, de los cuales el fósforo total no excede el límite máximo permisible establecido en la NOM-001-SEMARNAT-1996.

Se registraron condiciones de hipoxia para las presas asociadas a las descargas de aguas residuales (con excepción de la presa Dolores, la cual no es alimentada con este tipo de descargas) y presentaron una conductividad aceptable, con excepción de las presas Endhó y J. Rojo Gómez. A través del análisis de estos parámetros fisicoquímicos se observó que la presa Endhó tiene la menor calidad de agua, mientras que la de mejor calidad de agua es Dolores.

Se obtuvo un cultivo de cianobacterias puro, que fue identificado morfológicamente como perteneciente al género *Dolichospermum*. Asimismo, se observó la presencia de especies del género *Phormidium* o *Pseudoanabaena* en cultivos que no se lograron purificar. Estos tres géneros se han reportado como promotores de cianoFAN en nuestro país, por lo que es importante establecer un programa de monitoreo de su abundancia en estas presas.

Los resultados del análisis de cianotoxinas en el cultivo de *Dolichospermum* fueron negativos, no obstante, esto no significa que no se estén liberando toxinas en el medio acuático, ya que este análisis se basó en un cultivo en condiciones de laboratorio. A pesar de que este género es reconocido como productor de anatoxinas, saxitoxina —y sus análogos— y microcistinas, la producción y liberación de cianotoxinas depende de la cepa.

A través el análisis metagenómico realizado en este estudio se identificaron géneros de cianobacterias reportados como formadores de cianoFAN en el país, así como cuatro especies de cianobacterias potencialmente tóxicas, presentes en las cinco presas estudiadas.

A pesar de que la abundancia de estos géneros y estas especies de cianobacterias potencialmente tóxicas fue menor al 1% de toda la comunidad bacteriana de las presas, es importante monitorear su abundancia en estos sistemas. Los cianoFAN de estos géneros podrían ocurrir en cualquier momento, si las condiciones son propicias para ello.

Con base en los resultados de este muestreo se observó, a través del análisis de componentes principales, que las cianobacterias tienen una relación inversa con los compuestos fosfatados y en menor medida con los nitratos, nutrientes que constituyen una fuente de energía para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis. Sin embargo, esta relación inversa es menos notoria que la anterior, lo que puede deberse a que no todas las especies de cianobacterias dependen del nitrógeno para desarrollarse, ya que muchas de ellas son diazótrofes.

A partir de nuestros resultados, se recomienda eliminar o disminuir las descargas de nutrientes en las aguas residuales de la industria y minimizar los residuos que llegan a los ecosistemas acuáticos; no obstante, esta solución ecológica podría acarrear consecuencias negativas para los agricultores del Valle del Mezquital. En caso de verse reducido el flujo de estas aguas residuales con nutrientes, las zonas de cultivo se reducirían, habría disminución en la producción de cultivos y, por ende, pérdidas económicas para los habitantes del Valle del Mezquital que dependen directamente de esta actividad. Por ello, para llevar a cabo una buena gestión del recurso hídrico es necesario reconocer las interconexiones entre las actividades económicas y la calidad de agua (WHO, 1999), por lo que, en principio, debería mejorar la calidad de estas aguas residuales sin retirar los compuestos nitrogenados y fosfatados, objetivo inicial de la PTAR Atotonilco de Tula.

## 10 Consideraciones a futuro

A partir de nuestros resultados, se hacen las siguientes recomendaciones para trabajos a futuro en el Valle del Mezquital y sus presas asociadas:

- Es difícil concluir las relaciones generales entre las cianobacterias con las condiciones ambientales de las presas, ya que la información presentada corresponde a un solo muestreo, realizado durante la época de estiaje, cuando disminuyen las descargas de agua residuales. Por lo tanto, se sugiere realizar estudios similares durante todas las épocas del año, especialmente en la época de lluvias, en la que aumenta el caudal del río, así como la escorrentía.
- Para estudios de fitoplancton, se sugiere obtener dos muestras de cada punto de muestreo para fijar una y dejar a la otra desarrollarse en medio de cultivo, con el objetivo de comparar ambas muestras. Para realizar un aislamiento eficaz de cianobacterias en muestras ambientales que contienen clorofitas, euglénidos u otros organismos fitoplanctónicos, se recomienda usar un sonicador para separar las células, sin llegar a romperlas.
- Estudiar los parámetros fisicoquímicos y la composición microbiológica una vez que entre en operación el Túnel Emisor Oriente y descargue las aguas residuales acarreadas en la cuenca del río Tula.
- Realizar la metagenómica funcional de los resultados de este estudio para observar cuáles genes se encuentran presentes en la muestra, y si alguno corresponde a aquellos responsables de la producción de cianotoxinas (MCYST-LA, MCYST-LAba, MCYST-LL, MCYST-AR, MCYST-YA, STX, dcSTX, LWTX1, etc.) y, de ser positivo, en qué abundancias se hallan estos genes.
- Realizar pruebas estadísticas para establecer si hay diferencias significativas entre los sitios de muestreo dentro de cada presa.
- Proponer la creación de humedales artificiales para la gestión de aguas residuales y disminuir la carga de nutrientes en los ecosistemas acuáticos (Arellano-Aguilar *et al.*, 2016). No obstante, las medidas de restauración que

reducen la carga de nutrientes deben hacerse de acuerdo con las particularidades del sistema, ya que pueden crear condiciones limitantes de nitrógeno y, por lo tanto, favorecer el desarrollo de cianobacterias diazótrofes.

- En México existe un bajo porcentaje de aguas residuales tratadas, así como un bajo nivel de tratamiento exigido (Martínez-Austria *et al.*, 2017), por lo que se recomienda mejorar las técnicas de tratamiento, extender una red de plantas de tratamiento en la CDMX y ZMCM para afectar lo menos posible la calidad del agua en el Valle del Mezquital y exigir que, tanto las industrias como los municipios, cumplan con las técnicas de tratamiento que se les exige.

