



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**MICROORGANISMOS PROCARIOTAS DEL ACUÍFERO KÁRSTICO
DE LA COSTA NORESTE DE QUINTANA ROO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
LIMNOLOGÍA

PRESENTA:

ANA KARINA HERNÁNDEZ GARCÍA

TUTOR(A) O TUTORES PRINCIPALES:

DRA. ROCIO J. ALCÁNTARA HERNÁNDEZ
(INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DR. MARTÍN MERINO IBARRA
(INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM)

DR. RAFAEL LÓPEZ MARTÍNEZ
(INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM)

DR. MIROSLAV MACEK
(FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, IZTACALA, UNAM)

DR. JAVIER ALCOCER DURAND
(FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM)

CD. MX., SEPTIEMBRE 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.



MICROORGANISMOS PROCARIOTAS DEL ACUÍFERO KÁRSTICO DE LA COSTA NORESTE DE QUINTANA ROO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO(A) EN CIENCIAS
LIMNOLOGÍA

PRESENTA:
ANA KARINA HERNÁNDEZ GARCÍA

TUTOR(A) O TUTORES PRINCIPALES:
DRA. ROCIO J. ALCÁNTARA HERNÁNDEZ
(INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM)

COMITÉ TUTOR:
DR. MARTÍN MERINO IBARRA
(INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM)
DR. RAFAEL LÓPEZ MARTÍNEZ
(INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM)
DR. MIROSLAV MACEK
(FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, IZTACALA, UNAM)
DR. JAVIER ALCO CER DURAND
(FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM)

MÉXICO, CD. MX., MES SEPTIEMBRE 2020



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**Microorganismos procariotas del acuífero kárstico de la costa
noreste de Quintana Roo**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

LIMNOLOGÍA

PRESENTA:

ANA KARINA HERNÁNDEZ GARCÍA

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. ROCIO J. ALCÁNTARA HERNÁNDEZ
(INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DR. RAFAEL LÓPEZ MARTÍNEZ
DR. MARTÍN MERINO IBARRA
DR. MIROSLAV MACEK
DR. JAVIER ALCOCER DURAND

INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, IZTACALA, UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

Agradecimientos Institucionales

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado (CVU: 895038). Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por el soporte académico, y por la formación académica y profesional brindada. Al PAEP para la realización de la práctica de campo de la materia de karstología.

Esta investigación se realizó gracias al financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica UNAM-DGAPA-PAPIIT IA202518; Proyecto: *“Metabolismos bacterianos en el antropoceno: presencia y diversidad de genes bacterianos para degradación de xenobióticos en sistemas terrestres y acuáticos de México”*, otorgado a la Dra. Rocío J. Alcántara Hernández.

Se agradece a los Drs. Rafael A. López Martínez, Martín Merino Ibarra, Miroslav Macek y Javier Alcocer Durand por su apoyo científico y técnico, así como su acertada asesoría para lograr esta tesis.

Agradezco el apoyo técnico de la Dra. Olivia Zamora Martínez por la determinación de aniones y cationes mayoritarios por medio de cromatografía de iones en las muestras de agua; al M. en C Javier Tadeo Leon, por su apoyo técnico en los análisis de elementales por ICP óptico; al Hidr. Fermín Sergio Castillo Sandoval, por su apoyo técnico en los análisis de nutrientes en agua; al Dr. Ulises Durán Hinojosa, por su apoyo en el análisis de carbono en agua; y a las Dras. Yislem Beltrán y Patricia Thomé por su apoyo técnico en la Unidad Puerto Morelos.

Agradecemos también al Laboratorio de Cromatografía y al Laboratorio de Espectroscopia Atómica, ambos del Departamento de Ciencias Ambientales y del Suelo del Instituto de Geología y al Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía-LANGEM de la UNAM, por el uso de sus instalaciones, equipos y materiales para llevar a cabo parte del desarrollo de la parte experimental del presente trabajo de tesis. Así como al Laboratorio de Biogeoquímica Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

Agradecimientos a título personal

A la persona más importante de mi vida; mi mamá, por ser un gran ejemplo como mujer, por su apoyo incondicional, su amor, paciencia y por cada una de las palabras de aliento que me ha brindado, no sólo en esta etapa, sino a lo largo de toda mi formación académica.

A la Dra. Rocio por la confianza al permitirme trabajar con ella, por todo el apoyo recibido no sólo en cada etapa del proyecto sino también por facilitarme el desarrollo de actividades que complementaron mi aprendizaje, y por todas las enseñanzas.

A Jazmín no sólo por ser una amiga, sino por ser también, una maestra para mí y que con todo su amor y paciencia me dedico tiempo para que conociera las técnicas de laboratorio.

A Nayeli por ser amiga, confidente y maestra durante este tiempo, por brindarme su apoyo y demostrarme que no estoy sola; también por facilitarme las herramientas necesarias que me permitieron no sólo cumplir este objetivo, sino lograrlo de la mejor forma posible.

A David por tener las palabras correctas en el momento correcto y brindarme su apoyo a pesar del poco tiempo de conocernos.

A Jesús y Lalo por ser los primeros en integrarme al grupo y brindarme su amistad.

A Mariel, quién ha sido un ejemplo para mí, por dedicarme de su tiempo, por su paciencia y el por conocimiento compartido.

Y por último y no menos importante a Laura, por todas las herramientas brindadas para superar cada situación, por sus palabras de aliento, por creer en mí cuando yo no lo he hecho y ayudarme a ganar pequeñas batallas durante esta etapa.

Resumen

La Península de Yucatán en México cuenta con uno de los acuíferos kársticos más grandes del mundo, donde uno de sus rasgos geológicos más importantes son las cuevas inundadas conocidas coloquialmente como *cenotes*. Este acuífero es la principal fuente de agua potable de la zona, pero es altamente susceptible a contaminarse por sus características intrínsecas. Del 2010 al 2015, el noreste de la Península ha mostrado altas tasas de crecimiento demográfico, con municipios como Benito Juárez y Solidaridad con un crecimiento anual del 2.6 y 6.0%, respectivamente; muy por encima del promedio anual del país, por lo que existe una gran presión sobre el recurso agua. A la fecha, los principales estudios microbiológicos del acuífero de la zona se han enfocado a la calidad bacteriológica del agua; sin embargo, no hay estudios sobre sus microorganismos procariontes, los cuales conforman la microbiota del acuífero. Los objetivos de este estudio fueron: i) caracterizar el ambiente hidroquímico del acuífero a través del análisis de iones, nutrientes, carbono y metales, ii) determinar la diversidad bacteriana en muestras de agua, sedimentos y tapetes mediante secuenciación masiva del marcador 16S rRNA, y iii) establecer las relaciones entre la estructura de la comunidad acuática y las condiciones hidroquímicas encontradas. Para ello, se tomaron muestras del acuífero somero del Noreste de Quintana Roo relacionadas con cinco cenotes, algunos de ellos con la presencia de haloclina debido a su cercanía con la línea de costa. De acuerdo con la caracterización hidroquímica, tres sitios fueron clasificados como anquihalinos y presentaron una mayor diversidad procariótica debido a la presencia de haloclina y agua meteórica. El género *Nitrosopumilus* (dominio Archaea) fue el de mayor abundancia relativa en las muestras de agua de la haloclina; mientras que, bacterias de la familia Comamonadaceae (Betaproteobacteria) fueron mayoritarias en el agua meteórica. Respecto a las muestras de sedimentos y tapetes microbianos, los sedimentos presentaron una mayor diversidad y riqueza que los tapetes, donde bacterias de la familia Chromatiaceae estuvieron presentes exclusivamente en los tapetes microbianos. De los parámetros hidroquímicos determinados, se encontró que las concentraciones de nutrientes y metales disueltos no exceden los límites máximos establecidos por la normatividad mexicana correspondiente al agua destinada para consumo humano. Este estudio representa una primera exploración de la diversidad procariota del acuífero somero del noroeste de Quintana Roo y muestra la gran diversidad microbiana que existe en éste.

Abstract

The Yucatan Peninsula in Mexico has one of the largest karstic aquifers in the world, where one relevant geological feature is the presence of subaqueous caves, locally called *cenotes*. This aquifer is the main source of drinking water in the zone, but it is highly susceptible to contamination due to its intrinsic nature. From 2010 to 2015, the northeast of the peninsula has shown high demographic growth rates, with municipalities such as Benito Juarez and Solidaridad with an annual growth of 2.6 and 6.0%, respectively, high above from the national average; hence, there is a great pressure over the water resource. To date, the main microbiological studies of the aquifer have focused in the water's bacteriological quality; however, there are not studies about its prokaryotic microorganisms, which conform the aquifer's microbiota. The objectives of this studies were: i) to characterize the hydrochemical environment of the aquifer through ion, nutrient, carbon and metal analyses, ii) to determine the bacterial diversity in samples from water, sediments and mats using high-throughput sequencing of the 16S rRNA marker, and iii) to establish the relationships among the aquatic community structure and the hydrochemical conditions found. For these purposes, samples of the shallow aquifer were taken in five cenotes of the Northeast of Quintana Roo, some of them with the presence of a halocline due to its nearness to the coastline. According to the hydrochemical characterization, three sites were classified as anchialine and presented a higher prokaryotic diversity due to the presence of halocline and meteoric water. The genus *Nitrosopumilus* (domain Archaea) was the one with the highest relative abundance in the water samples from the halocline; while, bacteria from the family Comamonadaceae (Betaproteobacteria) were the most represented in the meteoric water. Regarding the sediments and mats samples, the sediments showed a higher diversity and richness, where bacteria from the Chromatiaceae family were exclusively present in the microbial mats. From the hydrochemical parameters determined, it was found that the nutrient and dissolved metal concentrations were below the maximum limits established for the Mexican normativity for drinking water. This study represents a first exploration of the prokaryotic diversity of the shallow aquifer of the Northeast of Quintana Roo and shows the great microbial diversity that exists in it.

Índice

Agradecimientos Institucionales	ii
Agradecimientos a título personal	iii
Resumen.....	iv
Abstract	v
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	2
2.1 Acuíferos kársticos	2
2.2 El sistema kárstico de la Península de Yucatán	2
2.2.1 Origen y rasgos geológicos	3
2.2.2 Clima de la región.....	3
2.2.3 Cuevas inundadas de la Península	4
2.2.4 Estudios hidroquímicos en las cuevas inundadas de la Península	5
2.3 Microbiología de los acuíferos kársticos	6
2.3.1 Estudios microbiológicos en cuevas inundadas de la Península de Yucatán	6
2.4 Técnicas independientes de cultivo para la caracterización de comunidades bacterianas en los acuíferos	7
2.4.1 Técnicas independientes de cultivos y estudios en la Península	7
2.5. Procesos biogeoquímicos detectados en acuíferos kársticos.....	8
3. Justificación	10
4. Pregunta de investigación	10
5. Hipótesis.....	10
6. Objetivos	11
6.1 General	11
6.2 Específicos	11
7. Área de estudio	12

7.1 Quintana Roo	12
7.2 Cuevas subterráneas y cavernas inundadas estudiadas en este proyecto	13
8. Materiales y Métodos	15
8.1 Muestreo	15
8.2 Parámetros fisicoquímicos determinados <i>in situ</i>	16
8.3 Análisis hidroquímicos.....	16
8.3.1 Nutrientes totales y disueltos	16
8.3.2 Iones mayores solubles	16
8.3.3 Metales solubles.....	16
8.3.4 Carbono	17
8.4 Extracción de DNA para el análisis del componente biológico	17
8.4.1 Amplificación y secuenciación de gen 16S rRNA.....	17
8.4.2. Análisis bioinformático y de agrupamiento de muestras	18
9. Resultados	20
9.1 Caracterización química de la columna de agua, sitios anquihalinos y no anquihalinos.....	20
9.2. Diversidad bacteriana en el acuífero de la zona de estudio	24
9.2.1 Secuencias 16S rRNA obtenidas	24
9.4. Distribución taxonómica en el acuífero de la zona de estudio	29
9.5. Perturbación antrópica	32
9.6. Diversidad bacteriana y el ambiente hidroquímico	36
10. Discusión	41
10.1 Caracterización química de la columna de agua	41
10.2 Distribución taxonómica	41
10.3 Perturbación antrópica	42
10.4 Diversidad bacteriana y el ambiente hidroquímico	44
Conclusiones	46

12 Referencias.....	47.
13 Anexos.....	52

1. Introducción

Los sistemas subterráneos son de vital importancia, ya que albergan a los acuíferos que abastecen de agua potable al planeta; de los cuales, algunos de éstos residen en sistemas kársticos. El término *karst* hace referencia a un tipo de topografía superficial y subterránea formada principalmente por rocas con gran capacidad de solubilidad como la caliza, y con menor frecuencia de dolomita, yeso u otras rocas (Cernatič-Zega 2010). El agua, al llegar a un sistema kárstico, se infiltra rápidamente a través de fisuras o discontinuidades presentes en la roca, creando así un sistema de conductos y cuevas subterráneas; los cuales además se van configurando por la disolución de los carbonatos. Estos procesos dan paso a la formación de acuíferos que pueden llegar a presentar la única fuente de agua potable para muchas regiones.

A nivel mundial, los ambientes kársticos cubren entre el 15 y 20% de la superficie continental aproximadamente (Engel 2011). En México, se cuenta con uno de los acuíferos kársticos más grandes a nivel mundial, localizado en la Península de Yucatán (Bauer-Gottwein et al., 2011). Dada su relevancia para la zona, comienzan a existir estudios sobre la hidrología y contaminación de estos sistemas kársticos; pero a la fecha existen pocos datos de su microdiversidad. Por ello, es necesario comenzar a explorar la diversidad microbiana de estas ventanas kársticas y cuevas inundadas en la Península de Yucatán, para relacionar la estructura de las comunidades microbianas en el manto acuífero con los nutrientes y posibles contaminantes debido a la intensa actividad antrópica.

Así mismo, durante los últimos años, el estudio de las comunidades microbianas por metodologías independientes del cultivo, han permitido descubrir una gran diversidad microbiana en el agua subterránea. Esta microbiota es capaz de llevar varios procesos subsuperficiales que ayudan a la remoción de contaminantes en el acuífero, mejorando entonces la calidad del agua subterránea. Sin embargo, en México existen pocos estudios sobre la diversidad microbiana en acuíferos. Aguilar (2018) demostró que el acuífero somero de una zona agrícola llegaba a contener hasta 800 ASVs, y algunas de ellas ayudaban a la remoción de NO_3^- en el subsuelo.

La costa noreste de Quintana Roo se encuentra rodeada de lugares con alta densidad turística y consecuentemente, con alta propensión a la contaminación antrópica. Sin embargo, existen pocos estudios la diversidad microbiana del acuífero en esta zona y su relación con su hidroquímica. Derivado de ello, surge este proyecto para determinar la diversidad microbiana en un acuífero kárstico y relacionarla con su hidroquímica.

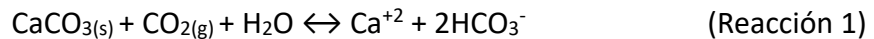
2. Marco Teórico

2.1 Acuíferos kársticos

Los acuíferos kársticos representan la fuente principal de agua dulce en muchas regiones del mundo; y de acuerdo con algunas estimaciones, aproximadamente entre el 20 y 25% de la población mundial depende de éstos (Chen et al., 2017).

Los carbonatos presentes en las rocas calizas de estos sistemas pueden ser fácilmente disueltos por la acción de soluciones ácidas, lo que le confiere la particularidad de ser sitios con gran permeabilidad. Por ello, los ambientes kársticos se caracterizan por la ausencia de cuerpos de aguas superficiales, así como por la formación de grandes canales subterráneos (Kacaroglu, 1999).

La disolución de las rocas calizas se lleva a cabo cuando el agua meteórica se acidifica al contener CO₂ disuelto –ya sea de origen atmosférico o proveniente de la oxidación de la materia orgánica presente en el suelo–. Esta reacción da como producto ácido carbónico, el cual, al entrar en contacto con la roca comienza a disolverla (Reacción 1). Esta disolución es preferencial en zonas de fisuras y/o fracturas.



Consecuentemente, en estos casos, el agua del acuífero proviene de la lluvia (agua meteórica); y su circulación se realiza a través de una red interconectada subterránea de fisuras, canales y cavernas (Bakalowicz, 2005; Gray y Engel, 2015). Esto los convierte en sistemas únicos y complejos por su capacidad de autodesarrollo. Así mismo, la alta permeabilidad que presentan estos acuíferos los convierte en sitios susceptibles a ser contaminados (Chen et al., 2017). Finalmente, por sus propiedades hidrodinámicas, el transporte de contaminantes en estos acuíferos es tan rápido que no puede permitir la atenuación de los mismos (Kacarogku 1999).

2.2 El sistema kárstico de la Península de Yucatán

Geológicamente hablando, la Península de Yucatán es la región más joven de México y está formada por calizas, dolomitas y evaporitas que se superponen sobre un basamento de rocas ígneas y metamórficas (Kambesis et al., 2016). Esta Península contiene uno de los sistemas de ríos subterráneos más grandes del mundo (Herrera et al., 2011) y a continuación se describen algunas de sus características.

2.2.1 Origen y rasgos geológicos

Durante el Cretácico y hasta el Pleistoceno se presentaron varios eventos de transgresión resultado de las eras de hielo Illinois y Wisconsin (Coke, 2012). Como resultado, gran parte de la plataforma continental donde se encuentra la Península de Yucatán se sumergió en aguas someras tropicales y se formó un estrato de roca caliza (CaCO_3) y dolomita ($\text{MgCa}(\text{CO}_3)_2$) de origen biótico con un grosor aproximado de 2000 m (Vazquez-Dominguez et al., 2010; Coke, 2012; Rioja-Nieto et al., 2019).

Actualmente la Península de Yucatán es una plataforma parcialmente emergida (Bauer-Gottwein et al., 2011). En su porción norte presenta carbonatos y evaporitas del Mesozoico y Cenozoico; mientras que, en la parte sur se presentan rocas sedimentarias de las eras Paleozoica y Mesozoica (Isphording, 1975; Perry et al., 2003). La superficie de la plataforma sumergida está compuesta por carbonatos y conforma al banco Campeche–Yucatán, el cual se caracteriza por ser ancho y poco profundo (Isphording, 1975; Kambesis y Coke, 2016). El levantamiento de la Península tuvo lugar durante el Cenozoico de manera intermitente, originando diferentes sistemas de fracturas en la región norte de la Península (Coke, 2012; Fragoso-Servón et al., 2014). Mientras que, el relieve actual de la parte sur de la Península es resultado de varios eventos geológicos que tuvieron lugar durante el Eoceno (Perry et al., 2003; Fragoso-Servón et al., 2014). Así, la Península de Yucatán está formada por calizas, dolomitas y evaporitas que alcanzan un grosor mayor a los 1500 m, los cuales descansan sobre una basamento de roca ígneo metamórfico. Las rocas sedimentarias expuestas en superficie pertenecen al Cretácico superior y al Holoceno (Bauer-Gottwein et al., 2011).

La Península de Yucatán se caracteriza por la ausencia de rasgos orogénicos (formación de montañas) y en un sentido geológico, no sólo comprende los estados mexicanos de Yucatán, Campeche y Quintana Roo; sino también el Petén guatemalteco y el norte de Belice (Alcocer et al., 1998; Schmitter-Soto et al., 2002).

