



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**PERFIL METAGENÓMICO DE COMUNIDADES
BACTERIANAS EN AGUA SUPERFICIAL DEL VALLE DE
CULIACÁN**

Por:

Kimberly Paola Hernández Aguayo

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE
ZONAS TRÓPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

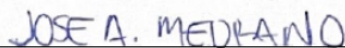
MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

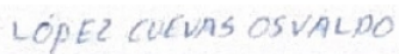
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Kimberly Paola Hernández Aguayo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz
Director de tesis



Dr. José Andrés Medrano Félix
Integrante del comité de tesis



Dr. Osvaldo López Cuevas
Integrante del comité de tesis



Dra. Nohelia Castro del Campo
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Perfil Metagenómico de Comunidades Bacterianas en Agua Superficial del Valle de Culiacán” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Kimberly Paola Hernández Aguayo, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong Genzález
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional para Ciencia y Tecnología, por otorgarme el apoyo económico para mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación Culiacán, por abrirme las puertas para realizar mis estudios de maestría.

Al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria, por brindarme los recursos y espacios necesarios para el desarrollo de tesis durante mis estudios de maestría.

Un especial agradecimiento a mi director de tesis, Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz, por su apoyo, por su confianza y por brindarme todos los recursos necesarios para realizar esta tesis, muchas gracias. Porque además de ser un gran investigador es una gran persona.

A mis asesores de tesis, Dr. Andrés Medrano Félix, Dr. Osvaldo López Cuevas y Nohelia Castro del Campo, por su tiempo, por sus enseñanzas y gran apoyo. ¡Muchas gracias!

A Roberto, por sus enseñanzas, consejos y tiempo. ¡Muchas gracias!

A Célida y a Miriam por su gran ayuda durante cualquier trámite y proceso en el laboratorio. Gracias por compartir su experiencia.

A mis compañeros, Hilary, Cecilia, Edgar y Ramón, por los buenos momentos durante el posgrado.

A mis padres, Saúl y Patricia, quienes me han dado el apoyo incondicional a lo largo de mi vida. ¡Muchas gracias, los quiero!

A mis hermanas, Siboney, Jazmín y Adriana, a mis cuñados y mis sobrinos por tan buenos momentos. ¡Muchas gracias!

A Omar, por su amor y gran apoyo, te amo. ¡Gracias infinitas!

DEDICATORIA

Para mi abuelo Héctor. Para mi familia, mis padres, hermanas, sobrinos y Omar, que durante todo este tiempo me brindaron su compañía y su apoyo. ¡Los amo mucho!

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Importancia del Agua Dulce.....	14
2.2. Calidad de Aguas Superficiales.....	16
2.3. Contaminación Biológica: Introducción de Bacterias Patógenas.....	18
2.3.1. Identificación de Bacterias Patógenas en Agua.....	21
2.4. Principales Bacterias en Ríos	22
2.4.1. <i>Proteobacteria</i>	23
2.4.2. <i>Actinobacteria</i>	26
2.4.3. <i>Bacteroidetes</i>	25
2.4.4. <i>Cyanobacteria</i>	25
2.5. Taxones Bacterianos Potencialmente Patógenos en Agua Superficial.....	27
2.6. Metagenómica como una Nueva Área de la Microbiología	29
2.7. Análisis Metagenómicos.....	30
2.8. Plataformas Utilizadas para Secuenciación del Gen 16S	32
2.9. Metagenómica en Aguas Superficiales	34
2.10. Calidad de Aguas Superficiales del Valle de Culiacán	37
3. HIPÓTESIS	40
4. OBJETIVOS	41
4.1. Objetivo General	41
4.2. Objetivos Específicos	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1. Área de Estudio	42
5.2. Colecta de Muestras	43
5.3. Extracción de Material Genético	44
5.4. Determinación de la Calidad del ADN.....	44
5.5. Amplificación y Secuenciación del Gen ARNr 16S	45
5.6. Análisis Bioinformáticos	47
5.6.1. Análisis de Calidad de Secuencias.....	47

CONTENIDO (continuación)