## 11 Literatura citada

- Acosta-Álvarez, M. M. (2007). *Determinación de metales pesados en suelos agrícolas del Valle del Mezquital, Hgo.* (Licenciatura), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.
- Alves, L. d. F., Westmann, C. A., Lovate, G. L., de Siqueira, G. M. V., Borelli, T. C., & Guazzaroni, M.-E. (2018). Metagenomic approaches for understanding new concepts in microbial science. *International Journal of genomics*, 2018, 1-15.
- Andersen, R. A. (2005). *Algal culturing techniques*: Elsevier: 435-436.
- Andersson, J. C., Zehnder, A. J., Wehrli, B., Jewitt, G. P., Abbaspour, K. C., & Yang, H. (2013). Improving crop yield and water productivity by ecological sanitation and water harvesting in South Africa. *Environmental Science & Technology*, 47(9), 4341-4348.
- Arellano-Aguilar, O., García-Mendoza, E., Thompson, K., & Tirado, R. (2016). Zonas muertas: Los ecosistemas del mundo amenazados por la contaminación con fertilizantes. *Greenpeace México*, 7-59.
- Arzate-Cárdenas, M. A., Olvera-Ramírez, R., & Martínez-Jeronimo, F. (2010). *Microcystis* toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. *Ecotoxicology*, 19(6), 1157-1165.
- Badii, M. H., Landeros, J., & Cerna, E. (2008). Patrones de asociación de especies y sustentabilidad. *Daena: International Journal of Good Conscience*, 3(1), 632-660.
- Bates, B., Kundzewicz, Z., Wu, S., & Palutikof, J. (2008). *Climate change and water: IPCC Technical Paper VI*. Geneva: Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC Secretariat: 210.
- Bouaïcha, N., Miles, C. O., Beach, D. G., Labidi, Z., Djabri, A., Benayache, N. Y., & Nguyen-Quang, T. (2019). Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. *Toxins*, 11(714), 40.
- Breton-Deval, L., Sanchez-Flores, A., Juárez, K., & Vera-Estrella, R. (2019). Integrative study of microbial community dynamics and water quality along The Apatlaco River. *Environmental Pollution*, 255, 113158.
- Cajuste, L. J., Carrillo, R. G., Cota, E. G., & Laird, R. J. (1991). The distribution of metals from wastewater in the Mexican Valley of Mezquital. *Water, Air, and Soil Pollution*, 57(1), 763-771.
- Carmichael, W. W. (1994). The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, 270(1), 78-86.
- Carmichael, W. W. (1997). The cyanotoxins *Advances in Botanical Research* (Vol. 27, pp. 211-256): Elsevier.
- Carmichael, W. W., Azevedo, S. M., An, J. S., Molica, R. J., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., Shaw, G. R., & Eaglesham, G. K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 109(7), 663-668.
- Carmona-Galindo, V. D., & Carmona, T. V. (2013). La diversidad de los análisis de diversidad. *Bioma*, 14(2), 20-28.
- Cifuentes, V., León, R., & Gómez, C. (1993). Efecto de ketoconazol, clotrimazol, nistatina y cicloheximida sobre el crecimiento de *Phaffia rhodozyma*. *Boletín Micológico*, 8(1-2), 13-17.

- Conagua (2011a). Estadísticas del agua en México, edición 2011. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).
- Conagua (2011b). Planta de tratamiento de aguas residuales Atotonilco. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT): 1-12.
- Conagua (2013). Estadísticas del agua de la región hidrológico-administrativa XIII, edición 2013. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).
- Conagua (2018). Estadísticas del agua en México, edición 2018. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT): 125-126.
- Cortés-Muñoz, J. E., Calderón-Mólgora, C. G. (2011). Uso potable del agua de acuíferos en contacto con zonas de riego que usan agua residual. En Oswald-Spring, Ú. (Coord.), *Retos de la investigación del agua en México* (pp. 293-302). Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- D'Ors de Blas, A. (2015). *Efectos del fitoplancton tóxico procedente de aguas continentales y marinas en ecosistemas salobres de estuario*. (Doctorado), Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L., & Gobler, C. J. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, 8(5), 715-725.
- De Bie, M. J., Speksnijder, A. G., Kowalchuk, G. A., Schuurman, T., Zwart, G., Stephen, J. R., Diekmann, O. E., & Laanbroek, H. J. (2001). Shifts in the dominant populations of ammonia-oxidizing b-subclass Proteobacteria along the eutrophic Schelde estuary. *Aquatic Microbial Ecology*, 23(3), 225-236.
- Del Arrenal-Capetillo, R. (1985). Estudio hidrogeoquímico de la porción centro-oriental del Valle del Mezquital, Hidalgo. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 6(1), 86-97.
- Delpla, I., Jung, A.-V., Baures, E., Clement, M., & Thomas, O. (2009). Impacts of climate change on surface water quality in relation to drinking water production. *Environment International*, 35(8), 1225-1233.
- Deutsch, C., Brix, H., Ito, T., Frenzel, H., & Thompson, L. (2011). Climate-forced variability of ocean hypoxia. *science*, 333(6040), 336-339.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.-P., & Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3623-3630.
- Dreher, T. W., Collart, L. P., Mueller, R. S., Halsey, K. H., Bildfell, R. J., Schreder, P., Sobhakumari, A., & Ferry, R. (2019). *Anabaena/Dolichospermum* as the source of lethal microcystin levels responsible for a large cattle toxicosis event. *Toxicon*: X, 1, 7.
- Dunfield, P. F., Yuryev, A., Senin, P., Smirnova, A. V., Stott, M. B., Hou, S., Ly, B., Saw, J. H., Zhou, Z., & Ren, Y. (2007). Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. *Nature*, 450(7171), 879-882.
- Everitt, B., & Hothorn, T. (2011). *An introduction to applied multivariate analysis with R*. NY, EE. UU.: Springer Science & Business Media: 61-102.

- Fernández-Gomez, B., Richter, M., Schüler, M., Pinhassi, J., Acinas, S. G., González, J. M., & Pedros-Alio, C. (2013). Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *The ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 7(5), 1026-1037.
- García-Rodríguez, J., Molina-Astudillo, F. I., Miranda-Espinoza, E., Soriano-Salazar, M. B., & Díaz-Vargas, M. (2015). Variación fitoplanctónica en un lago urbano del municipio de Cuernavaca, Morelos, México. *Acta Universitaria*, 25(1), 3-11.
- Garrity, G. M., Holt, J. G., Castenholz, R. W., Pierson, B. K., Keppen, O. I., & Gorlenko, V. M. (2001). Phylum BVI. Chloroflexi *phy. nov.* En D. R. Boone, Castenholz, R. W., Garrity, G. M. (Ed.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 427-446). NY, EE. UU.: Springer.
- Gómez, P., González, L., Granados, F., & Padilla, G. (2008). *Estudio biológico-pesquero, socioeconómico y elaboración del plan de manejo del embalse de la presa Requena, Municipio de Tepeji del Río de Ocampo*. México: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SAGARPA).
- González S., M. A., & Inostroza D., I. (2017). *Manual taxonómico y fotográfico de géneros fitoplanctónicos (excl. diatomeas) de 7 lagunas del Gran Concepción, Concepción, Chile*. Concepción, Chile: Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción: 164-165.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2011). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5(10), R245-R249.
- Heikens, E., Fleer, A., Paauw, A., Florijn, A., & Fluit, A. (2005). Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2286-2290.
- Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W., Dennison, W. C., Dortch, Q., Gobler, C. J., Heil, C. A., & Humphries, E. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae*, 8(1), 3-13.
- Hernández-Durán, B. (2018). *Análisis de la calidad del agua de la presa Endhó y propuesta de mejora*. (Licenciatura), Instituto Politécnico Nacional, CDMX.
- Hiller, S., Krock, B., Cembella, A., & Luckas, B. (2007). Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(9), 1238-1250.
- Horst, G. P., Sarnelle, O., White, J. D., Hamilton, S. K., Kaul, R. B., & Bressie, J. D. (2014). Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*, 54, 188-198.
- Huerta, L., Contreras-Valadez, R., Palacios-Mayorga, S., Miranda, J., & Calva-Vasquez, G. (2002). Total elemental composition of soils contaminated with wastewater irrigation by combining IBA techniques. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 189(1-4), 158-162.