2.2.2 Clima de la región

El clima de la península de Yucatán es cálido subhúmedo con lluvias principalmente durante los meses de mayo a julio. Existe un gradiente de lluvias que va de este a oeste; siendo el Caribe la zona que recibe mayor precipitación (>1500 mm por año) (Kambesis y Coke, 2016; Smart et al., 2006). Esto se ve reflejado en la vegetación con zonas áridas en el noroeste, pasando por selvas bajas y medianas subcaducifolias y caducifolias; hasta selvas altas en el sur, cerca de Chiapas (Smart et al., 2006; Beddws et al., 2007; Bauer-Gottwein et al., 2011). Asimismo, la región carece de cuerpos de agua superficial sobre todo en la parte norte debido a que la mayor parte del agua de lluvia se infiltra en el

subsuelo (Schmitter-Soto et al., 2002); excepto en la zona sur (límites del Estado de Quintana Roo, y Guatemala y Belice) (Velázquez-Aguirre, 1986; Beddows et al., 2007; Bauer-Gottwein et al., 2011; Kambesis y Coke 2016).

2.2.3 Cuevas inundadas de la Península

Una de las características geológicas más importantes de la península de Yucatán, son los *cenotes* o cuevas inundadas, los cuales son definidos como dolinas de colapso o ventanas kársticas, ya que son originados por el colapso del techo de las cuevas (Sauro, 2003). La palabra *cenote* viene del vocablo maya *ts'ono'ot* o *d'zont*, que significa “caverna con depósito de agua”. Por su origen, se definen como lagos de disolución generados por la actividad del agua sobre la roca soluble. Éstos se concentran en la parte norte, y a lo largo de una línea imaginaria situada entre Tulum, Quintana Roo y Campeche, disminuyendo su aparición hacia el sur de la península. Tan sólo en el estado de Yucatán, se calculan entre 7 y 8 mil cenotes; mientras que, para los estados de Campeche y Quintana Roo, se ha dificultado este cálculo por la cobertura de bosque (Beddows et al., 2007).

Además de fungir como atracción turística, los cenotes representan una fuente de agua dulce especialmente para zonas rurales. Debido a la alta permeabilidad de la roca kárstica, el agua de lluvia o meteórica se infiltra y acumula en el subsuelo o en las cuevas, formando así una lente de agua dulce delgada, la cual es recargada únicamente por las lluvias estacionales (Beddows et al., 2007). Estos sistemas son más vulnerables que los mantos acuíferos, ya que los contaminantes no sólo llegan a través del subsuelo (sufriendo transformación o dilución), sino también de forma directa (Alcocer et al., 1998; Schmitter-Soto, 2002).

Asimismo, el agua dulce frecuentemente posa sobre una masa de agua salina más densa, cuyo origen es la intrusión marina natural; creando así, un perfil de tres capas de agua. La primera (o la más superficial) es una capa de agua dulce proveniente del agua meteórica. Debajo de ésta, se encuentra una segunda capa de agua salobre, también conocida como haloclina, resultados de una mezcla entre el agua meteórica y la marina. Finalmente, la tercera capa de agua pertenece a la intrusión del agua de mar. La profundidad de la haloclina, así como el grosor de la capa superficial de agua dulce, se verán influenciadas por la ubicación de los cenotes, es decir, por la altitud (m s.n.m.) a la que se encuentre y la distancia a la línea de costa. Las cuevas que presentan este perfil son conocidas como cuevas anquihalinas y por lo regular, se ubican cerca de la costa (Yañez-Mendoza et al., 2007; Coke, 2012), principalmente en el estado de Quintana Roo.

2.2.4 Estudios hidroquímicos en las cuevas inundadas de la Península

A la fecha existen algunos estudios realizados en diferentes cenotes ubicados en la península de Yucatán que muestran ya la presencia de contaminantes en el agua dulce de los mismos. Alcocer et al. (1998) analizaron hidroquímicamente y bacteriológicamente (bioindicadores de calidad del agua) el agua de cenotes localizados a lo largo del corredor turístico Cancún-Tulum, para determinar su potencial de uso como fuente de agua potable; y se encontró que uno de los sitios excedía los criterios establecidos en la Norma Mexicana para Agua Potable (NMAP).

Más recientemente, se detectó que el agua subterránea a lo largo de la costa del Caribe Mexicano contenía productos farmacéuticos de cuidado personal, posiblemente derivados de las aguas residuales domésticas; además de herbicidas y pesticidas en zonas cercanas (Metcalf et al., 2010). De igual manera, Polanco Rodríguez et al. (2015) realizaron un análisis espacial de la concentración de pesticidas organoclorados en la región de Yucatán conocida como el “Anillo de cenotes”. En un muestreo durante la temporada seca y de lluvias, encontraron la presencia de pesticidas prohibidos que excedían los límites establecidos por las normas oficiales mexicanas, donde el número y concentración de pesticidas durante la temporada seca fue cualitativa y cuantitativamente más alta que en la temporada de lluvias. Medina-Moreno et al. (2014) estudiaron la contaminación por hidrocarburos en cenotes de Quintana Roo, encontrando la presencia de fenantreno, naftaleno y benceno, entre otros hidrocarburos. Además, encontraron una relación entre el afluente de personas por temporada turística y la concentración y diversidad de hidrocarburos; en donde en la temporada turística alta, existió mayor concentración y diversidad de hidrocarburos que en la temporada baja.

Recientemente Torres Díaz et al. (2014) realizaron una evaluación de la vulnerabilidad y riesgo de contaminación del agua subterránea del estado de Yucatán, utilizando el método DRASTIC. Este método tiene como finalidad evaluar las principales variables representativas de la vulnerabilidad a la contaminación con base en siete variables intrínsecas del acuífero: la profundidad, el nivel estático, la recarga neta, el acuífero medio, el tipo de suelo, la topografía, el impacto de la zona vadosa y la conductividad hidráulica. Ellos determinaron que la vulnerabilidad extrema se localiza en los municipios próximos a la costa y una vulnerabilidad alta para la zona sur del área de estudio. Por su parte Aguilar Duarte et al. (2016) proponen un Índice de Vulnerabilidad del Acuífero Kárstico Yucateco (IVAKY), el cual fue diseñado con base a tres factores: relieve, suelo y clima. Los datos fueron ponderados con el proceso de análisis jerárquico, definiendo seis grados de vulnerabilidad e identificando con un nivel extremo de vulnerabilidad a la zona anillo de cenotes y parte de la zona noreste del estado de Yucatán. Los niveles bajos y muy

bajos de vulnerabilidad se ubican en el sur del estado en áreas de igual o mayor a 50 m s.n.m.

2.3 Microbiología de los acuíferos kársticos

Los primeros estudios sobre la microbiología de los acuíferos kársticos corresponden con anterioridad a los años 1990 y eran principalmente descriptivos. Aunque se sabía de la presencia de microorganismos, se pensaba que éstos eran transportados dentro de las cuevas por corrientes de aire o por vectores como animales o humanos. Estos estudios se basaron en técnicas dependientes de cultivos para identificar las especies metabólicamente activas. Sin embargo, estas técnicas presentaban varias limitaciones. El estudio de microorganismos en estos ambientes cobró importancia cuando se descubrieron depósitos de minerales (minerales secundarios) que eran difícil de explicar a través de procesos inorgánicos. Después de 1990, y con las nuevas técnicas moleculares, la posibilidad de estudiar a los microorganismos presentes en diversos sistemas ha ido en incremento (Barton y Nothup, 2006; Barton y Jurado, 2007).

2.3.1 Estudios microbiológicos en cuevas inundadas de la Península de Yucatán

Una de las principales actividades que favorecen la contaminación de cuerpos de agua es la deposición inadecuada de aguas residuales, las cuales afectan la calidad microbiológica de la capa de agua meteórica de los cenotes. Uno de los indicadores de calidad del agua son las bacterias patógenas, protozoos, virus y parásitos (Page et al., 2010). En la Península de Yucatán, la contaminación microbiológica en el manto acuífero es importante debido a la escasez de plantas de tratamiento de las aguas residuales. Consecuentemente, existe una infiltración casi directa de las mismas. Estos contaminantes biológicos no sólo alteran la calidad del agua, sino también favorecen dinámicas poblacionales de competencia con los microorganismos autóctonos del agua subterránea, los cuales se encargan de llevar a cabo procesos biogeoquímicos de remoción de formas de N y otros compuestos contaminantes (Aguilar 2018).

Leal-Bautista et al. (2013) evaluaron la contaminación fecal incluyendo coliformes totales, *Escherichia coli* y bacteroides (humanos y totales) en aguas subterráneas en la región de Tulum en Quintana Roo. Los coliformes totales y *E. coli* se encontraron altamente distribuidos en todas las muestras analizadas. Sin embargo, la presencia de bacteroides humanos y moléculas antropogénicas como la cafeína, se detectó en pozos de Tulum; sugiriendo que, la reciente actividad humana cerca de los pozos está impactando las reservas de agua dulce.

2.4 Técnicas independientes de cultivo para la caracterización de comunidades bacterianas en los acuíferos

Los microorganismos son responsables de procesos que se llevan a cabo en la biósfera como son los ciclos biogeoquímicos. Sin embargo, nuestro conocimiento sobre la vida microbiana y el papel de éstos en el ambiente son aún poco entendidos. Durante mucho tiempo, la evaluación de la microdiversidad se limitó al estudio de microorganismos que podían ser cultivados en el laboratorio, donde se estima que sólo el 1% de ellos son cultivables dependiendo de las condiciones de cultivo (Hernández-León et al., 2010; Vartoukian et al., 2010; Kumar et al., 2015; Cadena-Zamudio et al., 2016). Gracias a los avances tecnológicos, el uso de métodos moleculares basados en el análisis del DNA o RNA representan un grupo de herramientas muy útiles para el estudio de las comunidades microbiana (Cadena-Zamudio et al., 2015) Con este enfoque se puede tener un mejor y mayor conocimiento sobre la ecología microbiana y sus implicaciones en los procesos biogeoquímicos, especialmente en el agua subterránea (Rojas-Herrera et al., 2011; Long et al. 2016).

A la fecha, se han llevado a cabo algunos estudios en diferentes partes del mundo sobre la diversidad microbiana en ambientes kársticos. Chen et al. (2009) estudiaron la diversidad microbiana usando secuencias 16S rRNA en la cueva Movile en Rumania. Las secuencias relacionadas con bacterias sulfo-oxidantes fueron detectadas y clasificadas en grupos como Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Epsilonbacteria. También se detectaron secuencias relacionadas con bacterias sulfato-reductoras y desnitrificadoras. Con estos resultados, los autores apoyan la hipótesis de que la cueva Movile es controlada por procesos quimilitoautotróficos.

En otro estudio, Nold et al. (2010) estudiaron la diversidad bacteriana de tapetes microbianos y sedimentos provenientes de pozos con aguas hipóxicas y ricas en sulfato, cerca de Alpena, Michigan, Estados Unidos. Ellos obtuvieron perfiles de comunidades bacterianas mediante el gen 16S rRNA; encontrando que los tapetes sobre el sedimento estaban dominados por *Phormidium autumnale* (cianobacterias); mientras que, en los sedimentos había una gran diversidad de bacterias activas.

2.4.1 Técnicas independientes de cultivos y estudios en la Península

En México, son pocos los estudios que se han llevado a cabo sobre diversidad bacteriana en ambientes kársticos. Uno de ellos fue realizado por Sahl et al. (2011), quienes estudiaron la comunidad microbiana en muestras de agua y tapetes microbianos del sistema Zacatlón al noreste de México. En este estudio se encontraron que en las

muestras de agua de dos de los cenotes (Zacatón y Caracol), existían principalmente bacterias de los filos Epsilonproteobacteria y Chlorobi; mientras que, en La Pilita las secuencias fueron relacionadas con cloroplastos de Chlorophyceae (clase taxonómica de algas verdes) y Betaproteobacteria. Para las muestras de los tapetes microbianos, las secuencias de Deltaproteobacteria fueron las más abundantes con la profundidad. De manera general, estos autores reportan que la diversidad en las muestras de columna de agua es menor en comparación con los tapetes de las paredes de los cenotes. Finalmente, en 2017, Rosilen y colaboradores, analizaron en muestras de agua del acuífero kárstico de la región de Yucatán indicadores fecales bacterianos y el virus *Pepperr mild mottle* (PMMoV). Todos los sitios de estudio presentaron coliformes totales y *E. coli* se encontró en bajos niveles. Mientras que, el RNA de PMMoV fue detectado en el 85% de las muestras, sugiriendo que por su abundancia y prevalencia, PMMoV presenta potencial como indicador fecal en estos sistemas.

2.5. Procesos biogeoquímicos detectados en acuíferos kársticos

El hábitat de las cuevas se divide en tres zonas de acuerdo con la cantidad de luz que hay. Estas zonas son: entrada, crepúsculo y zona oscura. Cada sitio tiene características fisicoquímicas y disponibilidad de nutrientes diferentes, lo que determina el tipo de organismos presentes en cada zona (Engel et al., 2011). En 1986 se descubrieron procesos de quimilitoautotrofia en la cueva Movile (Rumania), lo que cambió la percepción del tipo de microorganismos y los procesos que pudieran llevarse a cabo en ambientes subterráneos. Muchos de los estudios de quimilitoautotrofia en cuevas sumergidas se han realizado en sistemas anquihalinos (Opsall y Chanton, 2006). Los microorganismos quimiosintéticos, en sistemas anquihalinos obtienen energía de compuestos reducidos producidos por la degradaciones de la materia orgánica (Pohlman, 2011).

A través de estudios isotópicos se han estudiado algunos sistemas en donde se ha encontrado que la principal fuente de energía en cuevas es por procesos quimiosintéticos. Uno de los sitios más estudiados ha sido la cueva Movile, la cual se encuentra parcialmente inundada por aguas termales. Estudios con isótopos de carbono (C) en la biomasa de 10 especies de invertebrados colectados en la cueva, sugieren que microorganismos quimiosintéticos son la principal fuente de alimento en el sitio. Otros estudios con isótopos de azufre (S) sugieren que la fuente de S reducido proviene de rocas magmáticas que están enterradas debajo de la roca caliza formadora de la cueva. Además de que, se han caracterizado organismos oxidadores de S mediante técnicas independientes de cultivo, así como microorganismos metanotróficos (Pohlman, 2011)

En Australia se ha estudiado la caverna inundada (*cenote*) Bundera, que se localiza a 1.7 km de la costa del Océano Índico. Al ser un sitio abierto, recibe directamente aportaciones de materia orgánica proveniente de arbustos y pastos de zonas aledañas; así también, cuenta con suficiente luz para soportar el desarrollo de algas en los primeros metros. En este sitio se ha observado que existen bacterias oxidadoras de azufre a lo largo del gradiente redox, y en la interfase de la columna de agua y sedimentos; evidenciando la presencia de procesos quimiosintéticos. Además de que, se ha observado la variación espaciotemporal de zonas biogeoquímicas en la columna de agua. (Pohlman, 2011)

En México, los estudios en sistemas anquihalinos se han limitado a estudios isotópicos de carbono y nitrógeno. Pohlman et al. (1997) mostraron que bacterias quimiolitotróficas pudieran proveer de materia orgánica para sostener hasta más de dos niveles tróficos en cenotes anquihalinos de Yucatán.

3. Justificación

Hasta la fecha, los estudios que se han realizado en el acuífero de Quintana Roo, México, se han enfocado principalmente en su caracterización hidroquímica y macrobiodiversidad, con estudios más recientes en la detección y cuantificación de contaminantes químicos. Sin embargo, en la actualidad casi no existen estudios que exploren la microdiversidad y los posibles procesos biogeoquímicos que los microorganismos estén llevando a cabo.

Dado que, las cuevas inundadas de Quintana Roo representan la principal fuente de agua potable para la región, es de vital importancia conocer sus características fisicoquímicas, su microbiodiversidad y los posibles procesos biogeoquímicos que se están llevando a cabo en éstos. En especial, en aquellos que se encuentran en el noreste del Estado y que son aledaños a zonas turísticas. Esto con el fin de tener un mejor uso y cuidado de este recurso.

4. Pregunta de investigación

La diversidad bacteriana en cuevas inundadas y sus cambios por procesos antrópicos representa un tema poco estudiado en la costa noreste del estado de Quintana Roo. El presente proyecto plantea determinar:

- i. ¿cuál es la diversidad genética bacteriana en el acuífero de esta zona?
- ii. ¿cómo se encuentra distribuida taxonómicamente esta comunidad bacteriana?
- iii. si ¿existen señales de perturbación antrópica en estos cuerpos acuáticos, v.g. concentración de nitratos y fosfatos, y/o metales?
- iv. y si ¿existe una relación entre la diversidad microbiana y las características fisicoquímicas de los sistemas en estudio?

5. Hipótesis

Se conoce que el acuífero de Quintana Roo está interconectado, por lo que, la diversidad de la comunidad bacteriana presente en los sitios de estudio será similar en aquellos sitios que se encuentren cercanos entre sí; y se diferenciarán de los sitios más distantes.

6. Objetivos

6.1 General

Caracterizar el ambiente hidroquímico y la microdiversidad procariótica del acuífero de la costa noreste del estado de Quintana Roo, acotado al corredor turístico Puerto Morelos-Tulum.

6.2 Específicos

- Establecer los sitios de muestreo en diversas cuevas inundadas que representen el acuífero de la zona, y obtener muestras de agua, sedimento y tapetes microbianos.
- Caracterizar el ambiente hidroquímico de las diferentes capas de agua: meteórica y haloclina.
- Determinar la diversidad bacteriana en las muestras colectadas mediante secuenciación masiva del marcador 16S rRNA.
- Establecer las relaciones entre la estructura de la comunidad y las condiciones hidroquímicas determinadas.

7. Área de estudio

7.1 Quintana Roo

El Estado de Quintana Roo está localizado a lo largo de la costa este de la Península de Yucatán. Isphording (1975) dividió la parte emergida de la Península de Yucatán en cinco diferentes regiones fisiográficas, donde cada zona cuenta con características kársticas y fenómenos de intemperización diferentes. Quintana Roo, corresponde a la región fisiográfica denominada Planicie Costera del Noreste, la cual presenta una mayor elevación y una estructura más compleja de los estratos en comparación con el resto de la Península. Esta elevación ha permitido que los procesos de erosión y disolución se presenten con mayor velocidad, por lo que las características de disolución son más comunes en esta región. Aunado a esto, el gradiente de precipitación que se presenta en la Península de Yucatán es otro factor que determina el grado y características de disolución presentes en cada región. Estos factores han dado como resultado el desarrollo de extensos conductos y sistemas de cuevas que drenan el acuífero (Kambesis y Coke, 2016)

Dentro del estado de Quintana Roo, se han descrito dos sistemas de fallas geológicas: la zona de lineamientos de Holbox y la zona de fallas de Río Hondo. Estos sitios son preferenciales para el flujo de agua subterránea y están conectados a la costa a través de conductos de disolución (Rioja-Nieto et al., 2019). Estas fallas son importantes canales para el flujo de agua subterránea (Perry et al., 2003). La zona de lineamientos de Holbox se formó en la costa noreste de la península y superficialmente, se identifica por alineamientos de depresiones tipo polje que en temporada de lluvias se llenan, formando así, alineamientos de pantanos. Por medio de sensores remotos se ha comprobado que existen mayores características de disoluciones en las zonas de alineamientos dando como resultado una mayor permeabilidad y flujo del acuífero (Kambesis y Coke, 2016). La zona de fallas Río Hondo fue descrita por primera vez en 1985 por Weidie, quien la mencionó como una continuación continental de un sistema de fallas normales de un extenso sistema de bloque fuera de la costa del Caribe en el Sur de la Península de Yucatán, extendiéndose hacia el sur del estado de Quintana Roo. Este sistema de fallas fue creado por diferentes eventos tectónicos del Cretácico Tardío al Plioceno (Bauer-Gottwein et al., 2011). Superficialmente, éste se identifica por lagos someros alineados, así como por la alineación de la Isla Cozumel (Kambesis y Coke, 2016).