5.6.2. Asignación Taxonómica	48
5.6.3. Obtención de Tabla de OTUs, Exploración de Datos y Creación de Gráficas	48
5.6.4. Análisis Estructural de Comunidades: Diversidad Alfa y Beta.....	49
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
6.1. Análisis de la Estructura y Diversidad Bacteriana en agua superficial del Valle de Culiacán.....	50
6.1.1. Diversidad Alfa.....	50
6.1.2. Diversidad Beta.....	53
6.2. Diversidad de la Comunidad Bacteriana	55
6.2.1. Diversidad Bacteriana a Nivel Filo.....	55
6.2.2. Diversidad Bacteriana a Nivel Orden	58
6.2.3. Diversidad Bacteriana a Nivel Género	58
6.3. Géneros Potencialmente Patógenos en Agua Superficial del Valle de Culiacán	61
7. CONCLUSIONES.....	70
8. RECOMENDACIONES.....	71
9. REFERENCIAS	72
10. ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Porcentajes de distribución de agua dulce en la Tierra.....	14
2	Volumen concesionado de agua por sector consuntivo de 2001-2015.....	15
3	Sitios contaminados o fuertemente contaminados por CF en el Valle de Culiacán.....	20
4	Distribución de los principales filos bacterianos en agua superficial, en términos de abundancia relativa (%)......	24
5	Estrategia general de los enfoques metagenómicos.....	31
6	Representación de longitud y regiones del gen ARNr 16S con base a una comparación <i>In silico</i>	32
7	Arboles basados en los niveles de asignación taxonómica según la región del gen 16S utilizada.....	34
8	Representación esquemática de la diversidad alfa, beta y gamma.....	36
9	Mapa de los sitios de muestreo en Valle de Culiacán.....	43
10	Descripción general del proceso de secuenciación de nanoporos.....	46
11	Diagrama de caja sobre la diversidad alfa calculada con base al índice de diversidad alfa Chao1.....	52
12	Análisis de coordenadas principales sobre diversidad beta con base al índice de Bray Curtis.....	54
13	Gráfico de barras sobre la composición de la comunidad bacteriana a nivel filo.....	56
14	Gráfico de barras sobre la composición de la comunidad bacteriana a nivel orden.....	59
15	Gráfico de barras sobre la composición de la comunidad bacteriana a nivel género.....	63
16	Mapa de calor sobre la abundancia relativa de OTUs asociados a patógenos para humanos, presentes en agua superficial del Valle de Culiacán.....	69

LISTA DE CUADROS

Cuadros		Página
1	Escala de clasificación de la calidad del agua superficial con base en Coliformes fecales.....	18
2	Sitios de toma de muestra para el monitoreo microbiológico y su ubicación geográfica.....	42
3	Componentes para amplificación por PCR del gen 16S.....	45
4	Valores de diversidad alfa con base en el índice de Shannon de cada sitio de muestreo.....	53

RESUMEN

Las bacterias representan un grupo microbiano abundante y esencial de los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, la diversidad bacteriana es muy variable y depende de factores ambientales, geográficos y fuentes de contaminación. Esta última, modifica y compromete la calidad de los cuerpos de agua superficial mediante la introducción de bacterias patógenas, con potenciales riesgos para la población. La regla de oro para verificar la ausencia de bacterias patógenas en agua de uso agrícola es mediante la medición de bacterias indicadoras. Sin embargo, su utilización es altamente cuestionada ya que no detecta directamente a las bacterias patógenas y tampoco permiten determinar la prevalencia de grupos bacterianos. Especialmente, identificar bacterias patógenas resulta importante ya que el agua puede actuar como vehículo de enfermedades diarreicas, las cuales son una de las diez principales causas de muerte a nivel mundial y segunda causa de muerte de niños menores de cinco años. Debido a la importancia que representan las fuentes de agua en el Valle de Culiacán, particularmente en el sector agrícola, se requiere profundizar en la identificación de los grupos bacterianos más prevalentes con técnicas robustas y confiables. Para contribuir con ello, el objetivo de la presente investigación fue determinar la composición de las comunidades bacterianas presentes en agua superficial, empleando análisis metagenómico (secuenciación y análisis del gen ARNr 16S) de 17 muestras pertenecientes a cinco sitios (río y canales de riego agrícola), asignadas taxonómicamente con la base de datos SILVA y el programa Centrifuge. Como resultado de todas las muestras, se obtuvieron 2.7 M de lecturas, asignadas a 2862 taxones, una diversidad máxima de 4.66 (río) y una mínima de 3.16 (canal) de acuerdo al índice de Shannon. Se identificó una comunidad bacteriana dominada por los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* en río y canales de riego agrícola. También se demostró la presencia de géneros que contribuyen a una buena salud del ecosistema, como *Dinghuibacter*, *Polynucleobacter*, *CL_500_29* y *Limnohabitans*. Adicionalmente, se identificaron 37 patógenos, entre los que destacan *Aeromonas*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Pseudomonas* y *Legionella*, y en menor proporción se recuperaron secuencias asignadas a *Salmonella* y *E. coli*. Los resultados obtenidos sugieren que se puede utilizar un enfoque metagenómico para detectar géneros de importancia ecológica, así como géneros potencialmente patógenos en agua superficial.

Palabras clave: Metagenómica, ARNr 16S, comunidades bacterianas, agua superficial.