- Islam, T., Jensen, S., Reigstad, L. J., Larsen, Ø., & Birkeland, N.-K. (2008). Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(1), 300-304.
- Jacinavicius, F. R., Gama-Júnior, W. A., Azevedo, M. T. d. P., & Sant'Anna, C. L. (2013). *Manual para cultivo de cianobactérias*. Brasil: São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente: 13.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Komárek, J. (2013). *Cyanoprokaryota. Freshwater Flora of Central Europe*. Berlin: Springer Spektrum: 728-729.
- Komárek, J., & Komárková-Legnerová, J. (2002). Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico. *Preslia*, 74(3), 207-234.
- Lesser-Carrillo, L. E., Lesser-Illades, J. M., Arellano-Islas, S., & González-Posadas, D. (2011). Balance hídrico y calidad del agua subterránea en el acuífero del Valle del Mezquital, México central. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 28(3), 323-336.
- Lindström, E. S., Kamst-Van Agterveld, M. P., & Zwart, G. (2005). Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8201-8206.
- López-Álvarez, B. (2004). *Ampliación del Sistema de Riego en el Valle del Mezquital con Aguas Subterráneas*. (Licenciatura), Instituto Politécnico Nacional, CDMX, México.
- Maciel-Baltazar, E. (2015). Evaluación de la actividad tóxica de una cepa de *Synechococcus* sp. (Cyanophyta: Chroococcales) aisladas del Sistema Lagunar Mar Muerto, Chiapas, México. *Lacandonia*, 9(1), 9-16.
- Martínez-Austria, P. F., Díaz-Delgado, C., & Moeller-Chávez, G. (2017). *Seguridad hídrica en México*. México: Academia de Ingeniería México: 1-34.
- Mignard, S., & Flandrois, J.-P. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods*, 67(3), 574-581.
- Mihelcic, J. R., Fry, L. M., & Shaw, R. (2011). Global potential of phosphorus recovery from human urine and feces. *Chemosphere*, 84(6), 832-839.
- Montelongo-Casanova, R., Gordillo-Martínez, A. J., Otazo-Sánchez, E. M., Villagómez-Ibarra, J. R., Acevedo-Sandoval, O. A., & Prieto-García, F. (2008). Modelación de la calidad del agua del río Tula, estado de Hidalgo, México. *Dyna*, 75(154), 5-18.
- Morales, E. A., Rivera, S. F., Vildoza, L. H., & Pol, A. (2017). Harmful algal bloom (HAB) produced by cyanobacteria in Alalay Shallow Lake, Cochabamba, Bolivia. *Acta Nova*, 8(1), 50-75.
- Moschini-Carlos, V., Bortoli, S., Pinto, E., Nishimura, P. Y., Gomes de Freitas, L., Pompêo, M. L., & Dörr, F. (2009). Cyanobacteria and cyanotoxin in the Billings reservoir (São Paulo, SP, Brazil). *Limnetica*, 28(2), 273-282.
- Muciño-Márquez, R., Figueroa-Torres, M., & Aguirre-León, A. (2015). Cianofitas de los sistemas fluvio-lagunares Pom-Atasta y Palizada del Este, adyacentes a la Laguna de Términos, Campeche, México. *Polibotánica*(39), 49-78.

- Neset, T. S. S., & Cordell, D. (2012). Global phosphorus scarcity: identifying synergies for a sustainable future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(1), 2-6.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences *Advances in Microbial Ecology* (pp. 1-55): Springer.
- Parra, Ó. O., González, M., Dellarossa, V., Rivera, P., & Orellana, M. (1983). *Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales: con especial referencia al fitoplancton de Chile* (Vol. 5): Universidad de Concepcion: 10-16.
- Peña-García, A. (2012). Análisis Socioespacial del Proyecto de Construcción de la Macro Planta de Tratamiento de Aguas Residuales en Hidalgo-México. *Revista Interdisciplinaria de Gestión Social*, 1(1), 229-244.
- Pérez-Linares, J. (2003). *Caracterización de las secuencias ribosomales 16s (ADNr) de cianobacterias asociadas a eventos de toxicidad*. (Maestría), Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), La Paz, Baja California Sur, México.
- Pérez-Morales, A., Olivos-Ortiz, A., Quijano-Scheggia, S. I., Espinosa-Rodríguez, C. A., & Jiménez-Santos, M. A. (2016). Estado actual del estudio de cianobacterias dulceacuícolas formadoras de florecimientos en el centro de México. En E. García-Mendoza, Quijano-Scheggia, S. I., Olivos-Ortiz, A., Núñez-Vázquez, E. J. (Ed.), *Florecimientos Algales Nocivos en México* (pp. 408-421). Ensenada, México: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).
- Pérez, D. S., Soraci, A. L., & Tapia, M. O. (2008). Cianobacterias y cianotoxinas: Rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua. *Analecta Veterinaria*, 28(1), 48-56.
- Pineda-Mendoza, R., Martínez-Jerónimo, F., Garduño-Solórzano, G., & Olvera-Ramírez, R. (2011). Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas aisladas de florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la ciudad de México. *Polibotánica*(31), 31-50.
- Prathumratana, L., Sthiannopkao, S., & Kim, K. W. (2008). The relationship of climatic and hydrological parameters to surface water quality in the lower Mekong River. *Environment international*, 34(6), 860-866.
- Reyes-Solís, I. E., Solís, C., Isaac-Olive, K., García, N. E., & Andrade, E. (2009). Fractionation analysis of trace metals in humic substances of soils irrigated with wastewater in Central Mexico by particle induced X-ray emission. *Microchemical Journal*, 91(1), 129-132.
- Richards, S., Paterson, E., Withers, P. J., & Stutter, M. (2015). The contribution of household chemicals to environmental discharges via effluents: combining chemical and behavioural data. *Journal of Environmental Management*, 150, 427-434.
- Rivera-Gutiérrez, J. V. (2016). Determinación de las tasas de oxidación, nitrificación y sedimentación en el proceso de autopurificación de un río de montaña. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 24(2), 314-326.
- Rubio-Franchini, I., López-Hernández, M., Ramos-Espinosa, M. G., & Rico-Martínez, R. (2016). Bioaccumulation of metals arsenic, cadmium, and lead in zooplankton and fishes from the Tula River Watershed, Mexico. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(1), 5.