7.2 Cuevas subterráneas y cavernas inundadas estudiadas en este proyecto.

Para el presente proyecto se muestrearon las siguientes cuevas y cavernas inundadas del estado de Quintana Roo, México; localizadas dentro de los municipios Benito Juárez y Solidaridad (Tabla 1, Fig. 1).

Tabla 1. Datos generales de los sitios muestreados

Sitio	Coordenadas	Ciudad próxima	Altitud (m s.n.m.)	Distancia a la costa (km)	Haloclina (m)
Chikin Ha (C1) <i>cueva</i>	20° 29' 58.70" N 87° 15' 41.30" W	Puerto Aventuras	11	2.3	12.5
Aktun Ha (C2) <i>cueva</i>	20° 16' 38.62" N 87° 29' 10.77" W	Tulum	5	8.7	ND
Corazón del Paraíso (C3) <i>cueva</i>	20° 11' 1.60" N 87° 31' 2.13" W	Tulum	5	7.2	16.8
Chac Mool (C4) <i>cueva</i>	20° 30' 46.77" N 87° 14' 49.41" W	Puerto Aventuras	10	2.4	12
Zapote (C5) <i>caverna</i>	20° 51' 27.78" N 87° 07' 35.93" W	Puerto Morelos	17	20.7	ND

ND, no detectada

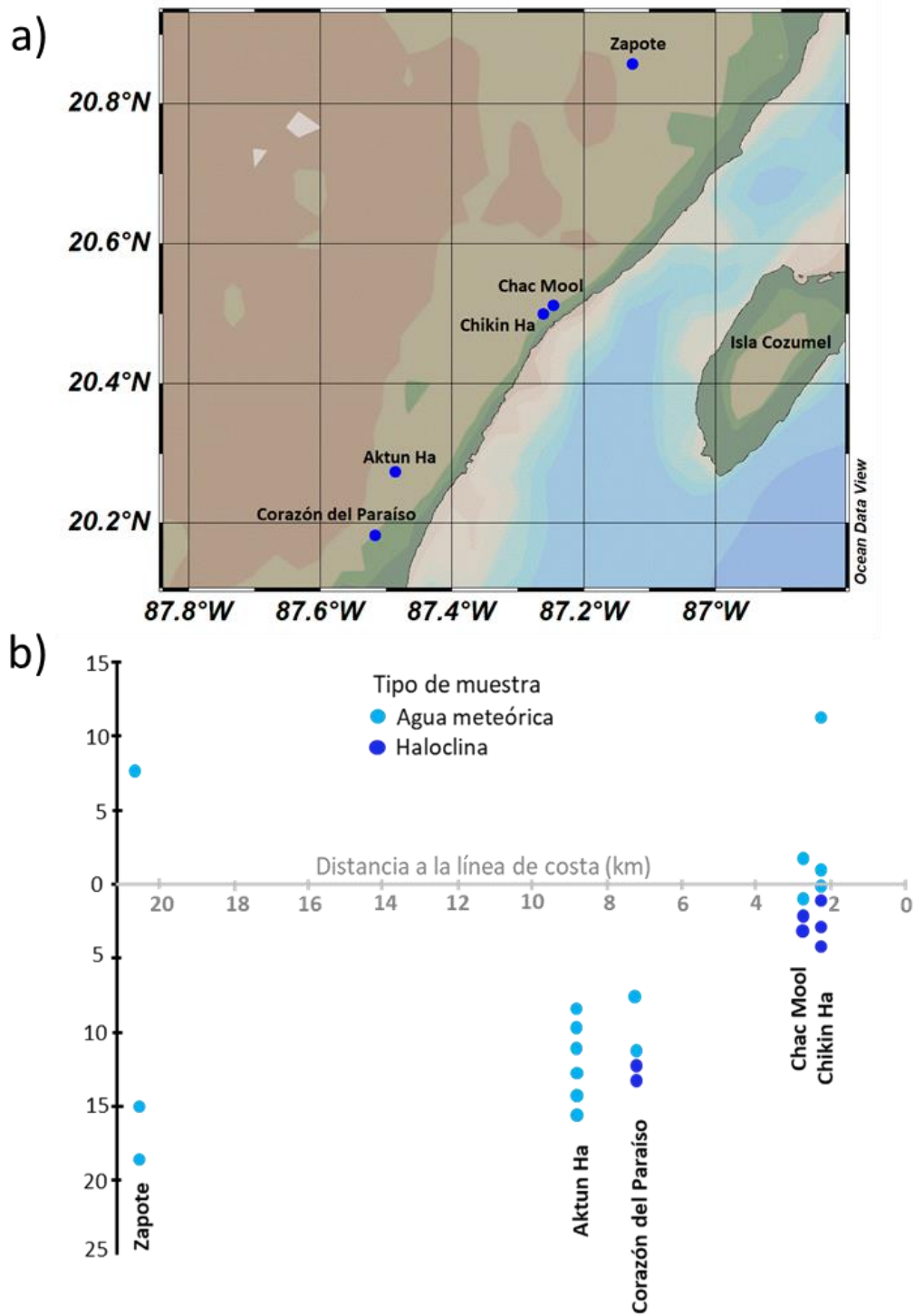


Figura 1. Sitios muestreados en este estudio. a) Ubicación geográfica de las cinco columnas de agua estudiadas. b) Perfiles de las columnas de agua muestreadas, mostrando las muestras de agua meteórica (azul claro) y haloclina (azul marino).

8. Materiales y Métodos

8.1 Muestreo

Para el estudio de la diversidad bacteriana y la caracterización fisicoquímica del agua del acuífero se realizó un muestreo del 25 de abril al 3 de mayo del 2018. Los sitios fueron seleccionados con base en importancia, accesibilidad y ubicación geográfica. Para cada sitio se estableció un plan general de muestreo considerando en lo posible obtener:

- muestras de agua de i) cerca al techo, ii) entre la haloclina y el techo, iii) en la haloclina, iv) entre la haloclina y el fondo, y v) en el fondo. Estas muestras variaron dependiendo de las características de cada sitio de muestreo, y en algunos casos se tomó agua de la caverna como punto de referencia para la caracterización;
- una muestra de sedimento de la cueva muestreada
- una muestra de tapete microbiano.

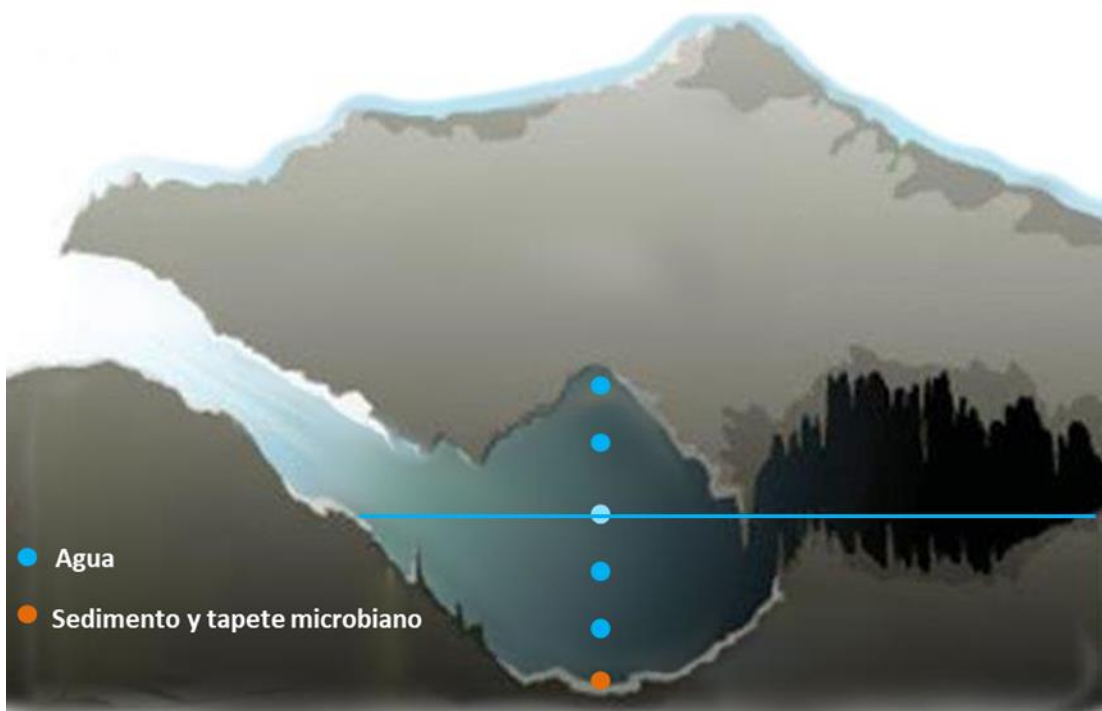


Figura 2. Esquema de muestreo empleado en este trabajo. La línea azul representa el inicio de la haloclina.

Las muestras fueron obtenidas por un equipo de buceo espeleológico especializado en estudios científicos, los cuales emplearon un sistema SCUBA.

8.2 Parámetros fisicoquímicos determinados *in situ*

Las muestras de agua fueron tomadas en botellas de 1.5 L estériles, y traídas a superficie para determinar inmediatamente parámetros fisicoquímicos como el pH, la conductividad eléctrica (CE) y el potencial redox (ORP) con medidores HANNA (HI9125, HI3230B y HI9033).

8.3 Análisis hidroquímicos

Para los análisis hidroquímicos se realizaron diferentes análisis. Para ello, las muestras recibieron un pretratamiento en campo según el análisis a realizar y se mantuvieron a 4°C durante la colecta. Una vez en el laboratorio, todas las muestras se guardaron acorde a las recomendaciones de los laboratorios de análisis. A continuación, se describen los análisis realizados.

8.3.1 Nutrientes totales y disueltos

Se determinaron nutrientes totales y disueltos como Ntot, NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- y fósforo reactivo soluble (FRS). Para estos análisis se tomó un volumen de 50 ml de cada muestra de agua, para cada profundidad, en los diferentes sitios de muestreo. Para los nutrientes disueltos, las muestras fueron filtradas por una membrana de 0.22 μm tamaño de poro; mientras que, para los totales, las muestras fueron tomadas sin pretratamiento. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Biogeoquímica Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Para ello se utilizó un autoanalizador Skalar SanPlus (Skalar Analytical) empleando los protocolos mencionados.

8.3.2 Iones mayores solubles

Para el análisis de iones mayores (Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- y SO_4^{-2}) se tomó un volumen de 15 ml de cada muestra de agua y se filtró por una membrana de 0.22 μm tamaño de poro. La determinación se realizó por cromatografía de iones empleando un cromatógrafo Waters y un detector de conductividad eléctrica (Modelo 432, Waters). Estas mediciones fueron llevadas a cabo en el laboratorio de Cromatografía del Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía. Los cationes (Na^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2}) fueron separados con una columna Metrosep C6-250 (Metrohm), y para los aniones (Cl^- y SO_4^{-2}) se utilizó una columna IC-Pak Anion HR (Waters).

8.3.3 Metales solubles

Para el análisis de metales solubles se tomó un volumen de 15 ml de cada muestra de agua filtrada por una membrana de 0.22 μm tamaño de poro. Luego las muestras fueron acidificadas en campo con HCl concentrado (grado de ultrapureza) para posteriormente ser analizadas por espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente

en un equipo Perkin Elmer ICP-OES Optima 8300, empleando Ytrio como estándar interno. Este análisis fue realizado en el laboratorio de Espectroscopia Atómica del Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía (LANGEM).

8.3.4 Carbono

Para el análisis de Carbono Orgánico Disuelto (COD) y Carbono Inorgánico Disuelto (CID) se tomó un volumen aproximado de 100 ml, el cual fue filtrado previamente por una membrana de 0.22 μm tamaño de poro. La determinación se realizó por oxidación catalítica en un analizador de carbono y nitrógeno en un sistema TOC-L CSH/CSN en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM. El equipo mide el carbono total (CT) y el carbono inorgánico (CID) y por diferencia de éstos se calcula el carbono orgánico disuelto (COD).

8.4 Extracción de DNA para el análisis del componente biológico

Para determinar la diversidad bacteriana de los sitios de muestreo se extrajo DNA de muestras de agua de cada profundidad, así como de la muestra de sedimento y tapete microbiano de cada sitio de muestreo. Para las muestras de agua, se filtró 450 ml de agua por una membrana de 0.22 μm tamaño de poro. Todos los filtros fueron congelados inmediatamente después de ser filtrados. Para las muestras de sedimentos y tapetes microbianos, se tomarán 0.25 g (peso húmedo) de cada muestra. El DNA se extrajo siguiendo el protocolo establecido por el kit de extracción DNeasy PowerWater Kit (Qiagen), en el caso de las muestras de columna de agua; y el kit DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen) para las muestras de tapetes y sedimentos. El DNA obtenido se eluyó en 40 μL de solución C6 incluida en cada kit (10 mM Tris, sin EDTA, pH 8.0). Para su cuantificación se utilizó el equipo Qubit Fluorometric Quantitation (ThermoFisher Scientific) empleando el ensayo Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific). El DNA obtenido se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser empleado.

8.4.1 Amplificación y secuenciación de gen 16S rRNA

El protocolo de amplificación se llevó a cabo de acuerdo con lo estipulado con el *Earth Microbiome Project* (Gilbert y Dupont, 2011). Las muestras fueron secuenciadas en la plataforma Illumina MiSeq, para lo cual el DNA metagenómico extraído se utilizó como templado para la amplificación de secuencias 16S rRNA con los primer 515F y 806R (Tabla 2) (Caporaso et al., 2012). El primer reverso incluyó una secuencia Golay específica, la cual sirvió como identificador para los análisis bioinformáticos posteriores.

Tabla 2. Secuencias de los primers utilizados para diversidad de Bacteria y Arquea mediante 16S rRNA (Carpuraso et al., 2011; 2012)

Primer	Secuencia
515 (directo)	5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'
805 (reverso)	5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'

Para la reacción de PCR se utilizaron 2.5 µL de buffer 10X Takara ExTaq PCR buffer, 3 µL de BSA (10 mg/ml), 0.5 µL de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) a 200 µM, 0.75 µL de cada primer a 10 µM y 0.125 U de Taq Polimerasa (TaKaRa Taq TM, Clontech) y 2 µL (2-20 ng) de DNA extraído. La reacción se llevó a un volumen final de 25 µL con agua grado molecular. El PCR se llevó a cabo en un termociclador Axygen MaxyGene (Axygen). El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min; 35 ciclos de i) elongación a 95 °C por 30 s, ii) alineamiento a 52 °C por 30 s y iii) extensión a 72 °C por 30 s; además de un tiempo final de extensión a 72 °C por 12 min. Se verificó la presencia de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%; el cual se preparó de la siguiente manera: 30 ml de agua MiliQ, 0.45 g de agarosa (Axygen), 0.6 ml de TAE 50X y 3 µL de SYBR Safe (10 000X, Invitrogen) visto a través de luz UV. La migración se efectuó a 80 V por 20 minutos. Los amplicones fueron purificados y secuenciados en la plataforma Illumina MiSeq de la Universidad de Yale (*Yale Center for Genome Analysis*), Estados Unidos de América.

8.4.2. Análisis bioinformático y de agrupamiento de muestras

El análisis bioinformático se llevó a cabo a partir de las secuencias obtenidas del fragmento 16S rRNA. Para ello se trabajó bajo la plataforma QIIME2 (*Quantitative Insights into Microbial Ecology*) (Caporazo et al., 2010b). En un principio las secuencias fueron demultiplexadas, a continuación se realizó un filtro de calidad para las secuencias con extremo pareado (paired-end) utilizando el programa DADA2 (Callahan et al., 2016). Aquellas secuencias que pasaron este filtro, se organizaron en ASVs (*Amplicon Sequencing Variants*) con 100% identidad nucleotídica. Finalmente estos ASVs fueron clasificados en diferentes grupos taxonómicos de bacterias y arqueas usando la base de datos GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov/>).

Los datos obtenidos del análisis QIIME2, fueron después trabajados con el software R (R Core Team, 2013) bajo el ambiente de RStudio (versión 3.6.1), utilizando la paquetería de Phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013). Los análisis que se llevaron a cabo fueron para determinar las relaciones entre las características hidroquímicas de las muestras con el

componente biológico, se realizaron análisis de Coordenas Principales (PCoA) de tipo Unifrac no poderados. También se emplearon análisis de componentes principales (PCA) biplot, para i) conocer el agrupamiento de las muestras de agua acorde a las características hidroquímicas, y ii) para conocer los principales procariontes en las muestras de agua, sedimento y tapetes.

9. Resultados

9.1 Caracterización química de la columna de agua, sitios anquihalinos y no anquihalinos

Primeramente, se identificó la naturaleza fisicoquímica de las columnas de agua muestreadas, clasificando los sitios en sistemas anquihalinos o no anquihalinos empleando como indicadores la conductividad eléctrica, la concentración de iones mayoritarios y la presencia de metales claves en la haloclina, como el estroncio (Sr) y litio (Li). Como resultados se observó que, el pH fue circumneutral en la mayoría de las muestras, con excepción de un valor de 8.5 para un punto de Corazón del Paraíso (16.8 m). Sin embargo, éstos son valores comúnmente reportados para estos ambientes kársticos. Los valores de ORP fueron positivos para todos los sitios con excepción de Zapote; donde se reportó un valor de -284.5 mV. En este cenote existen estudios previos donde se define una nube de sulfuro de hidrógeno a la profundidad donde fue tomada esta muestra (Fig. 3), por lo que el valor reductante de ORP está dentro de lo esperado.