ABSTRACT

Bacteria represent an abundant and essential microbial group in aquatic ecosystems. However, bacterial diversity is highly variable and depends on environmental and geographical factors and sources of contamination. The latter, modifies and compromises the quality of surface water bodies by introducing pathogenic bacteria, with potential risks for the population. The golden rule to verify the absence of pathogenic bacteria in agricultural water is by measuring indicator bacteria. However, its use is highly questioned since it does not directly detect pathogenic bacteria and does not allow the prevalence of bacterial groups to be determined. Especially, identifying pathogenic bacterial groups is essential since water can act as a vehicle for diarrheal diseases, one of the ten leading causes of death worldwide and the second cause of death of children under five years of age. Due to the importance of water sources in the Culiacan Valley, particularly in the agricultural sector, it is necessary to identify the most prevalent bacterial groups with robust and reliable techniques. To contribute to this, the objective of this research was to determine the composition of the bacterial communities present in surface water, using metagenomic analysis (sequencing and analysis of the 16S rRNA gene) of 17 samples belonging to five sites (river and agricultural irrigation canals), taxonomically assigned with the SILVA database and the Centrifuge program. As results, 2.7 M readings were obtained, assigned to 2,862 taxa, maximum diversity of 4.66 (river), and a minimum of 3.16 (canal) according to the Shannon index. A bacterial community dominated by *Aeromonas*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Pseudomonas* and *Legionella* phyla were identified in river and agricultural irrigation canals. The presence of genera contributing to good ecosystem health is also demonstrated, such as *Dinghuibacter*, *Polynucleobacter*, CL_500_29, and *Limnohabitans*. Additionally, 37 pathogens were identified, among which *Aeromonas*, *Pseudomonas*, and *Legionella* stand out; and to a lesser extent, sequences assigned to *Salmonella* and *E. coli* were recovered. The obtained results suggest that a metagenomic approach can be used to detect ecologically important genera and potentially pathogenic genera in surface water.

Key words: Metagenomics, ARNr16S, bacterial communities, surface water.

1. INTRODUCCIÓN

El agua dulce es un bien transversal empleado en todas las actividades sociales, económicas y ambientales. Sin embargo, el deterioro de su calidad ha llevado a catalogar el agua dulce como en estado de crisis global, generando con ello un evidente desequilibrio de las comunidades microbianas en los ecosistemas acuáticos (García-Moreno *et al.*, 2014; ONU, 2014).

En agua superficiales, las comunidades bacterianas están conformadas principalmente por *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Cyanobacteria* (Zwart *et al.*, 2002), filos relacionados con tareas esenciales en el ciclo del carbono, nitrógeno y producción de oxígeno; de tal manera que son componentes importante del ecosistema (Falkowski *et al.*, 2008; Clokie *et al.*, 2011). No obstante, también puede existir presencia de grupos bacterianos patógenos, que pueden resultar en enfermedades transmitidas por el agua (OMS, 2019).

La introducción de bacterias patógenas en los cuerpos de agua, se debe mayormente a fuentes de contaminación de origen fecal (Ej. agua residual y heces de animales) (Bravo *et al.*, 2013). Por lo tanto, los estándares de vigilancia microbiológica se han basado en la detección y cuantificación de microorganismos cuyo origen es la materia fecal, como lo es el monitoreo de bacterias Coliformes fecales (CF), *E. coli* y *Enterococcus* (USEPA, 1996; WHO, 2004). Este grupo de bacterias se reconocen como indicadoras de la posible existencia de microorganismos patógenos (Larrea-Murrell *et al.*, 2013). Sin embargo, su utilización se ha puesto en duda, ya que en algunos casos estas bacterias pueden persistir y reproducirse fuera de su hospedador. También se ha comprobado una correlación negativa entre la presencia de Coliformes y ciertas bacterias patógenas; además, estos ensayos no permiten identificar grupos bacterianos patógenos (Devane *et al.*, 2020; Rochelle-Newall *et al.*, 2015; St-Pierre *et al.*, 2009).

Estas limitaciones, aunado a los avances en tecnologías de secuenciación, han propiciado el desarrollo de análisis basados en el monitoreo de comunidades microbianas, las cuales permiten ofrecer una imagen más amplia del “estado de salud” de los ecosistemas acuáticos en comparación con el estudio de un solo microorganismo o grupo microbiano (Mathai *et al.*, 2020).

Actualmente, una alternativa para describir estas comunidades es el uso de técnicas basadas en análisis metagenómicos, por ejemplo, un enfoque metagenómico dirigido al gen ARNr 16S (ARN ribosomal 16S) para el estudio de bacterias (Rodicio y Mendoza, 2004). De tal manera que en ríos

ha sido posible clasificar taxones propios del medio y taxones introducidos, pero más importante, los taxones que contienen bacterias causantes de enfermedades transmitidas por el agua (Naphtali *et al.*, 2019; Ibekwe *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2018). A esto se le suma la capacidad de determinar la presencia de bacterias cuya identificación por métodos dependientes de cultivos resulta imposible, difícil o requiere de mucho tiempo (Ghosh *et al.*, 2019). Sin embargo, hay que considerar que esta metodología está limitada a determinar presencia-ausencia de las poblaciones bacterianas; para establecer su concentración y funciones se requiere de metodologías complementarias. Además, se debe tomar en cuenta que estas comunidades pueden presentar variaciones espaciotemporales. En este sentido, la generación de bibliotecas metagenómicas por áreas específicas de estudio es altamente recomendable (Unno *et al.*, 2018).