- Scholz, R. W., Hellums, D. T., & Roy, A. A. (2015). Global sustainable phosphorus management: a transdisciplinary venture. *Current Science*, 108(7), 1237-1246.
- Sepkoski, J. J. (1988). Alpha, beta, or gamma: where does all the diversity go? *Paleobiology*, 14(3), 221-234.
- Siebe, C., Chapela-Lara, M., Cayetano-Salazar, M., Prado, B., & Siemens, J. (2016). Effects of more than 100 years of irrigation with Mexico City's wastewater in the Mezquital Valley. En H. Hettiarachchi, Ardakanian, R. (Ed.), *Safe use of wastewater in agriculture: Good practice examples* (pp. 121-138). Dresden: UNU-FLORES.
- Sutton, M. A., Bleeker, A., Howard, C., Erisman, J., Abrol, Y., Bekunda, M., Datta, A., Davidson, E., de Vries, W., & Oenema, O. (2013). *Our nutrient world. The challenge to produce more food & energy with less pollution*. Retrieved from Edinburgh, Reino Unido:
- Sutton, M. A., Oenema, O., Erisman, J. W., Leip, A., van Grinsven, H., & Winiwarter, W. (2011). Too much of a good thing. *Nature*, 472(7342), 159-161.
- Tamaki, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Nakamura, K., Nomura, N., Matsumura, M., & Kamagata, Y. (2005). Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2162-2169.
- Tang, Y.-W., Ellis, N. M., Hopkins, M. K., Smith, D. H., Dodge, D. E., & Persing, D. H. (1998). Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12), 3674-3679.
- Techtmann, S. M., & Hazen, T. C. (2016). Metagenomic applications in environmental monitoring and bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(10), 1345-1354.
- Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics: A guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2(1), 3.
- Van Liere, L., & Mur, L. R. (1979). Growth kinetics of *Oscillatoria agardhii* Gomont in continuous culture, limited in its growth by the light energy supply. *Microbiology*, 115(1), 153-160.
- Van Vliet, M., & Zwolsman, J. (2008). Impact of summer droughts on the water quality of the Meuse river. *Journal of Hydrology*, 353(1-2), 1-17.
- Wallace, R. B., Baumann, H., Grear, J. S., Aller, R. C., & Gobler, C. J. (2014). Coastal ocean acidification: The other eutrophication problem. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 148, 1-13.
- Whittaker, R. H. (1960). Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological monographs*, 30(3), 279-338.
- WHO. (1996). *Water quality assessments: a guide to the use of biota, sediments, and water in environmental monitoring* (D. V. Chapman Ed.). Londres, Reino Unido: E & FN Spon.
- WHO. (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring, and management* (I. Chorus, Bartram, J. Ed.). Londres, Reino Unido: E & FN Spon.
- Woo, P. C. Y., Ng, K. H. L., Lau, S. K. P., Yip, K.-t., Fung, A. M. Y., Leung, K.-w., Tam, D. M. W., Que, T.-l., & Yuen, K.-y. (2003). Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based

bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 1996-2001.

Zarull, M. A., Hartig, J. H., & Krantzberg, G. (2002). Ecological Benefits of Contaminated Sediment Remediation. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 174, 1-18.

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., & Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30(5), 614-620.

## Referencias páginas web

Beraldi, H. (2019). Estromatolitos. Disponible en <http://www.geologia.unam.mx:8080/igl/index.php/difusion-y-divulgacion/temas-selectos/571-estromatolitos>

Cruz-Sánchez, A. (2011). Se riegan con aguas negras 60% de cultivos agrícolas en Hidalgo. Disponible en <http://www.jornada.com.mx/2011/03/12/estados/032n1est>

Duro-Rodríguez, J. M., Vaquero-Molina, J., Del Cuervo-Martínez-Ridruejo, A., & Torralba-Bozzano, E. (2014). Planta de tratamiento de aguas residuales de Atotonilco, la mayor depuradora del mundo. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6778988>

Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental (2017). Inventario de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) (2016) (Conagua). Disponible en <https://agua.org.mx/biblioteca/catalogo-plantas-tratamiento-aguas-residuales-ptar-2016/>

Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental (2018). Aguas residuales y contaminación en México. Disponible en <https://agua.org.mx/actualidad/aguas-residuales-contaminacion-en-mexico/>

INEGI. (2014). Agua. Disponible en <https://www.inegi.org.mx/temas/agua/>

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. Disponible en <http://www.rstudio.com/>

## 12 Anexos

Anexo 1. Soluciones stock para medio de cultivo BG-11<sub>0</sub> (Andersen, 2005) (modificado).

<b>Reactivo</b>	<b>Solución Stock (g·L<sup>-1</sup> dH<sub>2</sub>O)</b>	<b>Cantidad para 1 L de medio (mL)</b>
Ácido cítrico	0.6	10
Citrato de amonio férrico	0.6	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	4	10
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	7.5	10
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3.6	10
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2	10
EDTA	0.1	10
Mezcla de metales traza	Ver Anexo 2	1

Anexo 2. Metales traza para medio de cultivo BG-11<sub>0</sub> (Andersen, 2005) (modificado).

<b>Compuesto</b>	<b>Solución Stock (g·L<sup>-1</sup> dH<sub>2</sub>O)</b>	<b>Cantidad para 100 mL de la mezcla</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-	0.286 g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	-	0.181 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	-	0.0222 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.079	1 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	-	0.039 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0494	1 mL

Anexo 3. Cantidades de cicloheximida utilizadas para medio de cultivo BG-11<sub>0</sub> (Jacinavicius *et al.*, 2013).

<b>Medio diluido (mL)</b>	<b>Cicloheximida (g)</b>
-------------------------------	------------------------------