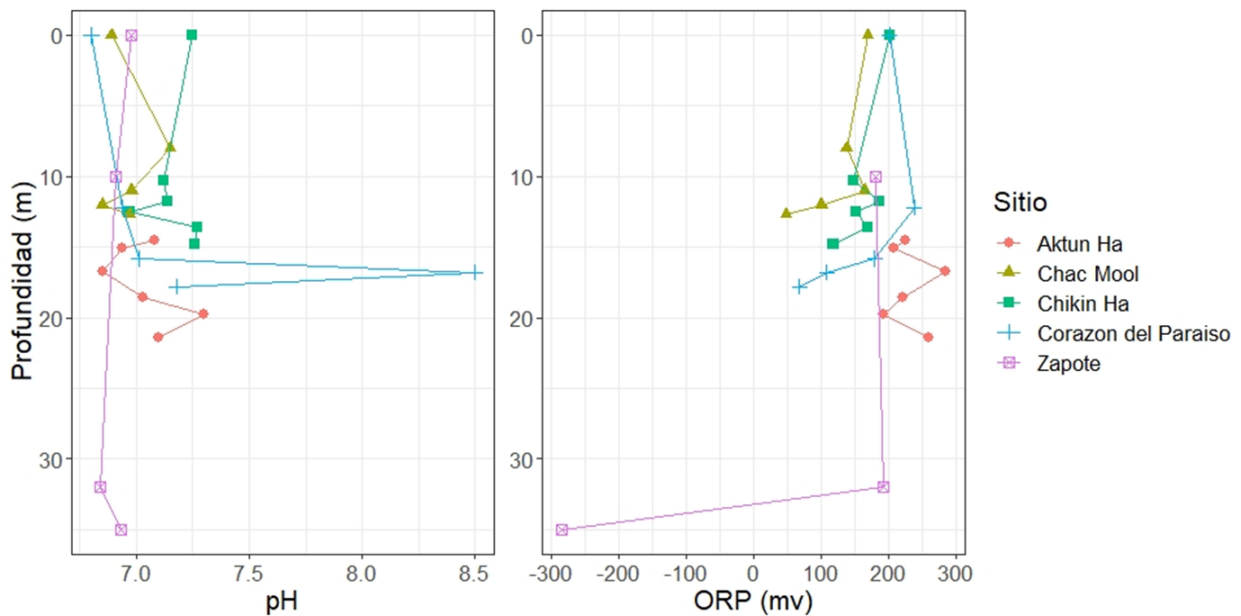


Figura 3. Valores de pH y Potencial Oxido-Reducción (ORP) de las muestras de agua de las cinco columnas de agua muestreas.

De acuerdo con los parámetros que se utilizaron como indicadores para clasificar los sistemas en anquihalinos o no-anquihalinos (conductividad eléctrica y concentración de iones mayores, así como la concentración de Sr y Li), se pudo observar que, para estas variables algunas muestras tienen un incremento con forme a la profundidad, alcanzando concentraciones promedios reportados para agua de mar. Esto nos indica la intrusión de agua marina en los sitios como Chikin Ha, Corazón del Paraíso y Chac Mool (Fig. 4). Aunque no se muestreó un perfil que permitiera identificar con claridad el agua marina, si se puede observar la zona de la haloclina. Y con ello podemos definir esta clasificación entre sitios.

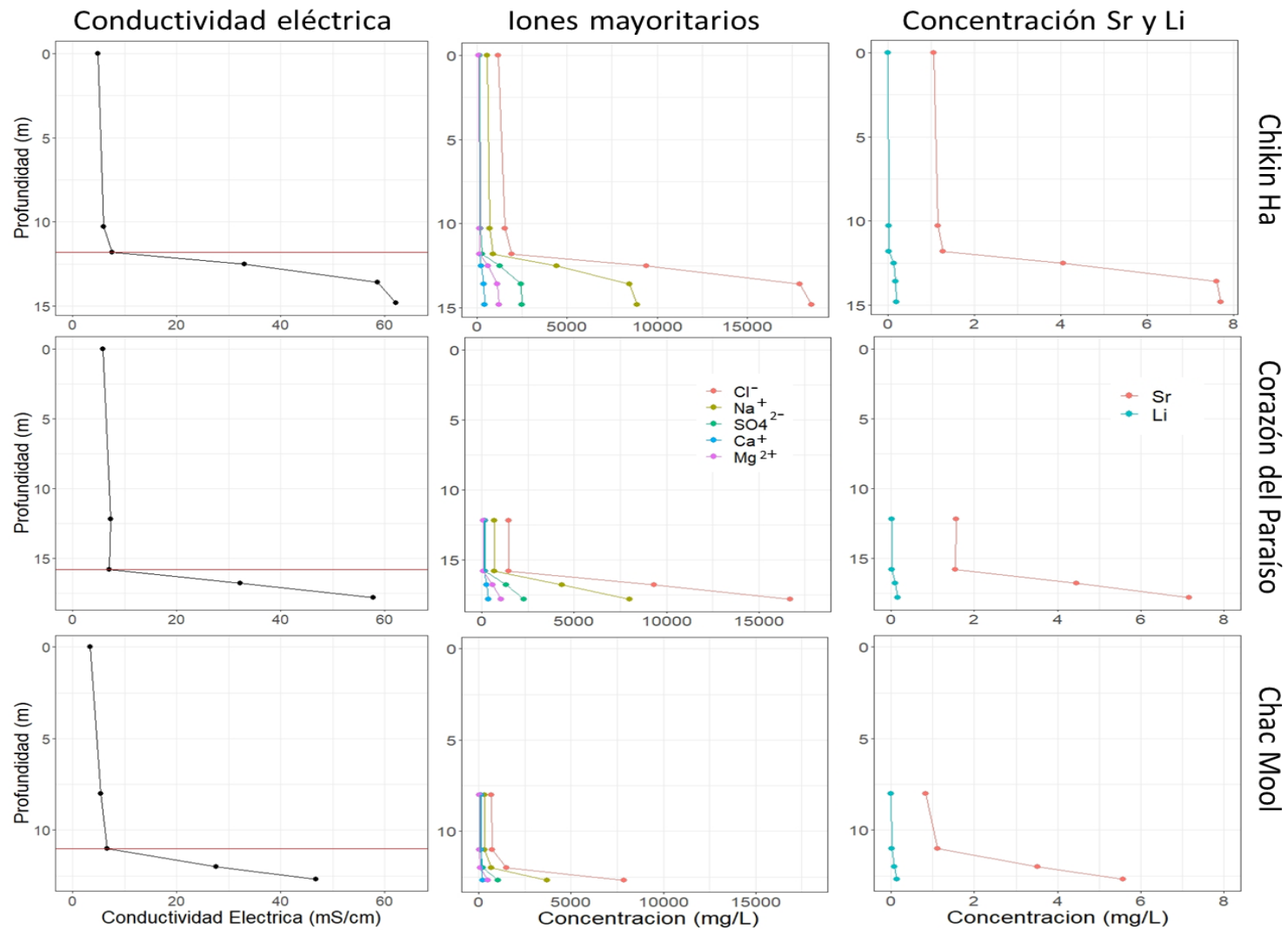


Figura 4. Sitios muestreados con un patrón anquihalino en la columna de agua y los parámetros fisicoquímicos que lo demuestran: conductividad eléctrica, concentración de iones mayoritarios y concentración de estroncio y litio.

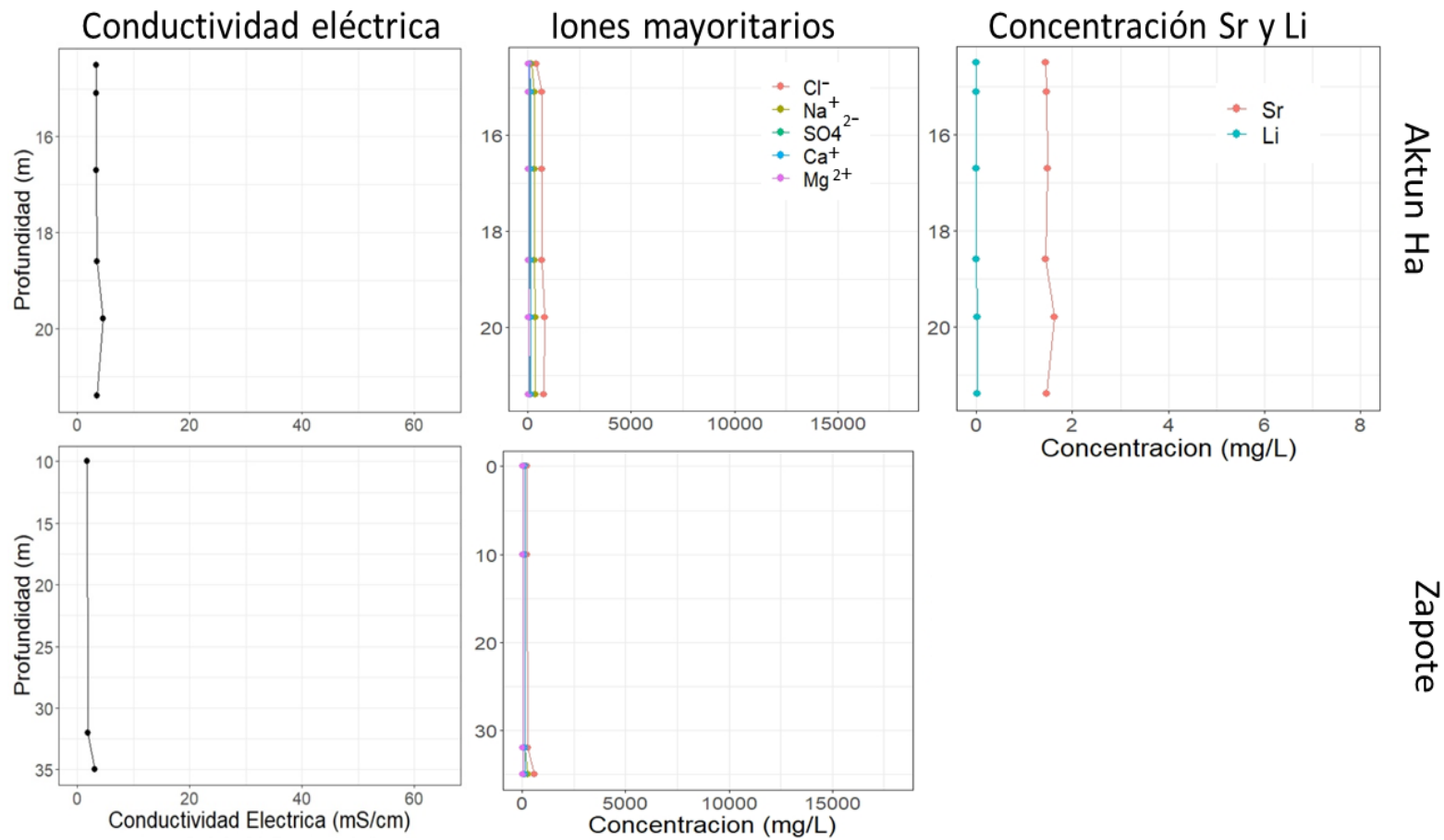


Figura 5. Sitios muestreados sin un patrón anquihalino en la columna de agua y los parámetros fisicoquímicos que lo demuestran: conductividad eléctrica, concentración de iones mayoritarios y concentración de estroncio y litio.

9.2. Diversidad bacteriana en el acuífero de la zona de estudio

9.2.1 Secuencias 16S rRNA obtenidas

Para observar la diversidad y distribución taxonómica microbiana del acuífero, se obtuvieron un total de 5,719,585 secuencias de la región hipervariable V4 16S rRNA (~250 pb) de los dominios Bacteria y Arquea (Tablas 3 y 4). Después de un filtrado en el cual se eliminaron las secuencias de baja calidad y quimeras, se obtuvieron 3,537,814 secuencias, es decir, aproximadamente un 61% de eficiencia. De manera general, las muestras de agua presentan un mayor número de secuencias en comparación con las muestras de sedimentos y tapetes.

Tabla 3. Número de secuencias obtenidas, filtradas y no quiméricas obtenidas de las muestras de agua para cada sitio anquihalino de estudio.

Sitio	ID muestra	Tipo de agua	Profundidad (m)	Número de secuencias		
				obtenidas	filtradas	no quiméricas
Chikin Ha	C1_W1	Meteórica	0	178765	140906	105201
	C1_W2	Meteórica	10.3	85283	73690	66034
	C1_W3	Meteórica	10.4	178765	140906	105201
	C1_W4	Meteórica	11.8	121488	95832	86745
	C1_W5	Haloclina	12.5	293750	151927	131102
	C1_W6	Haloclina	13.6	56737	48633	46749
	C1_W7	Haloclina	14.8	216550	103268	82000
	Subtotal			1131338	755162	623032
Aktun Ha	C2_W1	Meteórica	14.5	109629	91662	83686
	C2_W2	Meteórica	15.1	54124	46705	43955
	C2_W3	Meteórica	16.7	425017	330631	300085
	C2_W4	Meteórica	18.6	94087	80828	75726
	C2_W5	Meteórica	19.8	151625	120326	110182
	C2_W6	Meteórica	21.4	147422	123621	113110
	Subtotal			981904	793773	726744
Corazón del Paraíso	C3_W1	Meteórica	12.2	194081	123893	96773
	C3_W2	Meteórica	15.8	101711	66503	49416
	C3_W3	Haloclina	16.8	135733	119502	112770
	C3_W4	Haloclina	16.8	364236	282641	228235
	C3_W5	Haloclina	17.8	44004	35201	30115
	Subtotal			839765	627740	517309

Tabla 3. (Continuación) Número de secuencias obtenidas, filtradas y no químicas obtenidas de las muestras de agua para cada sitio no anquihalino.

Sitio	ID muestra	Tipo de agua	Profundidad (m)	Número de secuencias		
				obtenidas	filtradas	no químicas
Chac Mool	C4_W1	Meteórica	8	211730	164266	146620
	C4_W2	Meteórica	11	341030	243318	219331
	C4_W3	Haloclina	12	296803	125162	110603
	C4_W4	Haloclina	12	88216	66948	56136
	C4_W5	Haloclina	12.7	337979	252489	195310
Subtotal				1275758	852183	728000
Zapote	C5_W1	Meteórica	10	84554	67642	49206
	C5_W2	Meteórica	32	82635	47552	36883
	C5_W3	Meteórica	35	418713	359856	268395
Subtotal				585902	475050	354484
TOTAL				4814667	3503908	2949569

Tabla 4. Número de secuencias obtenidas, filtradas y no quiméricas obtenidas de muestras de sedimento y tapete para cada sitio anquihalino y no anquihalino.

Sitio	ID muestra	Tipo de muestra	Profundidad (cm)	Número de secuencias		
				obtenidas	filtradas	no quiméricas
Chikin Ha	C1_S1	Sedimento	0 a 2	44214	39502	30211
	C1_M1	Tapete		53393	48806	31650
	Subtotal			97607	88308	61861
Aktun Ha	C2_S1	Sedimento	0 a 2	76971	58207	42732
	C2_S2	Sedimento	2 a 4	46283	39988	31735
	C2_S4	Sedimento	7 a 10	27638	4151	3139
	C2_S6	Sedimento	14 a 18	19550	12991	9172
	C2_M1	Tapete		64407	60034	51501
Subtotal			234849	175371	138279	
Corazón del Paraíso	C3_S1	Sedimento		49180	41380	31602
	C3_M1	Tapete		68642	61588	40711
	C3_M2	Tapete		56380	51747	33510
Subtotal			174202	154715	105823	
Chac Mool	C4_S1	Sedimento	0 a 2	55256	47919	35210
	C4_S2	Sedimento	2 a 4	15714	13009	10451
	C4_S3	Sedimento	4 a 7	40799	34491	31585
	C4_S4	Sedimento	7 a 9	51432	46426	37226
	C4_S5	Sedimento	9 a 13	120988	92568	86938
	C4_S6	Sedimento	13 a 16	68531	59871	49688
	C4_M1	Tapete		45540	40699	31184
Subtotal			398260	334983	282282	
TOTAL			904918	753377	588245	

El número total de secuencias obtenidas se muestra a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Número total de secuencias obtenidas, filtradas y no quiméricas de muestras de agua, sedimentos y tapetes microbianos de los sitios estudiados.

Tipo de muestra	Número de secuencias		
	obtenidas	filtradas	no quiméricas
Agua	4814667	3503908	2949569
Sedimento y tapete	904918	753377	588245
Total	5719585	4257285	3537814

9.2.2 Indicadores de diversidad alfa en el acuífero de estudio

Para conocer la diversidad en las muestras de agua, sedimento y tapetes microbianos se calcularon diversos índices como lo son: ASVs observados (*Amplicon Sequence Variants*) que equivale al número de especies informáticas observadas y son secuencias con 100% de identidad nucleotídica. El índice de Shannon (H') nos indica la biodiversidad específica y el índice de Simpson ($1-D'$) nos muestra la probabilidad de dominancia de especies.

En la figura 6 se observa que, por tipo de agua, la haloclina presenta el mayor número de ASVs (>1000) así como también el mayor índice de Shannon (>4) e índice de Simpson (*ca.* 1) que el agua meteórica, la cual presenta valores menores para los tres índices.

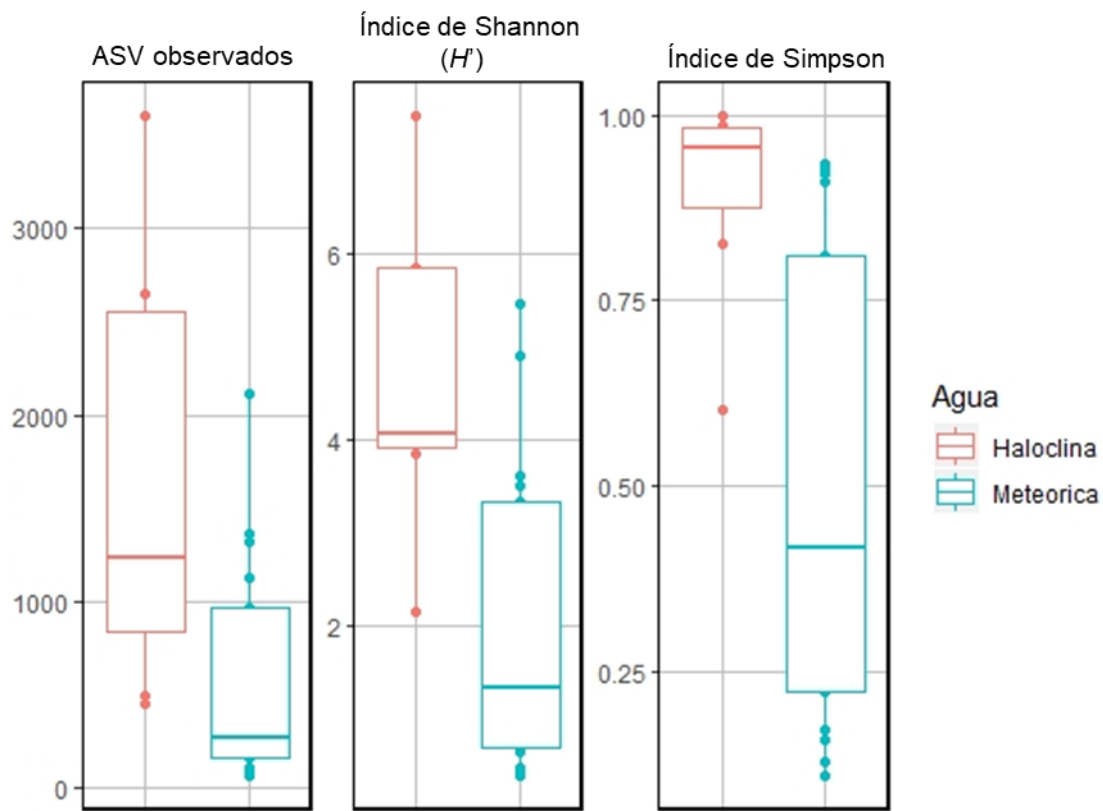


Figura 6. Diversidad alfa de las muestras por tipo de agua.