El Valle de Culiacán en el estado de Sinaloa, es una zona agrícola sobresaliente a nivel nacional e internacional (CONAGUA, 2018; PRONACCH, 2013). Donde el 89 % del agua destinada al riego agrícola proviene de ríos y canales de la región (SEMARNAT, 2015). Sin embargo, se tiene conocimiento que los recursos hidrológicos de esta zona están constantemente expuestos a descargas de aguas residuales municipales, industriales y de retorno agrícola (SEMARNAT, 2012), las cuales comprometen la calidad microbiológica del agua. Por ejemplo, se ha reportado prevalencia de serotipos de *Salmonella* en agua de río, así como prevalencia de *E. coli* en canales de riego y drenaje agrícola (Castañeda-Ruelas y Jiménez-Edeza, 2018; Ahumada-Santos *et al.*, 2014; López-Cuevas *et al.*, 2009). Adicionalmente, se han catalogado distintos sitios de agua superficial del Valle de Culiacán como contaminados por CF (CONAGUA, 2018).

Lo anterior, podría ocasionar cambios en la composición de las comunidades microbianas que habitan estos cuerpos hídricos (Breton-Deval, *et al.*, 2019; García-Moreno *et al.*, 2014; Ibekwe *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2018; Sigee, 2005). Sin embargo, el estudio bacteriológico de estos cuerpos se ha centrado en ciertas bacterias o indicadores bacterianos, a través de técnicas dependientes de cultivo; por lo que, a la fecha no se han realizado estudios sobre la estructura y composición global de comunidades bacterianas en estos cuerpos de agua. Por lo tanto, el presente trabajo de investigación se centró en determinar la diversidad bacteriana e identificar la presencia de grupos bacterianos potencialmente patógenos en agua de ríos y canales de riego del Valle de Culiacán, mediante la amplificación por PCR, secuenciación y análisis del gen ARNr 16S. Esta investigación supone ser un punto de partida para entender cómo se encuentran conformadas las comunidades bacterianas en la zona de estudio.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia del Agua Dulce

El agua dulce representa el 2.5 % del total de agua disponible en la Tierra, proporción que se haya dispersa en solo el 0.8 % de la superficie del planeta. Su distribución se encuentra mayormente en glaciares (68.7 %), seguido de acuíferos subterráneos (30 %), y finalmente un mínimo porcentaje (0.4 %) se encuentra almacenado en aguas superficiales (lagos, ríos, arroyos, canales) (Figura 1) (CONAGUA, 2018; García-Moreno *et al.*, 2014).

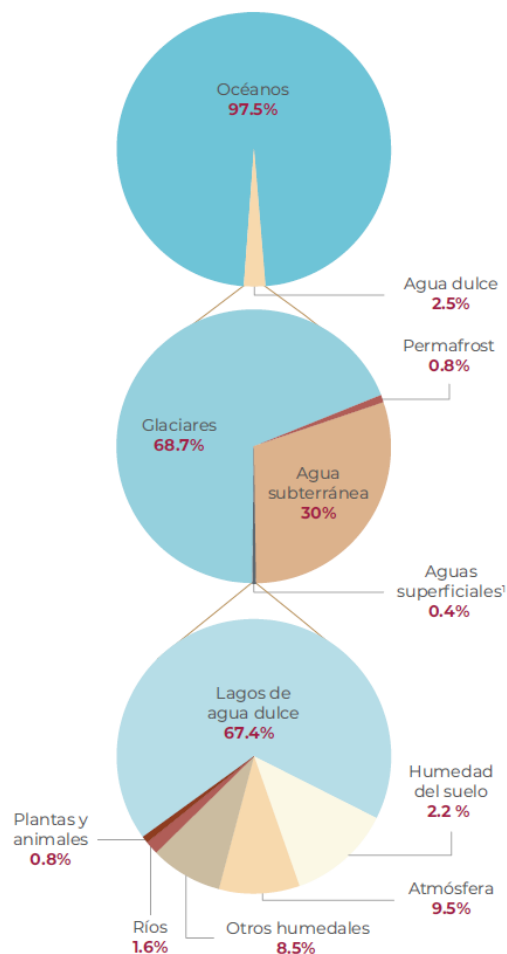


Figura 1. Porcentajes de distribución de agua dulce en la Tierra (SEMARNAT, 2020b).

El agua dulce superficial representa un recurso indispensable para la vida, no solo para beber sino también para el desarrollo de otras actividades esenciales, tales como la agricultura e industria (ONU, 2021). Sin embargo, cuidar y mantener éste recurso representa un desafío, debido al uso indiscriminado del agua, una creciente población y el incremento de las actividades antropogénicas, lo que ha conducido a que los ecosistemas de agua dulce sean más susceptibles al deterioro en su calidad y cantidad (OMS, 2019; García-Moreno *et al.*, 2014).

En México, gran parte del agua se destina a usos consuntivos (SEMARNAT, 2005). Según los registros de la SEMARNAT del 2001 a 2015 (Figura 2), la mayor proporción de agua se concesiona al sector agrícola, seguido de abastecimiento público y un menor volumen al sector industrial (76.3 %, 14.6 % y 4.3 %, respectivamente) (SEMARNAT, 2015).