1000	0.05
500	0.025
300	0.015
100	0.005

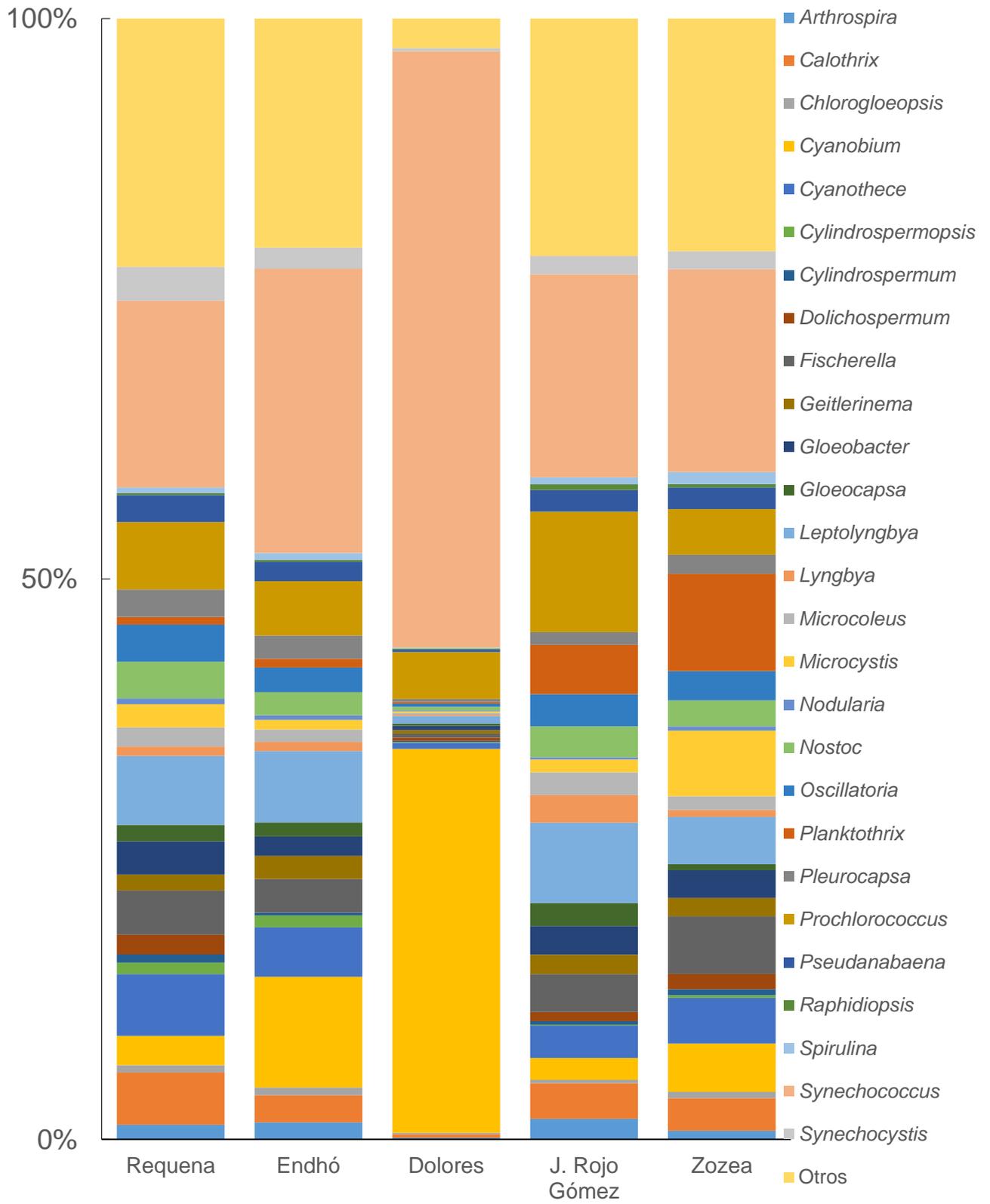
Anexo 4. Abundancia de los géneros de cianobacterias (gen 16S rRNA).

<b>Género</b>	<b>Requena</b>	<b>Endhó</b>	<b>Dolores</b>	<b>J. Rojo Gómez</b>	<b>Zozea</b>
<i>Aphanothece</i>	—	—	0.07%	—	—
<i>Chlorogloeopsis</i>	—	—	—	—	0.52%
<i>Dolichospermum</i>	33.33%	—	0.39%	—	—
<i>Fischerella</i>	—	—	0.05%	—	—
<i>Limnothrix</i>	—	—	—	—	2.10%
<i>Microcystis</i>	—	—	—	—	13.91%
<i>Nodularia</i>	—	—	0.07%	6.67%	—
<i>Oscillatoria</i>	—	—	—	—	1.05%
<i>Planktothrix</i>	—	2.37%	—	66.67%	51.71%
<i>Pleurocapsa</i>	—	—	—	6.67%	—
<i>Prochlorococcus</i>	33.33%	48.62%	99.15%	—	24.93%
<i>Raphidiopsis</i>	—	—	0.04%	—	4.72%
<i>Synechococcus</i>	—	—	—	—	0.52%
<i>No clasificados</i>	23.81%	46.64%	—	6.67%	—
<i>Otros</i>	9.52%	2.37%	0.23%	13.33%	0.52%

Nota: La sección 'Otros' incluye todos los géneros de cianobacterias que no se pudieron clasificar con la base de datos EzBioCloud-LGM 2018, ya que son clados que están bajo revisión taxonómica.

Anexo 5. Abundancia relativa de los géneros de cianobacterias (metagenomas), con su gráfica correspondiente.

<b>Género</b>	<b>Requena</b>	<b>Endhó</b>	<b>Dolores</b>	<b>J. Rojo Gómez</b>	<b>Zozea</b>
<i>Arthrospira</i>	1.31%	1.51%	0.14%	1.84%	0.77%
<i>Calothrix</i>	4.67%	2.43%	0.33%	3.17%	2.92%
<i>Chlorogloeopsis</i>	0.63%	0.69%	0.12%	0.31%	0.54%
<i>Cyanobium</i>	2.62%	9.91%	34.25%	1.94%	4.31%
<i>Cyanothece</i>	5.52%	4.41%	0.54%	2.87%	4.08%
<i>Cylindrospermopsis</i>	1.02%	1.06%	0.06%	0.10%	0.23%
<i>Cylindrospermum</i>	0.74%	0.23%	0.10%	0.31%	0.54%
<i>Dolichospermum</i>	1.76%	—	0.31%	0.82%	1.38%
<i>Fischerella</i>	3.93%	3.03%	0.35%	3.38%	5.15%
<i>Geitlerinema</i>	1.42%	2.07%	0.32%	1.74%	1.62%
<i>Gloeobacter</i>	2.96%	1.74%	0.37%	2.56%	2.46%
<i>Gloeocapsa</i>	1.48%	1.24%	0.20%	2.05%	0.54%
<i>Leptolyngbya</i>	6.15%	6.38%	0.69%	7.16%	4.23%
<i>Lyngbya</i>	0.85%	0.83%	0.10%	2.46%	0.62%
<i>Microcoleus</i>	1.71%	1.10%	0.17%	2.05%	1.23%
<i>Microcystis</i>	2.05%	0.87%	0.13%	1.13%	5.85%
<i>Nodularia</i>	0.51%	0.41%	0.08%	0.20%	0.38%
<i>Nostoc</i>	3.30%	2.07%	0.33%	2.76%	2.31%
<i>Oscillatoria</i>	3.30%	2.20%	0.29%	2.87%	2.62%
<i>Planktothrix</i>	0.68%	0.78%	0.15%	4.40%	8.69%
<i>Pleurocapsa</i>	2.45%	2.07%	0.26%	1.13%	1.69%
<i>Prochlorococcus</i>	6.03%	4.86%	4.18%	10.75%	4.08%
<i>Pseudanabaena</i>	2.39%	1.74%	0.23%	1.94%	1.92%
<i>Raphidiopsis</i>	0.17%	0.18%	0.11%	0.51%	0.31%
<i>Spirulina</i>	0.51%	0.60%	0.08%	0.61%	1.08%
<i>Synechococcus</i>	16.68%	25.42%	53.20%	18.12%	18.08%
<i>Synechocystis</i>	3.02%	1.88%	0.28%	1.64%	1.62%
Otros	22.14%	20.47%	2.63%	21.18%	20.75%



Anexo 6. Phyla de eucariontes en función de la metagenómica dirigida al gen 16S rRNA.