Para las muestras de sedimentos y tapetes microbianos, se obtuvo que los sedimentos presentaron mayor número de ASV observados (alrededor de 1000) y mayor diversidad en comparación con los tapetes microbianos. Así mismo ambas presentan una gran riqueza de especies (Fig. 7)

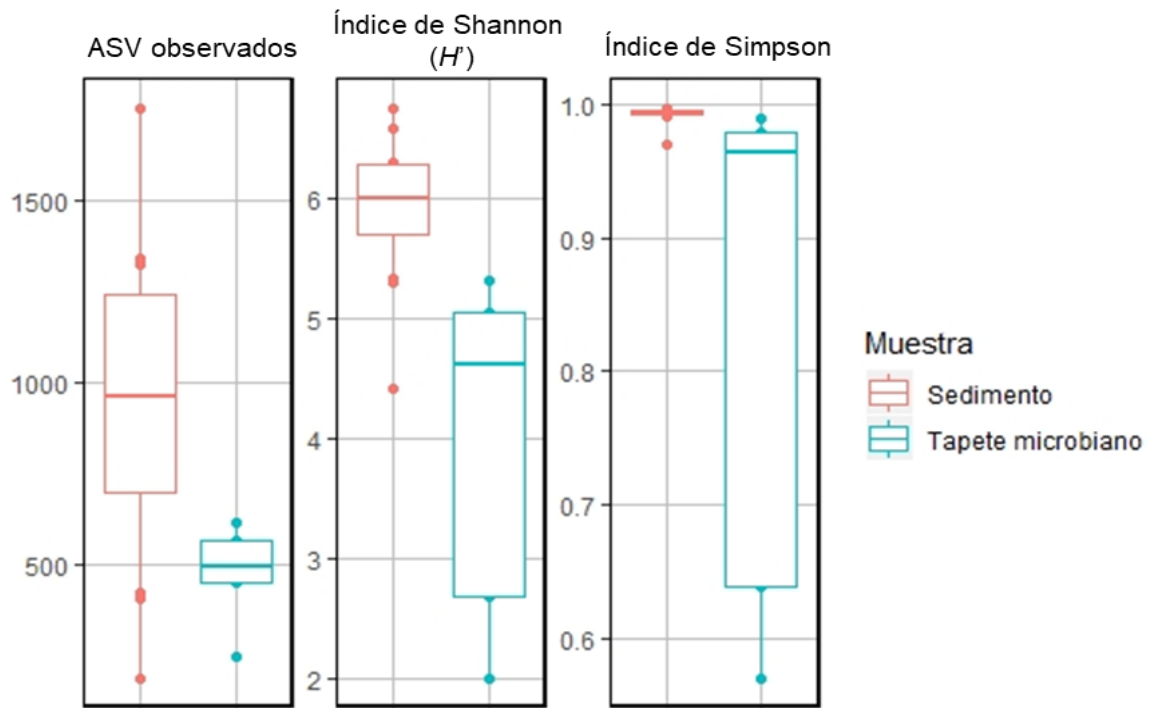


Figura 7. Diversidad alfa de las muestras de sedimento y tapetes microbianos muestreados en los cenotes estudiados.

9.4. Distribución taxonómica en el acuífero de la zona de estudio

Para conocer la afiliación filogenética de las bacterias y arqueas encontradas, las secuencias 16S rRNA se clasificaron taxonómicamente empleando la base de datos de GreenGenes. Los principales filos en las muestras de agua fueron Actinobacteria, Bacteroidetes, Crenarchaeota, Proteobacteria y Verrucomicrobia; cuatro de los cuales pertenecen al dominio Bacteria y uno al dominio Archaea. Mientras que, para las muestras de sedimentos y tapetes microbianos los principales filos fueron: Acidobacteria, Crenarqueota, NC10, Nitrospirae y Proteobacteria (Fig. 8).

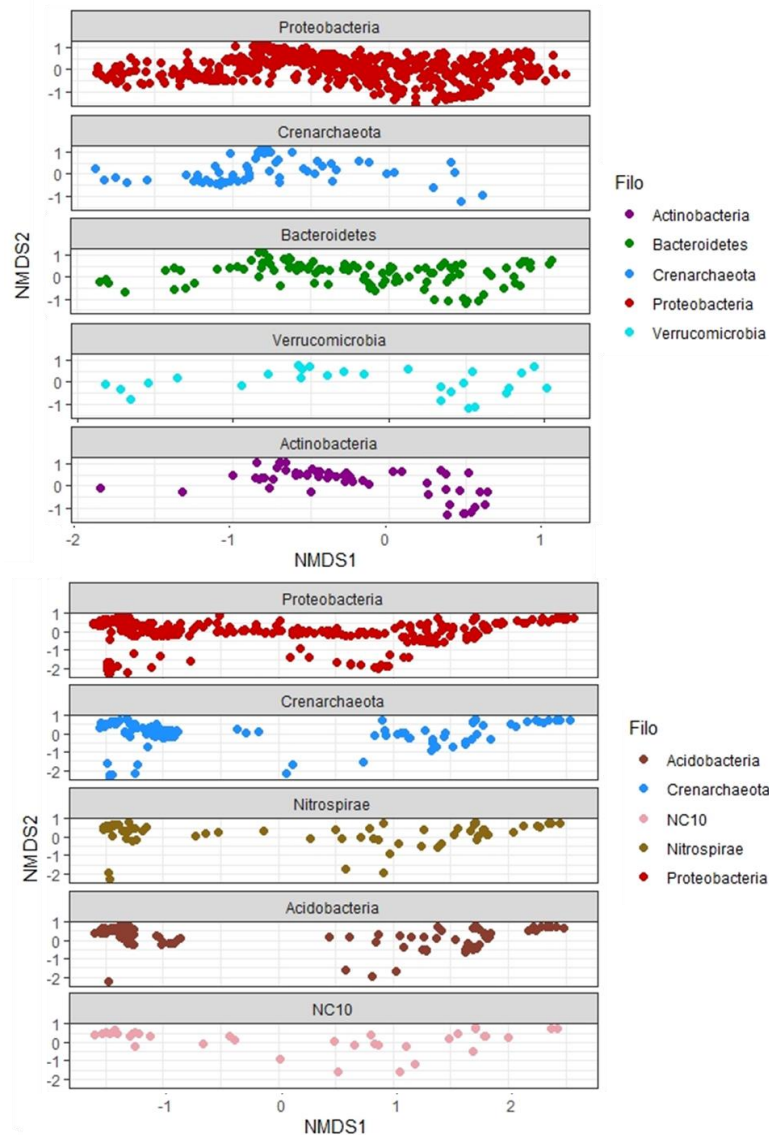


Figura 8. Distribución taxonómica a nivel phylum de los ASVs encontrados y su clasificación dentro de los cinco principales phyla para las muestras de agua (superior), y para las muestras de sedimentos y tapetes microbianos (inferior).

Considerando la abundancia relativa de estos phyla, Proteobacteria fue el más abundante en todas las muestras, pero con diferentes proporciones en los diferentes tipos de muestra (agua, sedimento y tapete). En el agua, Proteobacteria representó cerca del 83%; mientras que, en sedimentos y tapetes fue del 35 y 59%, respectivamente (Tabla 6).

Tabla .6 Porcentaje de abundancia relativa de los principales filos encontrados en diversas muestras del acuífero

Filo	Agua	Sedimento (%)	Tapete
Acidobacteria	0.9 ± 0.02	14.8 ± 0.04	3.2 ± 0.02
Actinobacteria	3.1 ± 0.04	1.12 ± 0.01	0.85 ± 0.01
Bacteroidetes	3.5 ± 0.02	1.12 ± 0.01	0.82 ± 0.01
Crenarchaeota	6.3 ± 0.09	21.5 ± 0.07	27.3 ± 0.24
NC10	0.2 ± 0.00	12.3 ± 0.04	5.7 ± 0.04
Nitrospirae	0.4 ± 0.01	16.1 ± 0.04	4.4 ± 0.02
Proteobacteria	83.3 ± 0.25	35.2 ± 0.07	59.5 ± 0.28
Verrucomicrobia	3.8 ± 0.14	0.56 ± 0.01	0.09 ± 0.00

A nivel orden, se observaron claramente las diferencias de la afiliación taxonómica de las bacterias y arqueas en ambos tipos de agua con una dominancia del orden Burkholderiales (Fig. 9). Mientras que, para las muestras de sedimentos y tapetes microbianos, hay una mayor uniformidad con dos órdenes dominantes: Cenarchaeales y Nitrospirales.

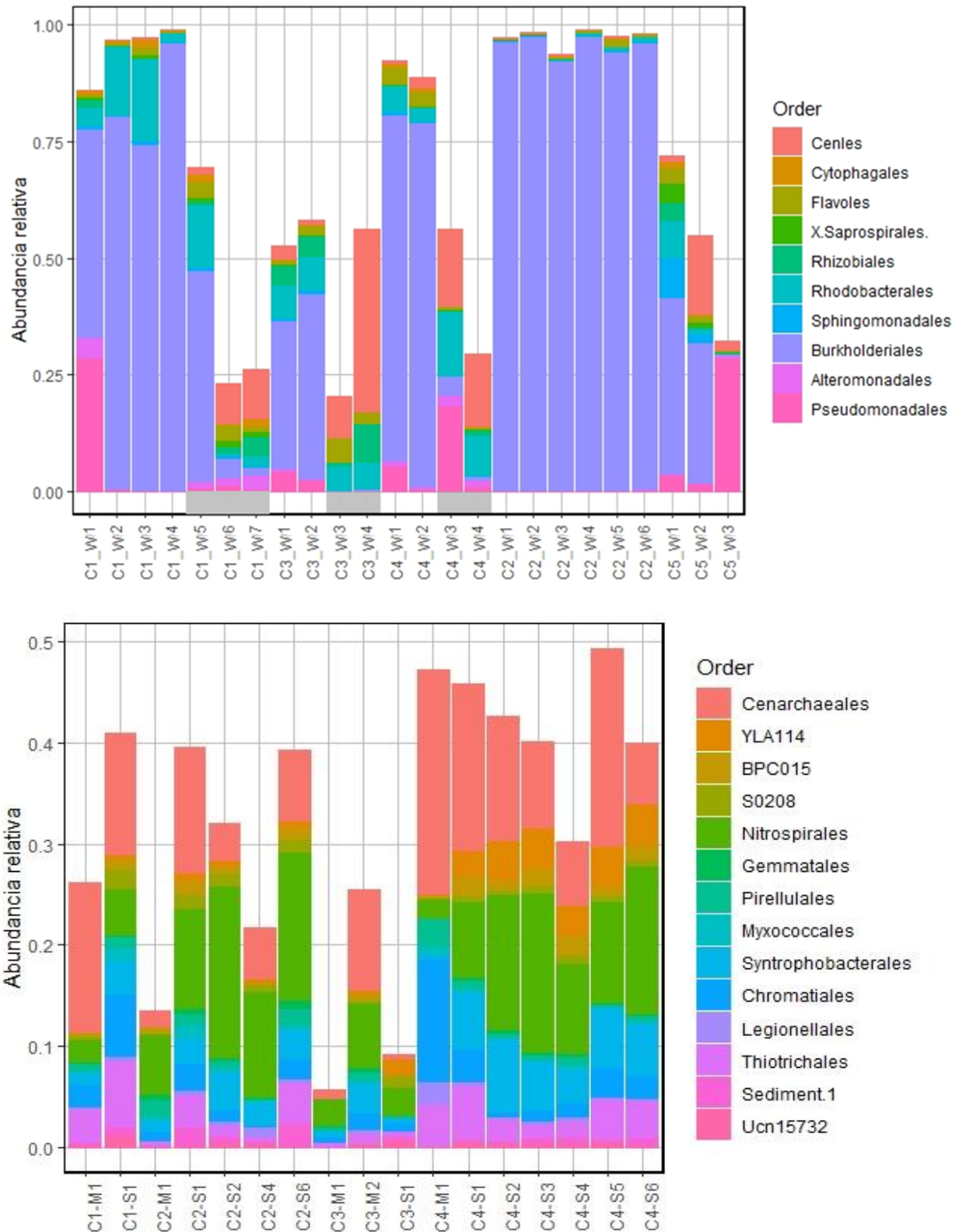


Figura 9. Principales órdenes de las muestras de agua (superior) donde se señala con un cuadro gris las muestras de agua de la haloclina; y principales órdenes de las muestras de sedimentos y tapetes (inferior).

9.5. Perturbación antrópica

Para observar si existe un efecto antrópico evidente en las columnas de agua estudiadas, nos referimos a la detección de nutrientes y metales en la columna de agua. En la tabla 7 se observa que, los valores de FRS (Fósforo Reactivo Soluble) y amonio tienden a aumentar conforme a la profundidad; mientras que, para el nitrito no se observó un patrón claro. Los nitratos, de manera general, disminuyen con forme a la profundidad y es la principal forma de nitrógeno disponible en los sistemas. Además, se calculó la relación de nitrógeno y fósforo (relación Redfield 16:1) para conocer cuál pudiera ser el nutriente limitante en estos sitios.

Tabla 7. Concentración de FRS, amonio, nitrito y nitrato en la columna de agua de los sitios muestreados.

Sitio	Profundidad (m)	FRS* (μM)	NH ₄ ⁺ (μM)	NO ₂ ⁻ (μM)	NO ₃ ⁻ (μM)	N:P**
Chikin Ha	0	0.09	0.05	0.12	92.2	79.0
	10.3	0.26	0.46	0.06	103.7	64.1
	11.8	0.26	0.37	0.03	102.7	147.9
	12.5	0.48	0.52	0.07	72.3	128.4
	13.6	0.68	1.49	0.05	26.4	45.6
	14.8	0.43	0.66	0.04	20.1	49.1
Corazón del Paraiso	12.2	0.23	0.92	0.14	150.6	33.1
	15.8	0.23	0.86	0.14	142.3	114.0
	16.8	0.9	1.84	1.98	69.6	29.1
	17.8	0.98	2.32	3.07	15	63.1
Chac Mool	8	0.33	0.66	0.06	108.5	126.7
	11	0.24	0.55	0.08	81.7	128.5
	12	0.33	1.23	0.36	85.3	56.5
	12.7	0.5	1.6	0.65	22.7	116.9
Aktun Ha	14.5	0.08	0.32	0.11	136	79.5
	15.1	0.09	0.29	0.12	129.4	30.3
	16.7	0.08	0.15	0.14	148.7	60.4
	18.6	0.12	0.28	0.1	148.3	90.3
	19.8	0.2	1.76	0.12	140.2	97.0
	21.4	0.24	1.27	0.17	149	80.6
Zapote	0	0.53	0.04	0.07	24.3	45.3
	10	0.33	0.69	0.1	42.5	48.3
	32	0.24	0.51	0.09	31.7	20.6
	35	1.2	2.67	0.04	0.6	17.6

*FRS fosforo soluble reactivo; **Relación N:P calculada con los valores de Nitrógeno y Fósforo total, los cuales se pueden observar en el Anexo 1.

Relacionado a los metales, los que estuvieron arriba del nivel de detección (1 μg L⁻¹) del ICP-OES fueron el bario, cobre, molibdeno, vanadio y zinc. En la tabla 8 se presentan los promedios de las concentraciones por sitio y se observa que ninguno excede los 0.03 mg L⁻¹.

Tabla 8. Promedio de las concentraciones de los metales bario (Ba), cobre (Cu), molibdeno (Mo), vanadio (V) y zinc (Zn) en los sitios de muestreo.

Sitio	Ba ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Mo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	V ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Chikin Ha	13 \pm 2	20 \pm 12	DLD	DLD	12 \pm 11
Corazón del Paraíso	20 \pm 1	14 \pm 7	14 \pm 4	4 \pm 1	6 \pm 1
Chac Mool	13 \pm 0	12 \pm 4	14 \pm 5	3 \pm 0	7 \pm 4
Aktun Ha	21 \pm 1	DLD	10 \pm 1	5 \pm 0	9 \pm 8

DLD: debajo del límite de detección, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$

Del carbono total que se determinó en la columna de agua de los sitios (Tabla 9), no se presenta un patrón claro; sin embargo, la mayoría corresponde a la fracción inorgánica disuelta que pertenece a carbonatos y bicarbonatos característicos de ambientes kársticos (19-59 mg L^{-1}). Mientras que, existe una menor porción de carbono orgánico disuelto (0-7.1 mg L^{-1}).

Tabla 9. Concentración de carbono total, inorgánico y orgánico disuelto en la columna de agua de los sitios de muestreo.

Sitio	Profundidad (m)	Carbono Total disuelto (mg L^{-1})	Carbono inorgánico disuelto (mg L^{-1})	Carbono orgánico disuelto (mg L^{-1})
Chikin Ha	0	37.26	34.31	2.95
	10.3	37.67	34.91	2.76
	11.8	45.59	40.47	5.12
	12.5	43.16	38.47	4.68
	13.6	19.82	19.3	0.53
	14.8	26.3	22.77	3.53
Corazón del Paraíso	12.2	28.71	26.78	1.93
	15.8	48.72	43.77	4.96
	16.8	32.75	30.36	2.39
	17.8	41.63	35.39	6.35
Chac Mool	8	42.6	40.15	2.45
	11	59.43	59.43	0.00
	12	25.21	22.64	2.57
	12.7	37.64	30.91	6.74
Aktun Ha	14.5	49.91	45.53	4.37
	15.1	62.12	58.58	3.65
	16.6	41.14	36.54	4.61
	18.6	57.9	53.35	5.55
	19.8	32.94	28.88	4.06
	21.4	59.68	52.55	7.14
Zapote	10	37.95	35.55	2.41
	32	48.84	45.78	3.06
	35	52.32	49.91	2.41

La norma oficial mexicana NOM –127- SSA1 -1994 establece los límites máximos permisibles de diversos parámetros para determinar la calidad del agua para uso y consumo humano. Algunos de estos parámetros contemplan concentración de N en diversas formas y metales. En la tabla 10 se condensa esta información y se observa que las concentraciones que se detectaron en los sitios de muestreo son menores que las establecidas por la norma.

Tabla 10. Promedio de las concentraciones determinadas en los sitios de muestreo, de diversos indicadores de calidad del agua para uso y consumo humano de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM –127- SSA1 -1994, así como los límites máximos permisibles establecidos por la misma.