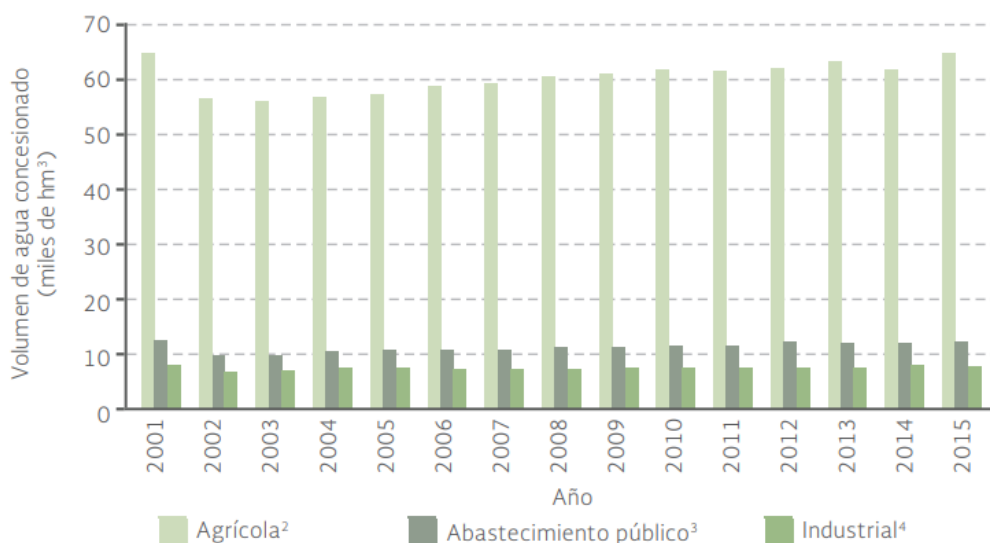


Figura 2. Volumen concesionado de agua por sector consuntivo de 2001-2015 (SEMARNAT, 2015).

Según el Registro Público de Derechos de Agua (REPDA) en el 2020, a nivel nacional, el 60.9 % del abastecimiento de estos sectores proviene de cuerpos de agua superficial y 39.1 % de acuíferos subterráneos (SEMARNAT, 2020a). No obstante, a lo largo del país existen diferencias marcadas con respecto a la proporción del tipo de agua utilizada. En la zona sur del país el 97 % del agua para usos consuntivos proviene de acuíferos subterráneos; en cambio, en la zona norte del país, gran parte proviene de fuentes superficiales como los ríos. Por ejemplo, en la región Pacífico Norte

III (correspondiente a Sinaloa), el 90 % del agua para usos consuntivos proviene exclusivamente de ríos, además, esta región hidrológica es la que más agua destina a la agricultura (SEMARNAT, 2005; CONAGUA, 2018; SEMARNAT, 2020a).

Debido a que los ríos son una de las principales fuentes de abastecimiento del país, una de las prioridades de la “Agenda del Agua en México” es contar con ríos limpios. De tal manera que se han establecido estrategias para cumplir en el año 2030. Por ejemplo: lograr que el 100 % de aguas residuales municipales sean tratadas para evitar que sean vertidas sin tratamiento a los sistemas de agua superficial. También se ha propuesto lograr que todos los ríos y lagos del país estén libres de contaminantes orgánicos e inorgánicos y finalmente, controlar las fuentes de contaminación difusa que se depositan en los sistemas de agua superficial (Bravo *et al.*, 2013; CONAGUA, 2012). De manera global, las estrategias que se buscan implementar contribuyen a mejorar y mantener una calidad de los recursos hidrológicos más importantes del país.

2.2. Calidad de Aguas Superficiales

La calidad del agua se ha convertido en una de las principales preocupaciones para las autoridades públicas y reguladoras de todo el mundo, ya que su gestión contribuye directamente con el desarrollo de las actividades económicas de un país. Además, el manejo adecuado de los sistemas de agua superficial favorece el mantenimiento de una amplia variedad de vida silvestre, que vale la pena conservar (Ramírez-Castillo *et al.*, 2015; WHO, 2016; OMS, 2019).

La calidad del agua es un parámetro que se establece a través de múltiples mediciones, mismas que resultan fundamentales para lograr diferenciar el estado de una corriente. De tal manera que para catalogar, dar tratamiento y uso adecuado del agua, es necesario tomar en cuenta diferentes estándares como la temperatura, conductividad, turbidez, pH, oxígeno disuelto, nutrientes suspendidos, sólidos suspendidos, metales, compuestos orgánicos y bacterias indicadoras (SEMARNAT, 2015; WHO, 2016). El uso de estos parámetros fisicoquímicos y biológicos se ha basado en que los ecosistemas se pueden ver afectados por el vertido de elementos contaminantes; que si bien, los ecosistemas de agua dulce llevan a cabo un proceso de autodepuración natural de contaminantes químicos, físicos y biológicos y permiten mantener un balance entre todos estos

elementos (Molero *et al.*, 2001; SEMARNAT, 2015), es una situación que sólo aplica mientras la cantidad de contaminantes no sobrepase la capacidad de autodepuración de una cuenca, por el contrario, conllevaría a daños irreversibles en el ecosistema (Efron *et al.*, 2014). Por consiguiente, además del uso adecuado del agua y la aplicación de programas preventivos de contaminación del agua, el monitoreo microbiológico de las cuencas es altamente importante para demostrar si los planes o estrategias implementadas están funcionando. De esta manera, la determinación de los parámetros mencionados permite identificar y aplicar de manera eficiente las acciones correctivas o preventivas en un sistema de agua superficial.