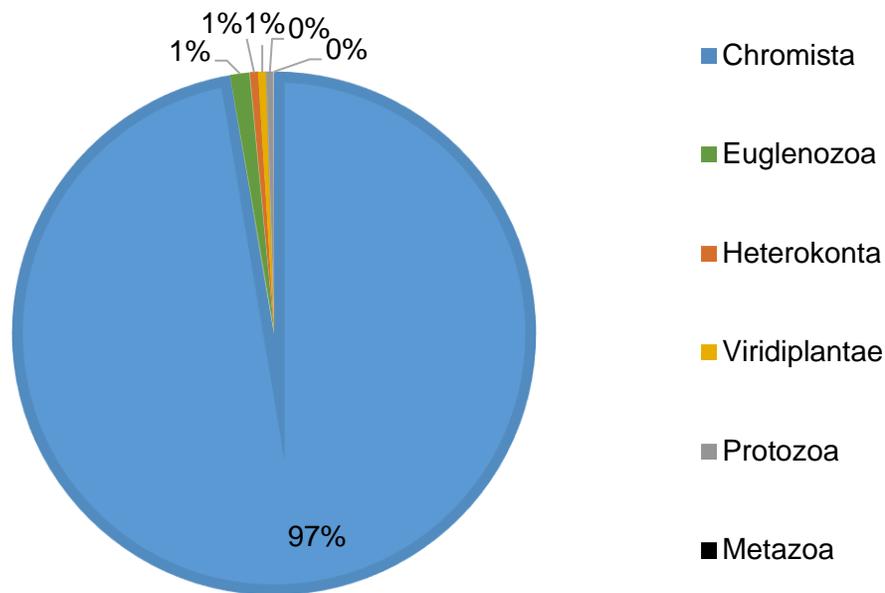


Figura A6.1. Presa Zozea.

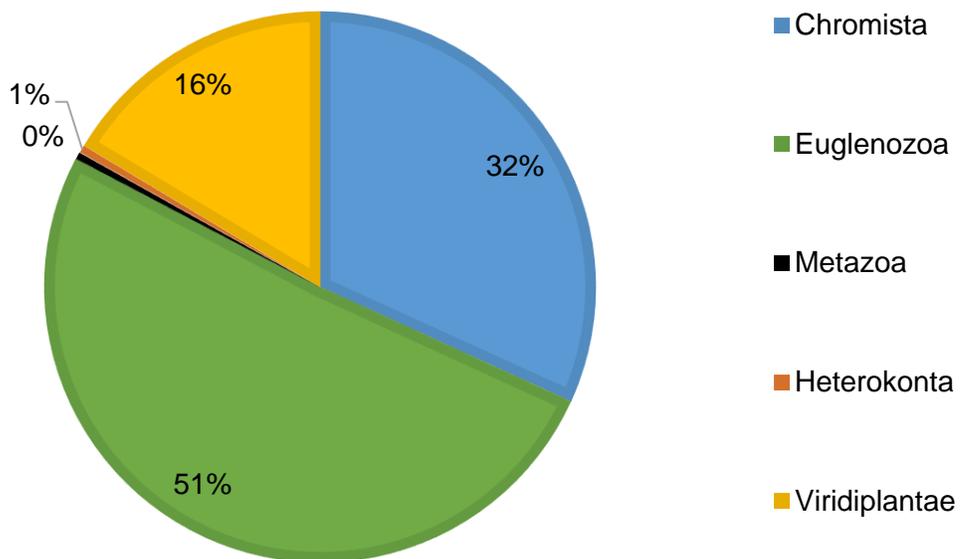


Figura A6.2. Presa Javier Rojo Gómez.

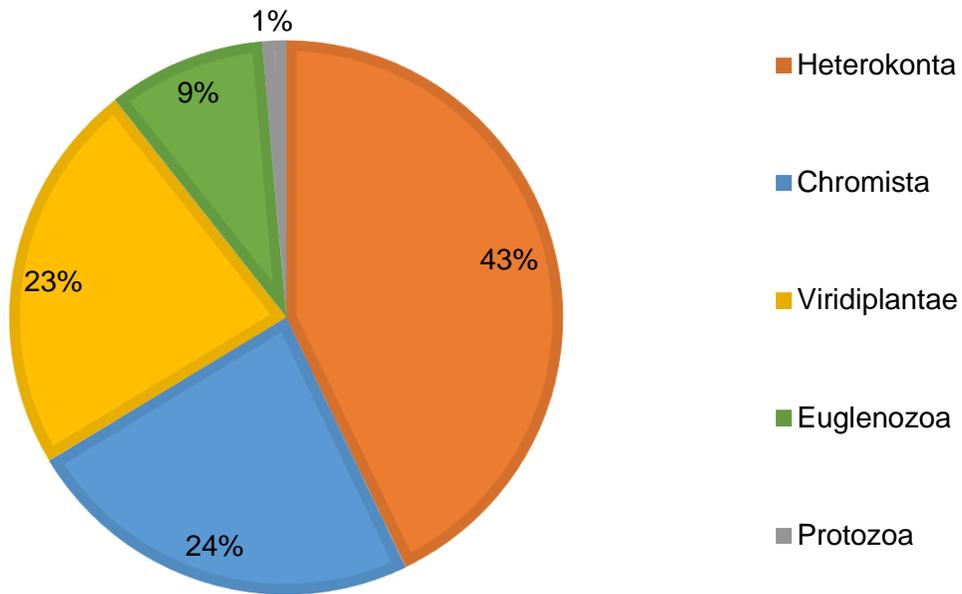


Figura A6.3. Presa Dolores.