Sitio	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻	Ba	Cu	Zn
	(mg L ⁻¹)					
Chikin Ha	0.00	0.00	1.39	0.01	0.01	0.01
Aktun Ha	0.01	0.00	1.99	0.02	0.01	0.01
Corazón del Paraíso	0.01	0.00	2.05	0.02	0.01	<DLD
Chac Mool	0.01	0.00	1.33	0.01	<DLD	0.01
Zapote	0.01	0.00	0.35	ND	ND	ND
NOM 127	0.50	0.05	10.00	0.70	2.00	5.00

DLD: debajo del límite de detección, 1 µg L⁻¹; ND No Determinado

Para conocer qué variables fisicoquímicas agrupan las muestras de agua y como se organiza éstas, se realizó un análisis de componentes principales (PCA biplot) con los resultados de los análisis fisicoquímicos (pH, ORP, conductividad eléctrica, concentración de iones, nutrientes, metales y carbono) de acuerdo al tipo de agua. En la figura 10 podemos observar una clara agrupación de las muestra de agua meteórica; las cuales, se distancian de las muestras de agua de la haloclina. Se ubican los vectores de cinco de las variables fisicoquímicas (conductividad eléctrica, concentración de iones Cl⁻, Na⁺, SO₄⁻² y concentración de litio), los cuales han sido utilizados en este trabajo como marcadores de la intrusión de agua marina. Estos resultados nos indican que la composición química del agua es un factor determinante para la agrupación hidroquímica de las muestras del acuífero. Por otra parte, en el sitio C3 (Corazón del Paraíso) en las muestras de haloclina se alejan de las muestra de agua meteórica, debido a la concentración de nitrito en la columna de agua.

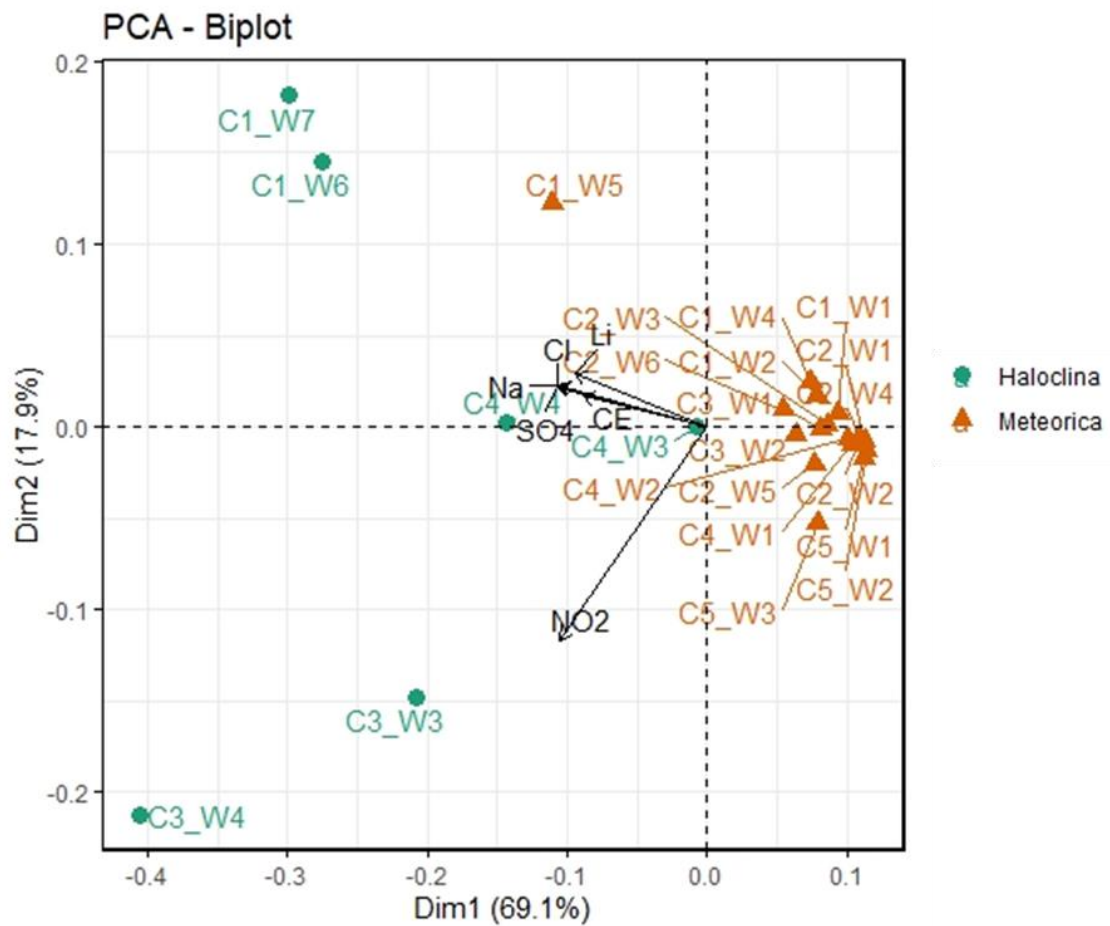


Figura 10. Distribución de las muestras de agua en un plano euclidiano acorde a sus características hidroquímicas en los sitios muestreados, análisis de tipo de componentes principales (PCA biplot).

9.6. Diversidad bacteriana y el ambiente hidroquímico

Se realizaron algunos análisis que pudieran establecer relaciones entre las características químicas de las muestras de agua (tipo de agua) y las características de los sitios (tipo de cenote). Se encontró que el indicador que mejor agrupa las muestras es el tipo de agua, es decir, agua meteórica o haloclina (Fig. 11).

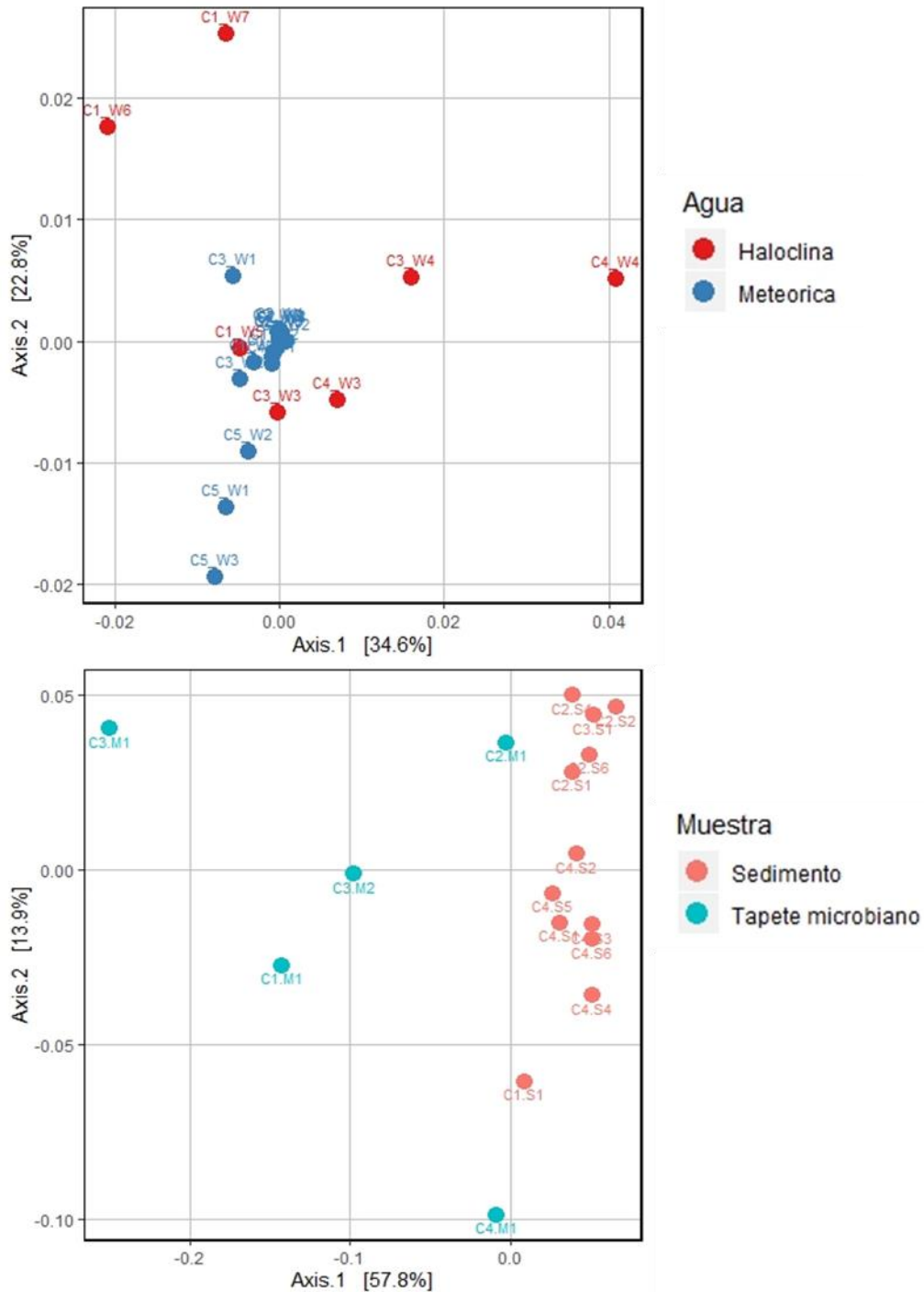


Figura 11. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA-Unifrac no poderado) del componente biológico de las muestras de agua (superior) y de las muestras de sedimentos y tapetes microbianos (inferior).

Se observó una agrupación de las comunidades bacterianas con relación al tipo de agua, sugiriendo que la salinidad pudiera ser una variable determinante para diferenciar entre las comunidades bacterianas de estas muestras. Ésto se puede ver en el análisis de coordenadas principales para las muestras de agua (Fig. 11, superior). Por otra parte, para las muestras de sedimentos y tapetes microbianos se puede observar de manera general que existen diferencias entre ellas, pero no se puede establecer patrones entre ellas (Fig. 11, inferior).

Para saber cuáles eran los grupos de bacterias y arqueas dominantes en cada tipo de muestra de agua (meteórica o haloclina), se realizó un análisis de componentes principales considerando la abundancia de las diversas especies bacterianas (Fig. 12). En este análisis se encontró que arqueas del género *Nitrosopumilus* (Archaea) se encuentran mayormente en las muestras de agua de la haloclina. Mientras que, bacterias no identificadas de la familia Comamonadaceae (Betaproteobacteria) son representativas de las muestras de agua meteórica. Asimismo, esta tendencia se confirma con la abundancia de estos géneros bacterianos y arqueanos en las muestras (Tabla 11). Un análisis BLAST mostró que esta secuencia tenía 100% identidad con secuencias de bacterias *Curvibacter* sp.

Una bacteria de la familia Helicobacteraceae se encontró principalmente en la nube de Zapote, la cual tiene un 98.81% de identidad con una encontrada en un biofilm de acuífero kárstico (Texas, GenBank No. FJ165502) y están relacionadas al género *Arcobacter* (99%). Este género está involucrado en procesos de S, como en el consumo de H₂S, lo cual coincide con su mayor presencia en la nube de ácido sulfhídrico.

Acinetobacter se encontró principalmente en una muestra de agua meteórica de Chikin Ha y en la nube de ácido sulfhídrico de Zapote. *Acinetobacter* ha sido reportada en una amplia variedad de ambientes, por ejemplo; suelo, agua, comida y áreas contaminadas con hidrocarburos, inclusive siendo hospederos de humanos, y otros vertebrados e insectos.

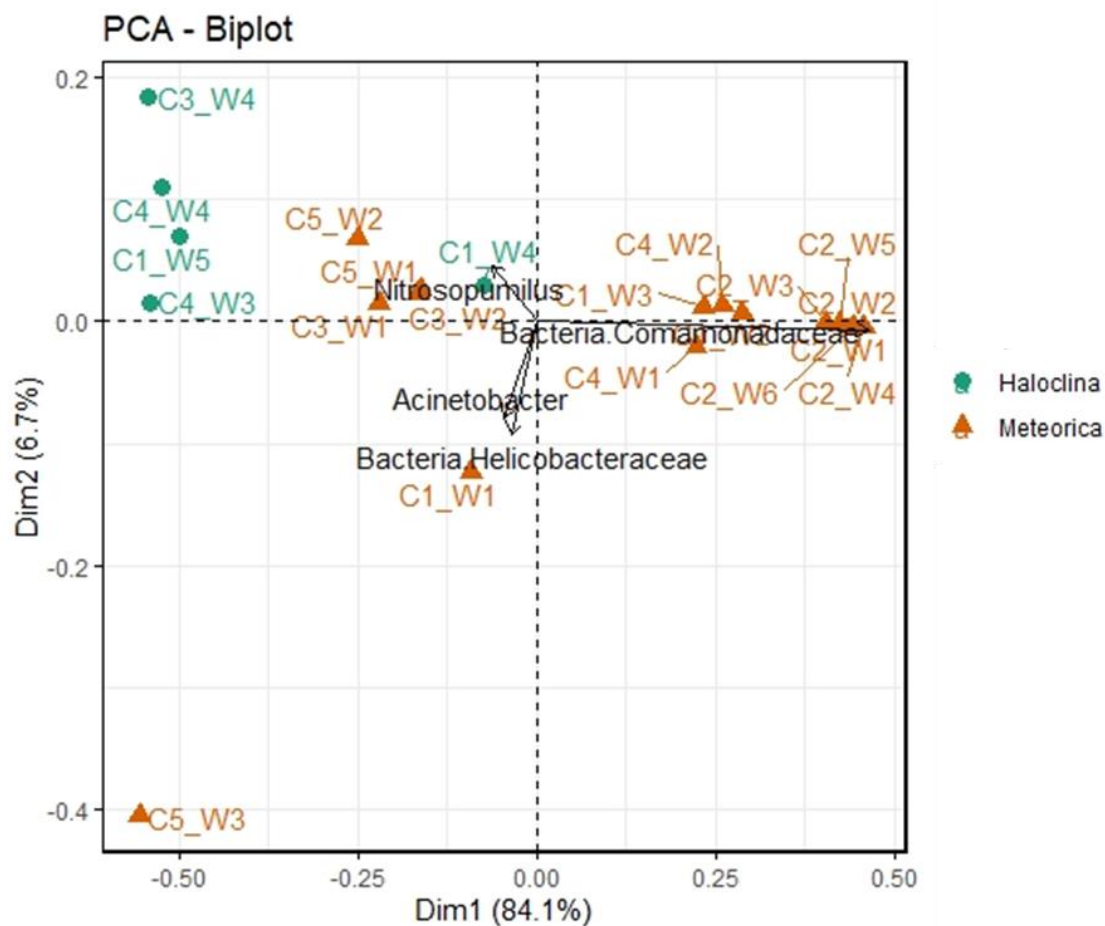


Figura 12. PCA Biplot para las muestras de agua, considerando la abundancia de bacterias y arqueas detectadas, donde se muestra las principales especies procarióticas encontradas en cada tipo de muestra de la columna de agua, así como en los sitios analizados.

Tabla 11. Porcentaje de los principales géneros que dominan las muestras de agua

Tipo de muestra	<i>Nitrosopumilus</i>	Bacteria Comamonadaceae	<i>Acinetobacter</i>	Bacteria Helicobacteraceae
Meteórica	1.19 ± 0.03	81.47 ± 0.32	5.00 ± 0.09	2.95 ± 0.10
Haloclina	4.75 ± 0.13	3.20 ± 0.19	1.42 ± 0.08	0.02 ± 0.00

Para los sedimentos y tapetes, se realizó un análisis similar y se encontró que, bacterias no identificadas del género Chromatiaceae están presentes únicamente en las muestras de tapetes microbianos; mientras que, bacterias no identificadas del género Cenarchaeaceae son mayoritarias en las muestras de sedimentos (Fig. 13, Tabla 12).

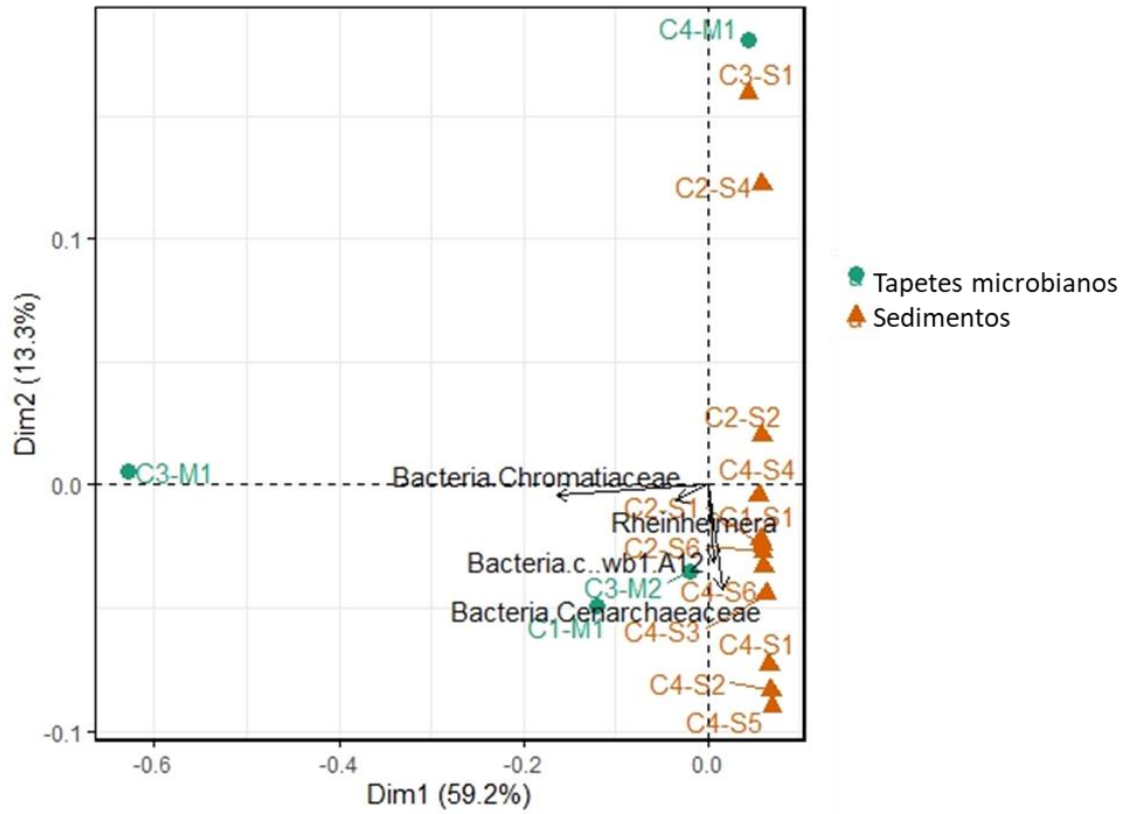


Figura 13. PCA Biplot para las muestras de sedimento y tapetes microbianos.

Tabla 12. Porcentaje de los principales géneros que dominan las muestras de sedimentos y tapetes microbianos.

Muestra	Bacteria Chromatiaceae	<i>Rheinheimera</i>	Bacteria Cenarchaeaceae	Bacteria c: wb1-A12
Sedimento	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.00	27.28 ± 0.05	21.64 ± 0.04
Tapetes	22.26 ± 0.31	9.14 ± 0.06	6.17 ± 0.06	4.85 ± 0.04

Finalmente, se hicieron diagramas de Venn para observar cuántas especies (como ASVs) únicas y compartidas habían en el agua meteórica y haloclina, así como por sitio de estudio (Fig. 14). Por tipo de agua, el agua meteórica mostró que un 76.8% de ASVs son únicos ésta; mientras que, el agua de la haloclina, de los ASVs que tiene, un 84.5% son exclusivos de la haloclina. Sugiriendo que hay un 15.5-23.3% de bacterias que se comparte entre los dos tipos de agua. En conjunto los tipos de agua comparten 1547 ASVs.