En México, los planes de monitoreo de la calidad del agua son implementados y ejecutados por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) a través de la Red Nacional de Monitoreo, que básicamente es una supervisión periódica de la calidad del agua de 5,027 sitios a lo largo del país (2,785 sitios de agua superficial) (SEMARNAT, 2020b).

Para tal monitoreo se consideran 8 indicadores principales; la demanda bioquímica de oxígeno a cinco días (DBO₅), demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos totales (SST), Coliformes fecales (CF), *Escherichia coli* (E_COLI), *Enterococcus* (ENTEROC), porcentaje de saturación de oxígeno (OD %) y toxicidad (TOX). Cada uno con niveles máximos permisibles, que llevan a catalogar el estado de calidad de un sistema de agua, que va desde excelente hasta fuertemente contaminado (SEMARNAT, 2018).

De los ocho parámetros principales, solo cuatro de ellos se miden bimestralmente en todos los sitios del país: DBO₅, DQO, SST y CF. Con referencia a la DBO₅, este es un parámetro que indica la presencia de materia orgánica biodegradable en una muestra de agua, ocasionada por descarga de aguas residuales principalmente de origen municipal, mientras que la DQO se toma en cuenta como un indicador de descarga de aguas residuales generales (municipales y no municipales) (Ruiz *et al.*, 2010; Muñoz-Nava *et al.*, 2011). Por otro lado, los SST indican descargas residuales agrícolas y erosión (Ochoa, 2021). Finalmente, CF indica presencia de contaminación microbiológica de origen fecal, ocasionado por descargas residuales municipales (CONAGUA, 2018; SEMARNAT, 2019). Este último, se considera como un parámetro indicador proporcional (correlacional) a la cantidad de microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por el agua; por lo tanto, una cantidad baja de Coliformes fecales se podría considerar como un riesgo sanitario bajo (Martínez-Romero *et al.*, 2009).

De lo explicado anteriormente, se ha propuesto una escala que permite catalogar de manera general

el estado biológico de una corriente (Cuadro 1). Un río con una calidad excelente, o de buena calidad, se encuentra en un rango de 100-200 NMP/100 mL CF y representa una escala satisfactoria para la vida acuática y para uso recreativo. Una cuenca catalogada con una calidad aceptable tiene un rango de 200-1,000 NMP/100 mL CF, y es suficiente como fuente de abastecimiento de agua potable y riego agrícola. Mientras que un rango mayor a 1,000 NMP/100 mL CF, representa una cuenca considerada contaminada o fuertemente contaminada bacteriológicamente (CONAGUA, 2015). Respecto a los límites de CF para el uso en riego agrícola, se considera que durante un periodo mensual se debe cumplir un límite máximo permisible de 1,000 y 2,000 NMP/100 mL CF como límite máximo diario según la NOM-001-SEMARNAT-1996 (CONAGUA, 2002).

Cuadro 1. Escala de clasificación de la calidad del agua superficial con base en Coliformes fecales. Cuadro adaptado de CONAGUA (2015).

Calidad (NPM/100 mL)	Coliformes fecales
Excelente	$CF \leq 100$
Bueno	$100 < CF \leq 200$
Aceptable	$200 < CF \leq 1,000$
Contaminado	$1,000 < CF \leq 10,000$
Fuertemente contaminado	$CF > 10,000$

Establecer la calidad biológica de una corriente mediante el conteo de bacterias Coliformes es un estándar ampliamente aceptado; sin embargo, una gran desventaja es que no permite identificar de forma directa a ningún patógeno, por lo que su utilización se ha puesto en duda en repetidas ocasiones (Ramírez-Castillo *et al.*, 2015; SEMARNAT, 2018; Jang *et al.*, 2017).

2.3. Contaminación Biológica: Introducción de Bacterias Patógenas

La introducción de microorganismos patógenos en los ríos es la principal causa de alteración en su calidad (Pandey *et al.*, 2014). Los principales contaminantes biológicos del agua son: bacterias, virus, hongos, protozoarios y parásitos; causantes de enfermedades como cólera, disentería,

hepatitis, fiebre tifoidea y poliomielitis (Barrera-Bernal, 2020; OMS, 2019). Estos microorganismos pueden llegar a las corrientes por una gestión inadecuada de las fuentes de contaminación (Martínez-Romero *et al.*, 2009).

Aunque es difícil identificar puntos de origen y las vías por las cuales estos patógenos ingresan a las corrientes, se conoce de fuentes potenciales como difusas y puntuales. Las difusas son aportes laterales de pastizales, contaminación por fuentes no puntuales de tierras agrícolas, depósito directo de materia fecal de ganado y vida silvestre; mientras que las puntuales son descargas de aguas residuales de origen municipal y efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Chin, 2010; Krauss y Griebler, 2016; Okoh *et al.*, 2007). Dichas fuentes constituyen una gran problemática para los ecosistemas, ya que algunas de estas fuentes pueden ser persistentes en los ríos.