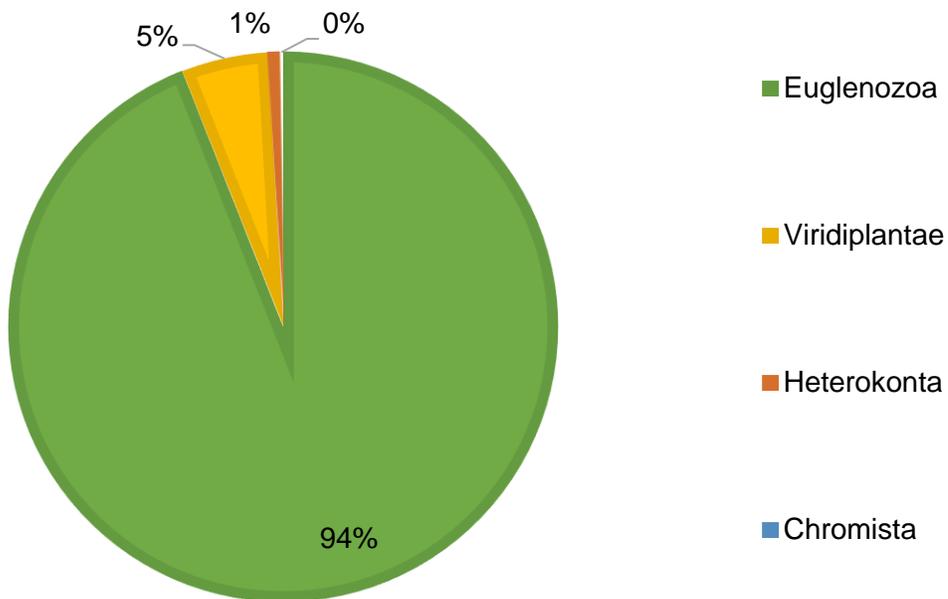


Figura A6.4. Presa Endhó.

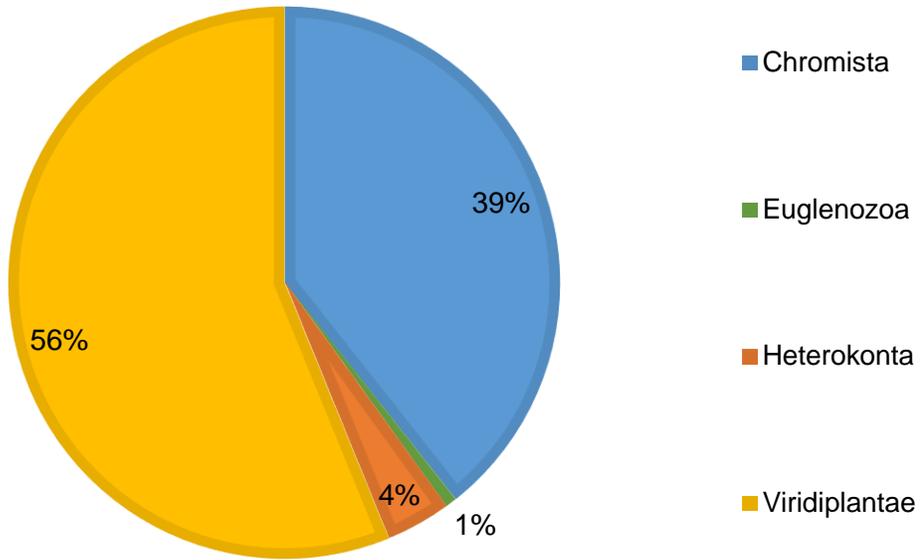


Figura A6.5. Presa Requena.

Anexo 7. Phyla de arqueas en función de la metagenómica *shotgun* estructural.

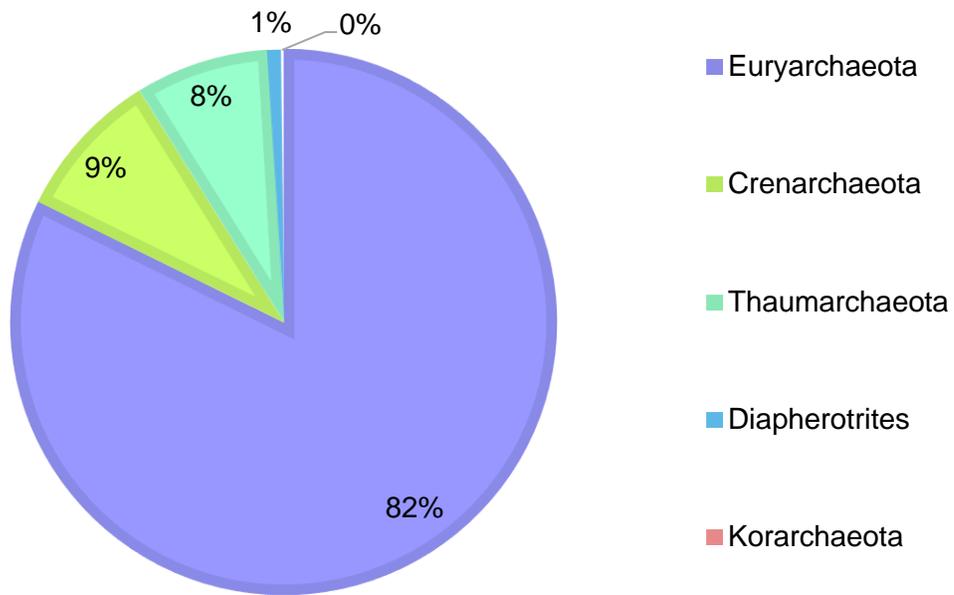


Figura A7.1. Presa Zozea.

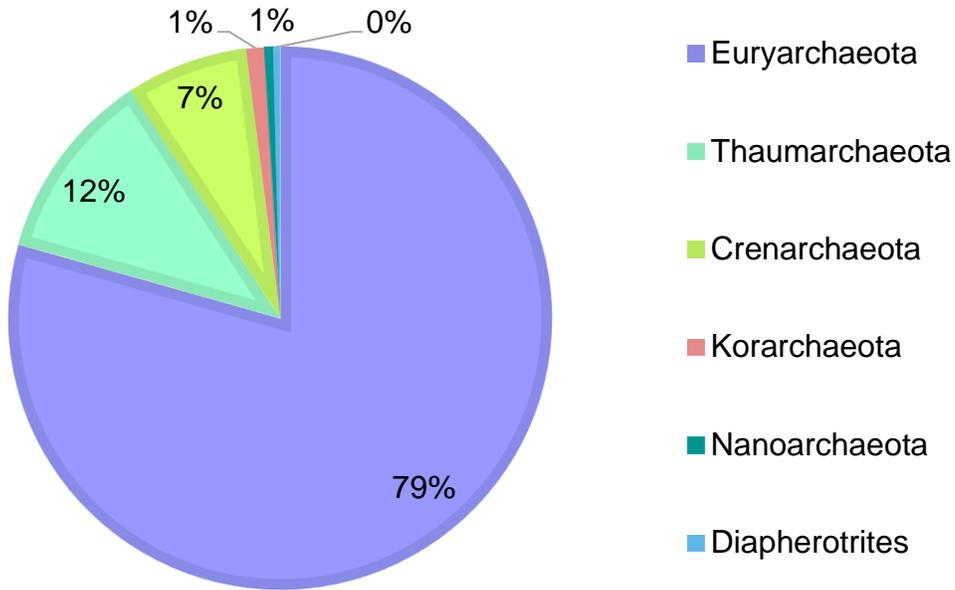


Figura A7.2. Presa Javier Rojo Gómez.