Por sitio, el cenote 1 (Chikin Ha) es el que mayor numero de ASVs únicos presenta (80.8%); sin embargo, aquellos sitios que han sido clasificados como sitios anquihalinos son los que tienen mayor número de ASVs únicos (Chikin Ha, Corazón del Paraíso y Chac Mool). En conjunto, los sitios comparten únicamente 41 ASVs.

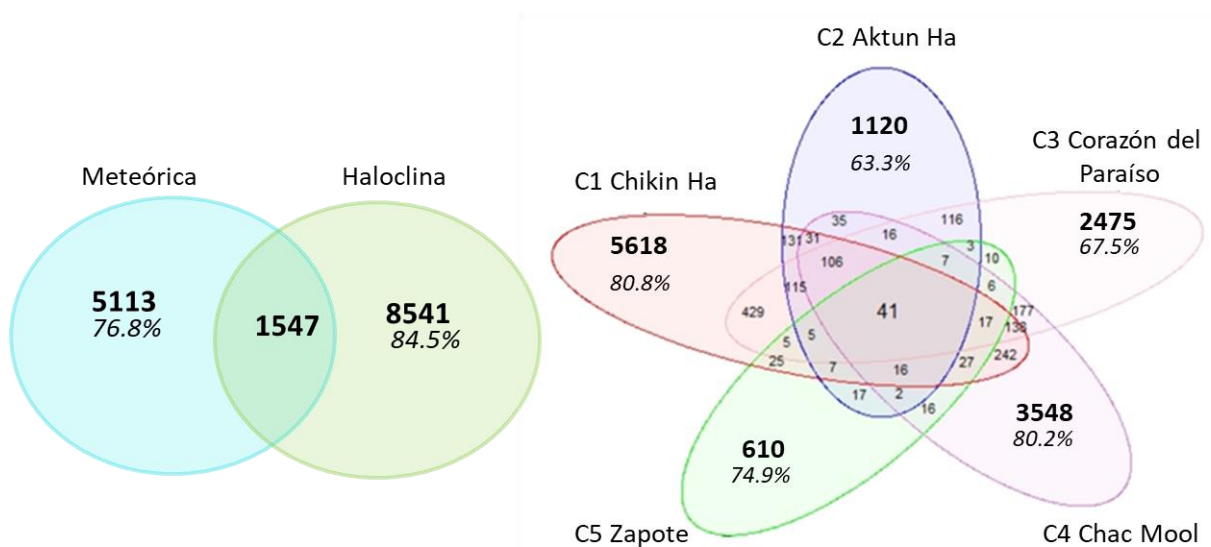


Figura 14. Número de ASVs compartidos por tipo de gua (izquierda) y por sitio (derecha).

10. Discusión

10.1 Caracterización química de la columna de agua

La caracterización de la columna de agua de los sitios permitió clasificarlos en sistemas anquihalinos y no anquihalinos. Para establecer esta clasificación se utilizaron los parámetros de conductividad eléctrica, la concentración de iones mayoritarios como Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- y SO_4^{-2} ; así como la concentración de los metales como el estroncio (Sr) y litio (Li). Todos estos parámetros mostraron el mismo comportamiento en los sitios anquihalinos (Chikin Ha, Corazón del Paraíso y Chac Mool); esto es, un aumento con forme a la profundidad (Fig. 4). Los valores de la conductividad eléctrica en profundidad se encuentran entre los 45 y 60 mS cm^{-1} ; mientras que, la conductividad promedio del agua de mar que se reporta es de 50 mS cm^{-1} (Zheng et al., 2018). Los iones mayoritarios en agua de mar son Cl^- y Na^+ ; éstos alcanzaron concentraciones de hasta 17 000 y 9000 mg L^{-1} , respectivamente. Los valores típicos que se reportan para el agua de mar son entre 1149 y hasta 10781 mg L^{-1} para el Na^+ y de 1772 a 19352 mg L^{-1} para el Cl^- (Libes, 2009; Millero, 2013). Finalmente, los metales como el estroncio y litio también son utilizados con frecuencia como marcadores de agua marina. La concentración que se detectó a profundidad en estos sitios fue de entre 0.13 y 0.21 mg L^{-1} para estroncio y de 6 a 8 mg L^{-1} para litio; los cuales corresponden con valores que se reportan para agua de mar (0.18 mg L^{-1} para estroncio y 8 mg L^{-1} para litio) (Brown et al., 1989).

En los sistemas no anquihalinos (Aktun Ha y Zapote) estas mismas variables tienen un comportamiento constante a lo largo de la columna de agua (Fig. 5), y no se deduce entonces la presencia de la haloclina en la zona muestreada. El pH es circumneutral en todos los sitios, con excepción de un punto en el sitio Corazón del Paraíso que alcanzó un valor de 8.5; sin embargo, son valores dentro del rango de los reportados en diferentes cenotes de la región (Reeve & Perry, 1994; Alcocer et al., 1998). El ORP presentó valores positivos en superficie para todo los sitios, disminuyendo conforme a la profundidad, indicando un ambiente más reducido conforme a la profundidad. En el sitio Zapote se reportó un valor de -284.5 mV alrededor de los 35 metros; sin embargo, estudios previos describen la existencia de una nube de sulfuro de hidrógeno a la profundidad donde fue tomada esta muestra (Stinnesbeck et al., 2017) (Fig. 3).

10.2 Distribución taxonómica

Para los análisis de distribución taxonómica se utilizó la base de datos de GreenGenes. Los cinco principales filos para la columna de agua fueron: Actinobacteria, Bacteroidetes, Crenarchaeota, Proteobacteria y Verrucomicrobia; mientras que, para las muestras de sedimentos y tapetes microbianos fueron: Acidobacteria, Crenarchaeota, NC10, Nitrospirae y Proteobacteria (Fig. 8). Considerando la abundancia relativa de estos filos, Proteobacteria fue el más abundante en todas las

muestras. En la columna de agua Proteobacteria representó cerca del 83% de la abundancia relativa 16S rRNA; mientras que, en sedimentos y tapetes fue del 35% y 59%, respectivamente (Tabla 6). Los grupos taxonómicos que han sido reportados con frecuencia en diversos estudios en cuevas son Actinobacteria -dominando comúnmente muestras de suelos-, Acidobacteria, Bacteroidetes -el cual, a pesar de ser un grupo frecuente en estos ambientes aún se desconoce su función, aunque se asumen metabolismos heterotróficos-, Nitrospirae -reportado principalmente en ambientes acuáticos-, Proteobacteria -que es un grupo taxonómico cosmopolita y se ha encontrado en muestras de agua, rocas, sedimentos y tapetes microbianos- y Verrucomicrobia -que ha sido reportado en diversos hábitats como suelo, agua meteórica y agua marina entre otros- (Engel, 2010; Tang et al., 2012; Tomczyk y Zielenkiewicz, 2015).

10.3 Perturbación antrópica

Una de las principales actividades antrópicas que degradan la calidad del agua subterránea es la agricultura, debido a la adición de fertilizantes y plaguicidas que contienen diferentes diversos compuestos con nitrógeno y fósforo (Pacheco y Cabrera 1996; Pacheco et al., 2001). Los resultados del análisis de nutrientes indican que el nitrógeno es la principal forma de nutriente presente en la columna de agua. Este se encuentra en tres especies químicas: nitrato, nitrito y amonio. El nitrato (NO_3^-) fue el que presentó mayor concentración, especialmente en la zona superficial con valores de hasta 150 μM , disminuyendo su concentración conforme a la profundidad (alcanzando hasta 0.6 μM) (Tabla 3). Debido a que el nitrato es la forma menos reducida de nitrógeno en forma de nutriente y al comportamiento que presenta a lo largo de la columna, su presencia nos sugiere un ambiente óxico en superficie; que se atenúa en zonas de mayor profundidad, dónde generalmente, el nitrito (NO_2^-) y amonio (NH_4^+) (especies reducidas del nitrógeno), aumentan su concentración. Ésto se correlaciona con los valores de ORP que se reportan para la columna de agua; donde los valores más positivos se registran en la parte superior (>180 mV, ambiente óxico) disminuyendo conforme a la profundidad (48 mV ambiente menos óxico). En un estudio realizado por Mutchler et al. (2007) se reportan valores promedio de concentración de nitrato de 73.5 μM , el cual se encuentra dentro de los promedios para los sitios de este proyecto. Sin embargo, Hernández-Terrones et al. (2010), reportan valores promedios de nitratos de hasta 368.3 μM para la región, lo cual excede los límites establecidos por la Organización Mundial de la Salud para agua destinada a consumo humano.

Por otra parte, las concentraciones de fosfato presentan un patrón de aumento conforme a la profundidad. Estos valores están entre los 0.08 y 1.2 μM (Tabla 7). El valor de la relación de Redfield calculada es mayor a la proporción establecida (N:P, 16:1), lo

que nos sugiere que el fosfato es el nutriente limitante en todos los sitios y puntos muestreados. Esta relación ha sido calculada por Hernández-Terrones et al. (2010) para diferentes ambientes en la región; encontrando también altos valores para todos los ambientes estudiados, incluidos los cenotes, sugiriendo también una deficiencia de fósforo en el sistema kárstico.

Respecto al carbono presente en la columna de agua, las concentraciones del carbono total disuelto estuvieron alrededor de los 19.82 mg L⁻¹ y hasta los 59.43 mg L⁻¹, de los cuales, la fracción inorgánica representó hasta un 100% de la fracción total de carbono disuelto en algunas de las muestras (Tabla 9). Esto empata con la naturaleza de los sitios; ya que, al ser un ambiente kárstico, la fracción inorgánica se debe a los carbonatos y bicarbonatos provenientes de las rocas calizas. El carbono orgánico representó la fracción menor para los sitios y profundidades; pero no se observó un patrón claro de las concentraciones a lo largo de la columna de agua. Un estudio previo realizado por Gulley et al. (2016) en otros cenotes de Quintana Roo, reporta valores de carbono orgánico de entre 1.1 y 3.3 mg L⁻¹ en la columna de agua, y hasta de 70.4 mg L⁻¹ en la zona de mezcla de uno de los sitios (comportamiento que no se presentó en otro de los sitios de ese estudio). Aunque en este trabajo se reportan valores un poco mayores a los Gulely et al. (2016), éstos no exceden los 7.14 mg L⁻¹ y no se presenta un aumento en la zona de mezcla o haloclina.

En este estudio también se determinaron elementos como bario, cobre, molibdeno, vanadio y zinc. La concentración promedio de estos metales no excedió los 25 µg L⁻¹ (Tabla 8), y en algunos casos la concentración fue por debajo del límite de detección del equipo (1 µg L⁻¹). Estudios previos sobre metales se han realizado principalmente en el estado de Yucatán; donde ya se han reportado concentraciones de cadmio mayores a los límites máximos permisibles por las normas mexicanas (Pacheco-Ávila et al., 2011) e inclusive se han detectado metales como el mercurio en muestras de orina de infantes (Arcega et al., 2017). Queda mencionar que los resultados aquí mostrados son interpretados como formas solubles que se encuentran en la columna de agua.

En México, la norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994 establece los límites máximos permisibles de algunos parámetros para determinar la calidad del agua destinada para uso y consumo humano. Entre éstos se encuentran el N en forma de amonio, nitrito y nitrato; así como el bario, cobre y zinc. Los promedios de las concentraciones por sitio encontrados en este estudio (Tabla 10), no exceden los límites establecidos por la norma. Un estudio realizado por Alcocer et al. (1998) reportan los valores de N-NO₃⁻ y N-NO₂⁻ de diversos cenotes de la costa de Quintana Roo, uno de ellos también fue estudiado en este proyecto. Ellos reportan una concentración de 0.0025 a 0.003 mg L⁻¹ de N-NO₂⁻ y 0.627 a 1.09 mg L⁻¹ de N-NO₃⁻ para el cenote Aktun Ha (Carwash). A pesar de que en este trabajo se reporta una

concentración mayor (1.09 mg L^{-1} de N-NO_3^-), está no excede los límites establecidos por la norma correspondiente.

A su vez, la Organización Mundial de la Salud, reporta las concentraciones aceptables para diversos metales como el bario, cobre y zinc, en su publicación guía sobre la calidad del agua para consumo humano. Las concentraciones para los metales aquí reportados están dentro de los rangos reportados en diversos países del mundo. La concentración de bario en agua subterránea de Países Bajos es entre los 0.23 y 2.5 mg L^{-1} . Por otra parte, diversos estudios en sitios de Europa, Canadá y Estados Unidos definen un rango de <0.005 a $> 30 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre para agua destinada a consumo humano. Finalmente, los valores límite establecidos para la concentración de zinc en agua subterránea es de 0.01 a 0.04 mg L^{-1} (WHO, 1996).

10.4 Diversidad bacteriana y el ambiente hidroquímico

Para conocer la relación de la diversidad bacteriana con el ambiente hidroquímico primero se realizó un análisis de componentes principales (PCA) empleado los parámetros fisicoquímicos (Fig. 11), en donde se encontró que el tipo de agua (meteórica o haloclina) es el mejor indicador para agrupar las muestras. En este análisis, se observa una clara agrupación de las muestras que pertenecen al tipo de agua meteórica y al de haloclina. Mientras que, para las muestras de sedimento y tapetes microbianos, la agrupación sólo es por el tipo de muestra; es decir, se diferencian entre ellas. La hipótesis inicialmente planteada para este trabajo de investigación, fue que, al saberse que el acuífero de Quintana Roo estaba interconectado, se consideró que la diversidad de la comunidad bacteriana presente en los sitios de estudio sería similar en aquellos sitios que se encuentren cercanos entre sí; y se diferenciaran de los sitios más distantes. Esta hipótesis fue cierta para el agua meteórica. En la Figura 11, se denota que las muestras de los cenotes cercanos como Chikin Ha, Aktun Ha, Corazón del Paraíso y Chac Mol se agrupan (C1-C4), señalando una microbiota muy parecida en el agua meteórica; pero no en la haloclina. Mientras que, para el cenote Zapote (C5), la estructura de la comunidad fue diferente en las tres muestras colectadas. Este cenote es el más lejano en distancia geográfica, pero también tiene una génesis diferente a los otros. Además, tiene una morfología de tipo caverna, donde hay entrada de material vegetal por los árboles circundantes a toda la columna de agua. Así mismo, tampoco hay reportes de conductos o pasajes que interconecten este cenote a otro sistema de cuevas inundadas (Ritter et al. 2019).

También se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) para conocer que géneros dominan en cada tipo de agua, considerando las abundancias relativas de los géneros procarióticos encontrados (Fig. 12). Se encontró que, para las muestras de agua de la haloclina el género con mayor presencia fue *Nitrosopumilus* el cual, debido a los requerimientos de salinidad que tienen estos organismos es común encontrarlos

en agua salobre y agua marina (Quin et al., 2017). Mientras que, bacterias no identificadas de la familia Comamonadaceae fueron representativas en las muestras de agua meteórica. Un análisis BLAST mostró que esta secuencia tenía 100% identidad con secuencias de *Curvibacter* sp. la cual ha sido aislada de agua de pozos. Una bacteria perteneciente a la familia Helicobacteraceae se encontró principalmente en la nube de Zapote, ésta tiene un 98.81% de identidad con una encontrada en un biofilm de un acuífero kárstico. Esta familia es dominada por el género *Helicobacter* el cual está involucrado en procesos de azufre (Mitchell et al., 2014). *Acitenobacter* se encontró principalmente en una muestra de agua meteórica del sitio Chikin Ha y en la nube de ácido sulfhídrico del sitio Zapote; sin embargo, este género ha sido reportado en diversos ambientes.

De igual manera se realizó un PCoA para las muestras de sedimentos y tapetes microbianos (Fig 13). Para las muestras de sedimentos, las bacterias de la familia Cenarchaeacea y bacterias de la clase wb1 A12 fueron las de mayor dominancia; mientras que, para las muestras de tapetes microbianos dominaron bacterias de la familia Chromatiaceae y el género *Rheinheimera* (Tabla 11). La familia Chromatiaceae pertenece al filo Proteobacteria; en ella se encuentran bacterias asociadas al ciclo del S, las cuales generalmente crecen en ambientes anóxicos (Imhoff, 2014); además, el género *Rheinheimera* pertenece a esta familia.

Para conocer el número de ASVs únicos y compartidos por tipo de agua y por sitio se realizó un diagrama de Venn (Fig. 14). Podemos ver que el agua de la haloclina presenta un mayor número de ASVs en comparación con el agua meteórica. Mientras que, los sitios caracterizados como anquihalinos son los que presentan un mayor número de ASVs. Los 41 ASVs compartidos corresponden a los filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Crenarchaeota, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria y Verrucomicrobia. Proteobacteria fue el filo con el mayor número de ASVs compartidos (28); de los cuales, 15 pertenecen a la clase Gammaproteobacteria, 8 a Betaproteobacteria y 5 a Alphaproteobacteria. Los organismos de estas tres clases son metabólicamente diversos ya que pueden ser aerobios obligados y anaerobios facultativos, quimioorganotróficos, quimiolitótrofos obligados o facultativos. Microorganismos pertenecientes a Alphaproteobacteria son comúnmente encontrados en las muestras más superficiales y constituyen una fracción pequeña de las poblaciones que habitan en cueva inundada. Organismos de Betaproteobacteria han sido reportados en muestras de agua y tapetes microbianos de la cueva Movile; mientras que, microorganismos de Gammaproteobacteria han sido reportados en ambientes ricos en azufre (Tomczyk y Zielenkiewicz, 2015).

Conclusiones

En el presente estudio se encontró la presencia de haloclina en las columnas de agua someras muestreadas cerca de la línea de costa del Noreste de Quintana Roo. Esta haloclina (localizada entre -2 y -12 m sobre el nivel medio del mar) se detectó a través de las características hidroquímicas destacables como una mayor conductividad eléctrica en comparación con el agua meteórica, una mayor concentración de iones Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} y del metal alcalino, litio. Parámetros que son comúnmente utilizados como indicadores de la intrusión de agua marina.

Respecto a diversidad procariótica, se encontró que: i) los perfiles donde se encuentra agua meteórica y haloclina hay una mayor diversidad y riqueza de especies procarióticas, ii) hay un gran número exclusivo de filotipos en la haloclina y en el agua meteórica, y que pocos se comparten, iii) la estructura de la comunidad en el agua meteórica de los cuatro cenotes más cercanos (Aktun Ha, Corazón del Paraíso, Chac Mool y Chikin Ha) es muy similar, sugiriendo una posible interconexión subterránea, y que iv) las muestras de tapetes y sedimentos tienen también una microbiota también característica y diferente.

El género *Nitrosopumilus* (del dominio Archaea) fue característico de las muestras de haloclina, debido al requerimiento salino que tienen y a su presencia en el agua marina; mientras que, bacterias de la familia Comamonadaceae son representativas del agua meteórica.

Finalmente, respecto a los parámetros establecidos por la normatividad mexicana para el agua destinada a consumo humano, ninguna de las muestras obtenidas del acuífero somero excedió los límites máximos permisibles para las variables determinadas en este estudio.