Se estima en que algunos países en desarrollo, del 80-90 % de las aguas residuales municipales se descargan sin tratamiento a los cuerpos de agua (Ahumada-Santos *et al.*, 2014). A nivel estatal, en Sinaloa se cuenta con una gran capacidad para el tratamiento de aguas residuales (municipal y no municipal), sin embargo, todavía algunos sitios de agua superficial de la región se siguen catalogando como contaminados o fuertemente contaminados de acuerdo a niveles de Coliformes fecales (Figura 3) (CONAGUA, 2018; CONAGUA, 2021). Por otro lado, las fuentes de contaminación por ganado y animales silvestres también aportan a la incidencia de patógenos en el agua, y a diferencia de las fuentes puntuales, estas fuentes de contaminación son altamente difíciles de gestionar (Bravo *et al.*, 2013; Devane *et al.*, 2020).

Actualmente, para llevar un control sobre la contaminación biológica ocasionada por fuentes puntuales y difusas se utiliza de manera rutinaria el monitoreo de bacterias Coliformes y *E. coli*, como los únicos parámetros para describir el potencial patogénico de una corriente, a pesar de que es un hecho que no son indicadores universales. Por ejemplo, un estudio canadiense reveló una baja correlación entre la presencia de Coliformes y *Campylobacter* spp, sugiriendo que el monitoreo de microorganismos indicadores no es suficiente para evaluar la presencia de *Campylobacter* (St-Pierre *et al.*, 2009). De la misma manera se demostró una baja correlación entre CF y *Vibrio*, así como tampoco se encontró una correlación entre patrones de detección patógenos a través del gen 16S y la presencia de Coliformes fecales. Asimismo se ha demostrado no haber correlación entre coliformes y la abundancia relativa de *Acinetobacter* y *Arcobacter* en estuarios marinos (Ghaju Shrestha *et al.*, 2017; Saingam *et al.*, 2020). Por otra parte, hay evidencia que demuestra la capacidad de adaptación de las bacterias Coliformes a climas tropicales, logrando

persistir y replicarse fuera de su hospedador (Jang *et al.*, 2017). Sumado a que la naturaleza de sobrevivencia de cada patógeno en el ambiente es diferente, por lo tanto es difícil que todas las bacterias patógenas se asemejen con la sobrevivencia de Coliformes, por ende su medición es insuficiente para evaluar la contaminación por bacterias patógenas.

Esas desventajas han puesto en duda su utilización para estimar la calidad del agua, sumado a la incapacidad de indicar de dónde proviene la contaminación o de indicar cuáles microorganismos patógenos se encuentran en la corriente (Ahmed *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha propuesto implementar el monitoreo de *Enterococcus* como un indicador más eficiente en climas tropicales, puesto que se ha comprobado una mayor sobrevivencia en condiciones de aguas tropicales en comparación con Coliformes; sin embargo, actualmente solo se utiliza en el monitoreo de playas (Vega-Rodríguez, 2007; Byappanahalli *et al.*, 2012; CONAGUA, 2018).

Está claro que no hay un grupo de bacterias que pueda ser utilizado como un indicador confiable de todos los patógenos presentes en agua. Por lo que la implementación de nuevos métodos que permitan identificar microorganismos patógenos en agua es un área en constante desarrollo (Wolf-Rainer, 2011; Mathai *et al.*, 2020).

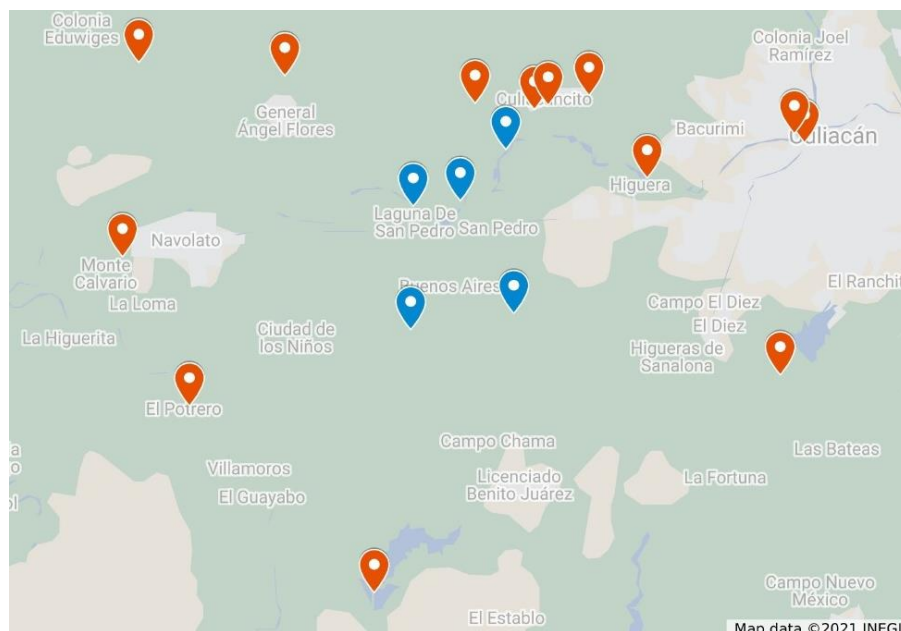


Figura 3. Sitios contaminados o fuertemente contaminados por CF en el Valle de Culiacán. Los sitios en color rojo representan sistemas de agua superficial (río y canales), catalogados como contaminados ($1,000 < CF < 10,000$ NMP/100 mL) o fuertemente contaminados ($> 10,000$ CF NMP/100 mL) de acuerdo con la red nacional de monitoreo la CONAGUA (2021). Los sitios en color azul representan las ubicaciones de muestreo de esta investigación.