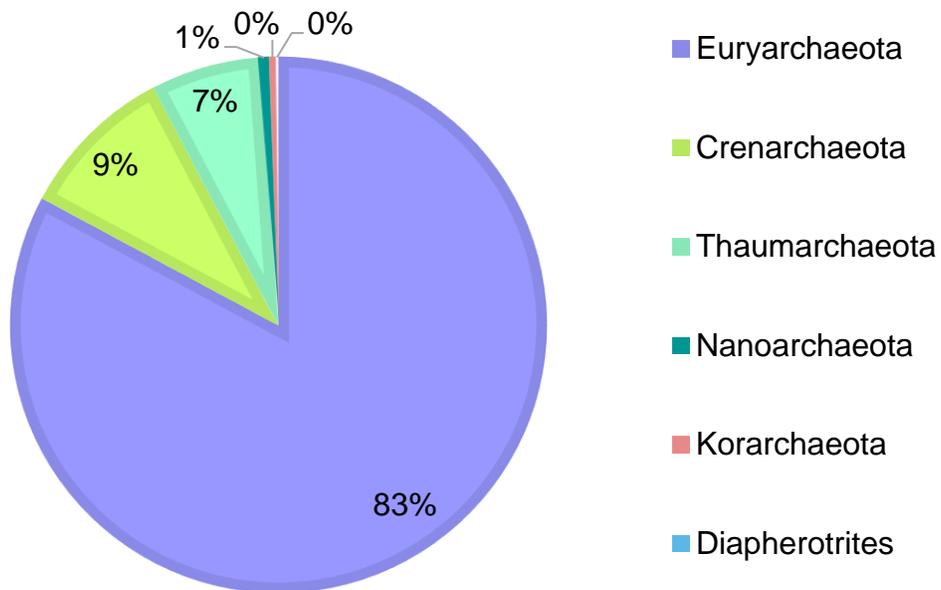


Figura A7.3. Presa Dolores.

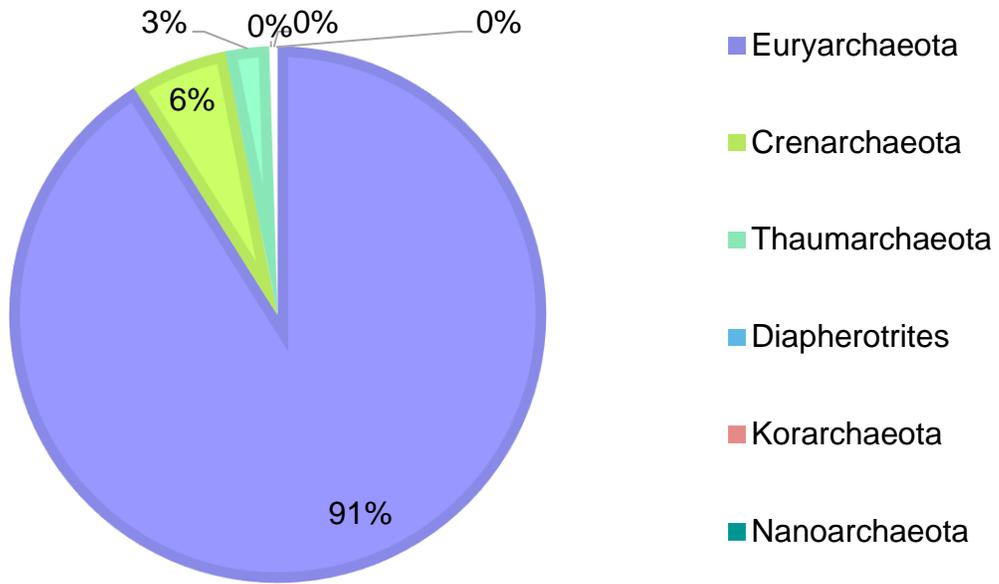


Figura A7.4. Presa Endhó.

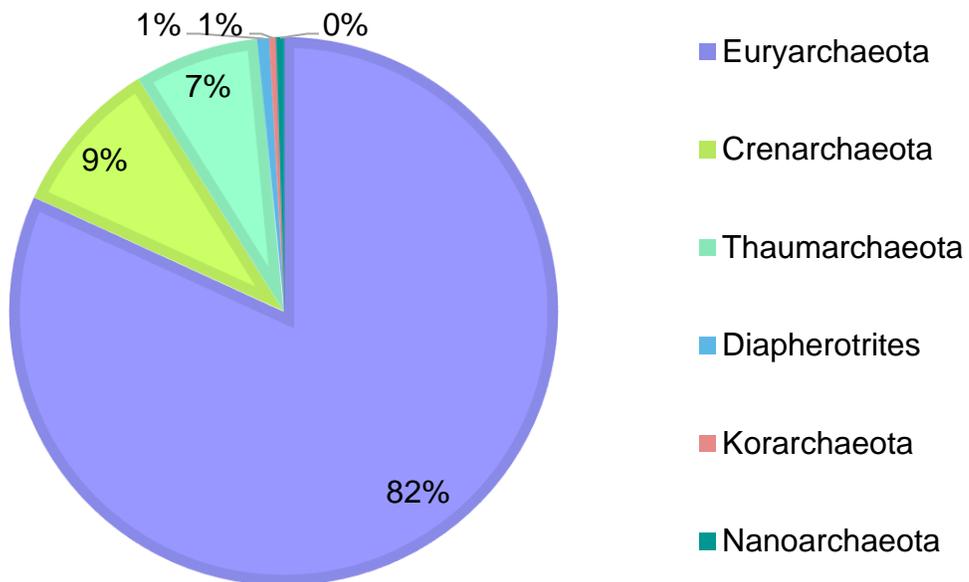


Figura A7.5. Presa Requena.

## Anexo 8. Tabla de los componentes principales.

Tabla que se obtuvo con el software R v. 3.4.2 que explica el 100% de la variabilidad de los datos analizados con sus respectivos valores propios (Eigenvalue), proporción de varianza explicada (Proportion) y la varianza explicada acumulada (Cumulative):

Importance of components:

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
Eigenvalue	10.031	4.1413	2.6240	1.64675	0.99023	0.84551	0.43206	0.38351
Proportion	0.456	0.1882	0.1193	0.07485	0.04501	0.03843	0.01964	0.01743
Cumulative	0.456	0.6442	0.7635	0.83832	0.88333	0.92176	0.94140	0.95883

	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15
Eigenvalue	0.34581	0.26094	0.116065	0.086344	0.067238	0.026164	0.0031392
Proportion	0.01572	0.01186	0.005276	0.003925	0.003056	0.001189	0.0001427
Cumulative	0.97455	0.98641	0.991687	0.995612	0.998668	0.999857	1.0000000

Scaling 2 for species and site scores

\* Species are scaled proportional to eigenvalues