12. Referencias

- Aguilar-Duarte Y., Bautista F., Mendoza M. E., Frausto O., Ihl T., Delgado C. (2016) IVAKY: Índice de la vulnerabilidad del acuífero kárstico yucateco a la contaminación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 15(3): 913-933.
- Aguilar Rangel, E.J. (2018) Tesis: Análisis de la comunidad bacteriana de la zona saturada de un piedemonte en un distrito de riego y su potencial en la remoción de nitrógeno. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México 68 pp.
- Alcocer J., Lugo A., Marín L. E., Escobar E. (1998) Hydrochemistry of waters from five cenotes and evaluation of their suitability for drinking water supplies, northeastern Yucatan, Mexico. *Hydrogeology Journal* 6: 293-301.
- Arcega-Cabrera F., Garza-Pérez R., Noreña-Barroso E., Ocegüera-Vargas L. (2015) Impacts of geochemical and environmental factors on seasonal variations of heavy metals in a coastal lagoon, Yucatan, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 94, 58-65.
- Bakalowicz M. (2005) Karst groundwater: a challenge for new resources. *Hydrogeology Journal*. 13, 148-160.
- Baker G. C., Smith J. J., Cowan D. A., (2003) Review and re-analysis of domain specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55(3), 55 541-555.
- Barton H. A., & Northup D. E. (2006) Geomicrobiology in cave environments: Past, current and future perspectives. *Journal of Caves and Karst Studies*. 60(1) 163-178.
- Barton H. A., & Jurado V. (2007) What's up down there? Microbial diversity in caves microorganisms in caves survive under nutrient-poor conditions and are metabolically versatile and unexpectedly diverse. *Microbe* 2, 132-138.
- Bauer-Gottwein P., Bibi R. N., Gondwe B. R. N., Charvet G., Marin L. E., Rebolledo-Vieyra M., Merediz-Alonso G. (2011) Review: The Yucatán Peninsula karst aquifer, Mexico. *Hydrogeology Journal* 19: 507-524.
- Beddows P., Blanchon P., Escobar E., Torres-Talamante O. (2007) Los cenotes de la Península de Yucatán *Arqueología Mexicana*. 83, 32-35.
- Cadena-Zamudio J. D., Martínez-Peña M. D., Guzmán-Rodríguez L. F., Artega-Garibay R. I. (2016) Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad* 9(2), 70-83.
- Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A, Holmes S. P. (2016) DADA2: High-resolution simple inference from illumina amplicon data. *Nature Methods* 13(7), 581-583
- Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., Knight R. (2010) Correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nature Publishing Group*. 7(5) 335-336.
- Caporaso J. G., Lauber C. L., Walters W. A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., Knight R. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal* 6(8) 1621-1624.
- Cernatič-Gregorič A. & Zega Mojca (2010) The impact of human activities on dolines (sinkholes) typical geomorphologic features on karst (slovenia) and possibilities. *Geographica Pannonica*. 14(4) 109-117.
- Chakravorty A., Helb D., Burday M., Connell N., Alland D., (2007) A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbial Methods*, 69(2), 330-339.
- Chen Y., Wu L., Boden R., Hilebrand A., Kumaresan D., Moussard H., Baciú M., Lu Y., Murrell C. (2009) Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur – and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. *ISME Journal* 3, 1093-1104.

- Chen Z., Auler A. S., Bakalowicz M., Drew D., Griger F., Hartman J., Jiang G., Moosdorf N., Richts A., Stevanovic Z., Veni G., Goldscheider N. (2017) The world karst aquifer mapping project: concept, mapping procedure and map of Europe. *Hydrogeology Journal*. 25 771-785.
- Coke J. G. (2012) Underwater caves of the Yucatan Peninsula. En: White W. B., Culver D. C., Pipan T. (eds) *Encyclopedia of Caves*. Academic Press.
- DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E. L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Anderson G., L. (2006) Greengenes, a chimerica-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* (72)7, 5069-5072.
- Engel A. S. (2010) Microbial diversity of cave ecosystems. En: Barton L. L. et al., (eds), *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*.
- Engel A. S. (2011) Karst ecosystems. En: Reitner J., Thiel V. (eds) *Encyclopedia of Geobiology*. *Enciclopedia of Earth Sciences Series*. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1>.
- Escolero O. A., Marin L. E., Steinich B., Pacheco A. J., Cabrera S. A., Alcocer J. (2003) Development of a protection strategy of karst limestone aquifer: The Merida Yucatan, Mexico case study. *Water Resources Management* 16: 351-367.
- Fragoso-Servón P., Pereira A., Frausto O., Bautista F. (2014) Relación entre la geodiversidad de Quintana Roo y su biodiversidad. *Quivera*. 16(1): 97-125.
- Gilbert J. A. & Dupont C. L. (2011) Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. *Annual Review of Marine Science*. 3(1) 347-371.
- Gray C. J. & Engel A. S. (2013) Microbial diversity and impact on carbonate geochemistry across a changing geochemical gradient in a karst aquifer. *ISME Journal*. 7, 325–337
- Gulley J. D., Martin J. B., Brown A. (2016) Organic carbon inputs, common ions and degassing: rethinking mixing dissolution in coastal eogenetic carbonate aquifers. *Earth Surface Processes and Landforms* 41, 2098-2110.
- Hernández-León R., Velázquez-Sepúlveda I., Orozco-Mosqueda M. C., Santoyo G., (2010) Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton* (Buenos Aires), 79(2), 133-139.
- Hernández-Terrones L., Rebolledo-Vieyra M., Merino-Ibarra M., Soro M., Le-Cossec A. Monroy.Ríos E. (2011) Groundwater pollution in a karstic region (NE Yucatan): Baseline nutrient content and flux to coastal ecosystems. *Water, Air & Soil Pollution* 218, 517-528.
- Imhoff J.F. (2014) The Family *Chromatiaceae*. En: Rosenberg E., Delong E.F., Lory S., Stackerbrandt E. & Thompson F. (eds) *The prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Isphording W. C. (1975) The physical geology of Yucatan. *Transaction-Gulf Coast Association of Geological Societies*. 25: 231-262.
- Kambesis P. N., Coke J. G. (2016) The Sac Actun System, Quintana Roo, Mexico. *Boletín Geológico y Minero* 127(1): 177-192.
- Kaçaroğlu F. (1999) Review of groundwater pollution and protection in karst areas. *Water, Air, and Soil Pollution* 113, 337-356.
- Kumar V., Maitra S. S., Shukla R. N. (2015) Environmental metagenomics: The data assembly and data analysis perspectives. *Journal of The Institute of Engineers (India) Series A*, 96(1), 71-83.
- Leal-Bautista R. M., Lenczewski M., Morgan C., Gahala A., McLain J. E. (2013) Assessing fecal contamination in groundwater from the Tulum Region, Quintana Roo, Mexico. *Journal of Environmental Protection*. 4: 1272-1279.
- Libes S., (2009) *Introduction to marine biogeochemistry*. San Diego California, EEUU: Academic Press.
- Long P. E., Williams K. H., Hubbard S. S., Banfield J. F. (2016) Microbial Metagenomics Reveals Climate-Relevant Subsurface Biogeochemical Processes. *Trends in Microbiology* 24:600–610.

- Lugo-Hubp J., Aceves-Quesada J. F., Espinasa-Pereña R. (1992) Rasgos geomorfológicos mayores de la Península de Yucatán. *Revista del Instituto de Geología* 10(2): 143-150.
- McMurdie P., & Holmes S. (2013) phyloseq: An R package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *Plos One* 8(4), 12-17
- Medina-Moreno S. A., Jiménez-González A., Gutiérrez-Rojas M., Lizardi-Jiménez M. A. (2014) Hydrocarbon pollution studies of underwater sinkhole along Quintana Roo as a function of tourism development in the mexican caribbean. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13(2): 509-516.
- Metcalfe C. D., Beddows P., Gold Bouchot G., Metcalfe T. L., Li H., Van Lavieren H. (2010) Contaminants in the coastal karst aquifer system along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Environmental Pollution*. 159: 991-997.
- Millero F. J., (2013) Chemical oceanography. Boca Raton, Florida EEUU: CRC Press.
- Mitchell H.M., Rocha G.A., Kaakoush N.O., O'Rourke J.L., Queiroz D.M.M. (2014) The Family Helicobacteraceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Mutchler T., Dunton K. H., Townsend-Small A., Fredriksen S., Rasser M. K. (2007) Isotopic and elemental indicators of nutrient sources and status of coastal habitats in the Caribbean Sea, Yucatan Peninsula, Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 74, 449-457.
- Nold S. C., Pangborn J. B., Zajack H. A., Kendall S. T., Rediske R. R., Biddanda B. A. (2010) Bacterial diversity in submerged sinkhole ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 76(1), 347-351.
- Olsen G. J., Lane D. J., Giovannoni S. J., Pace N. R., Stahl D. A. (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*. 40, 337-365.
- Opsahl S. & Chanton J. P. (2006) Isotopic evidence for methane-based chemosynthesis in the Upper Floridan aquifer food web. *Oecologia* 150, 89-96.
- Pace N. R., Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J., (1986) The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequence. En K.C. Marshall (Ed.) *Advances in Microbial Ecology* (pp 1-55). New York, USA: Springer Science Business Media, LLC.
- Pacheco J. & Cabrera A. (1997) Groundwater contamination by nitrates in the Yucatan Peninsula Mexico. *Hydrogeology Journal* 5(2), 47-52.
- Pacheco J., Marín L., Cabrera A., Steinich B., Escolero O. (2001) Nitrate temporal and spatial patterns in 12 water-supply wells, Yucatan Mexico. *Environmental Geology* 40(6), 708-715.
- Page D., Dillon P., Toze S. (2010) Valuing the subsurface pathogen treatment barrier in water recycling via aquifers for drinking supplies. *Water Research* 44:1841-1852.
- Parise M. & Sammarco M. (2015) The historical use of water resources in karst. *Environmental Earth Sciences* 74: 143-152.
- Perry E., Velazquez-Oliman G., Socki R. A. (2003) Hydrogeology of the Yucatan Peninsula En: Gómez-Pompa A., Allen M. F., Scott F., (eds) *The lowland maya area: three millennia at the human wildland interface*.
- Pohlman J. W., Iliffe T. M., Cifuentes L. A. (1997) A stable isotope study of organic cycling and the ecology of an anchialine cave ecosystem. *Marine Ecology Progress Series* 155, 17-27.
- Pohlman J. W. (2011) The biogeochemistry of anchialine caves: progress and possibilities. *Hydrobiologia* 667, 33-51.
- Polanco Rodríguez A. G., Riba López M. I., DelValls Casillas T. A., Quattrocchi P., Álvarez Cervera F. J., Solorio Sánchez F. J., Navarro Alberto J A. (2015) Risk perception and chronic exposure to organochlorine pesticides in Maya communities of Mexico. *Human and Ecological Risk Assessment*. 21: 1960-1979.
- Quin W., Heal K. R., Ramdasi R., Kobelt J. N., Bertagnolli A.D., Amin S. A., Walker C. B., Urakawa H., Könneke M., Devol A. H., Moffet J. W., Armbrust E. V., Jensen G. J., Ingalls A. E., Stahl D. A. (2017) *Nitrosopumilus maritimus* gen. nov., sp. nov., *Nitrosopumilus cobalamingenus* sp. nov., *Nitrosopumilus oxycliniae* sp. nov., and *Nitrosopumilus ureiphilus* sp. nov., four marine

- ammonia-oxidizing archaea of the phylum *Thaumarchaeota*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67(12) 1-13
- Reeve A. S. & Perry E. C. (1994) Carbonate geochemistry and the concentration of aqueous Mg^{2+} , Sr^{2+} and Ca^{2+} : western north coast of the Yucatan, Mexico. *Chemical Geology* 112, 105-117.
- Rioja-Nieto R., Garza-Pérez R., Álvarez-Filip L., Mariño-Tapia I., Enríquez C. (2019) The Mexican Caribbean: from Xcalak to Holbox. En Sheppard C (Ed.), *Worlds seas: an environmental evaluation*, Volume I: Europe, the Americas and West Africa second edition (637-653). London, British: Academic Press.
- Ritter, S.M., Isenbeck-Schröter, M., Scholz, C., Keppler, F., Gescher, J., Klose, L., ... & Stinnesbeck, W. (2019). Subaqueous speleothems (Hells Bells) formed by the interplay of pelagic redoxcline biogeochemistry and specific hydraulic conditions in the El Zapote sinkhole, Yucatán Peninsula, Mexico. *Biogeosciences*, 16(11), 2285-2305.
- Rodicio M. R. y Mendoza M. C., (2004) Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* 22(4), 238-245.
- Rojas-Herrera R., Zamudio-Maya M., Arena-Ortiz L., Pless R. C., O'Connor-Sánchez A. (2011) Microbial diversity, metagenomics and the Yucatán aquifer. *International Journal of Experimental Botany*. 80: 231-240.
- Rosiles-González G., Ávila-Torres G., Moreno-Valenzuela O. A., Acosta-González G., Leal-Bautista R. M., Grimaldo-Hernández C. D., Brown J. K., Chaidez-Quiroz C., Betancourt W. Q., Gerba C. P., Hernández-Zepeda C. (2017) Occurrence of *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV) in groundwater from a karst aquifer systems in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Food Environmental Virology* 9, 487-487.
- Sahl J. W., Gary M. O., Harris J. K., Spear J. R. (2011) A comparative molecular analysis of water-filled limestone sinkhole in north-eastern Mexico. *Environmental biology* 13(1), 226-240.
- Sauro U. (2003) Dolines and sinkholes: aspects of evolution and problems of classification. *Acta karstológica* 32(2): 41-52.
- Schmitter-Soto J. J., Comín F. A., Escobar-Briones E., Herrera-Silva J., Alcocer J., Suárez-Morales E., Elías-Gutiérrez M., Díaz-Arce V., Marín L. E., Steinich B. (2002) Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia* 467: 215-228.
- Smart P. I., Beddows A.P., Coke J., Doerr S., Smiths S., Whitaker F. F., (2006) Cave development on the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, Quintana Roo, Mexico. En Harmon R. S. y Wiks C. eds., *Perspectives on karst geomorphology, hydrology and geochemistry-A tribute volume to Derek C. Fod and William B White: Geological society of America Special Paper* 404, p. 105-128.
- Stinnesbeck W., Frey E., Zell P., Avilés J., Hering F., Frank N., Arps J., Geenen A., Gescher J., Isenbeck-Schröter M., Ritter S., Stinnesbeck S., Aceves Nuñez E., Fito Dahne V., González González A., Deininger M. (2017) Hells bells – unique speleothems from the Yucatán Peninsula, Mexico, generated under highly specific subaquatic conditions. *Palaeography, Palaeoclimatology, Paleoecology* 489, 209-229.
- Sun D., Jlang X., Wu Q. L., Zhou N. (2013) Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19), 5962-5969.
- Tang Y., Lian B., Dong H., Liu D., Hou W. (2012) Endolithic bacterial communities in dolomite and limestone rocks from the Nanjiang Canyon in Guizhou karst area (China). *Geomicrobiology Journal* 29(3), 213-225.
- Tomczyk-Żak K. & Zielenkiewicz U. (2015) Microbial diversity in caves. *Geomicrobiology Journal* 1-19.
- Torres Díaz M. C., Basulto Solís Y. Y., Cortés Esquivel J., García Uitz K., Koh Sosa A., Puerto Rometo F., Pacheco Ávila J. G. (2014) Evaluación de la vulnerabilidad y riesgo de

- contaminación del agua subterránea en Yucatán. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 1(3): 189-203.
- Valenzuela-Gonzales F., Casillas-Hernández R., Villalpando E., Vargas-Albores F. (2015) The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas* 41(4) 297-313.
- Vartoukian S. R., Palmer R. M., Wade W. G., (2010) Strategies for culture of unculturable bacteria. *FEMS microbiology letters*, 309(1), 1-7.
- Vázquez-Dominguez E., Arita H. T. (2010) The Yucatan peninsula: biogeographical history 65 million years in the making. *Ecography* 33: 212-219.
- Velázquez Aguirre L. (1986) Aplicación de principios geoquímicos en la hidrología kárstica de la península de Yucatán. *Ingeniería Hidráulica en México* 1(3): 21-29.
- World Health Organization (1996) Guidelines for drinking-water quality. WHO Library, Austria.
- Woese C. R. & Fox G. E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090.
- Yañez-Mendoza G., Zarza-Gonzales E., Mejía-Ortiz L. M. (2007) Sistemas anquihalinos. Cap 3 en Mejía-Ortiz L. M. ed. Biodiversidad acuática de la Isla Cozumel 000PP Universidad de Quintana Roo-CONABIO.

13. Anexos

A1. Parámetros hidróquímicos determinados y el cálculo de la relación Redfield.

Sitio	Profundidad (m)	PO ₄ ⁻³ (μM)	NH ₄ ⁺ (μM)	NO ₂ ⁻ (μM)	NO ₃ ⁻ (μM)	P Total (μM)	N Total (μM)	P orgánico (μM)	N orgánico (μM)	Relación Redfield N:P
Chikin Ha	0	0.09	0.05	0.12	92.2	1.53	120.8	1.43	28.48	79.0
	10.3	0.26	0.46	0.06	103.7	1.64	105.1	1.38	0.89	64.1
	11.8	0.26	0.37	0.03	102.7	0.87	128.7	0.61	25.63	147.9
	12.5	0.48	0.52	0.07	72.3	0.69	88.6	0.2	15.73	128.4
	13.6	0.68	1.49	0.05	26.4	1.25	57	0.57	29.08	45.6
	14.8	0.43	0.66	0.04	20.1	0.7	34.4	0.27	13.69	49.1
Corazon del Paraiso	12.2	0.23	0.92	0.14	150.6	3.04	171.8	2.81	20.17	56.5
	15.8	0.23	0.86	0.14	142.3	1.24	145	1	1.66	116.9
	16.8	0.9	1.84	1.98	69.6	1.44	114.5	0.54	41.04	79.5
	17.8	0.98	2.32	3.07	15	3	90.9	2.02	70.48	30.3
Chac Mool	8	0.33	0.66	0.06	108.5	2.83	171	2.5	61.79	60.4
	11	0.24	0.55	0.08	81.7	1.18	106.5	0.94	24.1	90.3
	12	0.33	1.23	0.36	85.3	1.29	125.1	0.96	38.3	97.0
	12.7	0.5	1.6	0.65	22.7	0.93	75	0.44	50.02	80.6
Aktun Ha	14.5	0.08	0.32	0.11	136	4.41	145.8	4.33	9.35	33.1
	15.1	0.09	0.29	0.12	129.4	1.28	145.9	1.19	16.04	114.0
	16.7	0.08	0.15	0.14	148.7	5.88	171.4	5.8	22.45	29.1
	18.6	0.12	0.28	0.1	148.3	2.44	154	2.31	5.3	63.1
	19.8	0.2	1.76	0.12	140.2	1.17	148.2	0.97	6.11	126.7
	21.4	0.24	1.27	0.17	149	1.21	155.5	0.97	5.1	128.5
Zapote	0	0.53	0.04	0.07	24.3	1.27	57.5	0.75	33.08	45.3
	10	0.33	0.69	0.1	42.5	1.67	80.6	1.34	37.28	48.3
	32	0.24	0.51	0.09	31.7	6.16	126.9	5.92	94.61	20.6
	35	1.2	2.67	0.04	0.6	4.27	75.2	3.07	71.86	17.6