2.3.1. Identificación de Bacterias Patógenas en Agua

El desarrollo de técnicas de identificación microbiana se ha centrado en resolver dos grandes limitaciones prescindiendo del uso de bacterias indicadoras; la identificación directa de bacterias patógenas y el rastreo del origen de contaminación, lo que ha resultado en el constante desarrollo de diversas áreas de la microbiología ambiental y la biología molecular (Mathai *et al.*, 2020).

Sobre la identificación directa de patógenos, el monitoreo de todos los patógenos en agua resulta una idea difícil. Las aproximaciones más cercanas a ello son aquellas técnicas de laboratorio que involucran el uso de microarreglos fenotípicos, ya que ofrecen la detección simultánea de microorganismos en cualquier tipo de muestra ambiental; sin embargo, se ha descrito que requiere de mejoras en la sensibilidad y límites de detección (Straub *et al.*, 2005; Dhar y Lee, 2018).

Por otro lado, la identificación directa por medios de cultivo selectivos es una estrategia clásica, sensible y específica; por ejemplo, para identificar *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter* spp (Sagova-Mareckova *et al.*, 2021). Sin embargo, algunos patógenos pueden ser difíciles de cultivar, lo que resultaría en un gran esfuerzo técnico para identificarlos de forma paralela (Field y Samadpour, 2007).

En ese sentido, se han implementado técnicas (PCR) para la detección directa de patógenos en muestras ambientales, incluso hay disponibilidad de kits comerciales para la detección de los patógenos de mayor relevancia (ThermoFisher, 2021); sin embargo, requieren de enriquecimiento previo, y además centrar la detección a patógenos comunes también podría ser una desventaja.

Por otro lado, algunas estrategias de monitoreo se han basado en aislamiento de cepas específicas de *E. coli*, *Enterococcus* y *Salmonella* en heces de animales, para después compararlas con los aislados de agua (Ahmed, 2007), de tal manera que se puede comprobar si hay similitud entre ambos aislados. Para ello se han utilizado métodos de comparación como: perfiles de resistencia antibióticos, longitud de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP's, siglas en inglés) y electroforesis de campos pulsados (PFGE, siglas en inglés) (Bernhard y Field, 2000; Furukawa y Suzuki, 2013; Scott *et al.*, 2002). Sin embargo, son metodologías dependientes de bibliotecas genómicas y de cultivo en laboratorio.

Por otra parte, se han desarrollado métodos independientes de cultivo y de bibliotecas, como qPCR dirigida a cepas específicas del género *Bacteroides* para identificar contaminación ocasionada por

heces de humanos o animales en cuerpos de agua (Unno *et al.*, 2018). Pero estos métodos se han caracterizado por tener problemas con la sensibilidad y especificidad entre cepas de distintos animales, además sólo se centran en indicar origen de contaminación y no en indicar grupos patógenos (Boehm *et al.*, 2013). Estas limitantes, junto con avances en tecnologías de secuenciación, han motivado el desarrollo de monitoreos que involucren comunidades completas (Tan *et al.*, 2015; Ghaju Shrestha *et al.*, 2017).

Recientemente se sabe que el estudio de comunidades microbianas de agua y de fuentes de contaminación, ofrece información para conocer su composición, presencia-ausencia de géneros patógenos y para establecer orígenes de contaminación (Jin *et al.*, 2018; Reza *et al.*, 2018). Por ejemplo, mediante generación de bibliotecas de comunidades microbianas de fuentes de contaminación biológica (heces de animales silvestres, comunidades de descargas de aguas residuales y efluentes), es posible identificar grupos de taxones específicos por cada fuente contaminante, lo cual puede utilizarse para estimar la probabilidad de que un taxón encontrado en agua pertenezca a cierta fuente contaminante (Knights *et al.*, 2011).

Por lo tanto, el estudio de comunidades microbianas podría considerarse como una herramienta prometedora para rastrear orígenes de contaminación, que a la vez permite identificar la presencia de microorganismos patógenos (Ahmed *et al.*, 2017; O'Dea *et al.*, 2019). Sin embargo, nuevamente, son estrategias dependientes de bibliotecas, donde se requiere conocimiento de las comunidades de la fuente de agua de interés así como de las posibles fuentes contaminantes, y además, se debe considerar llevar a cabo un estudio a nivel regional para tomar en cuenta variación temporal de las comunidades presentes en agua (Knights *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2017; Unno *et al.*, 2018).

2.4. Principales Bacterias en Ríos

Las comunidades microbianas de un río pueden ser muy ricas y diversas, se pueden encontrar bacterias, arqueas, hongos y protozoarios, que en conjunto con los virus forman la microbiota acuática y ayudan a mantener la cadena trófica de todo el ecosistema (Balasubramanian, 2016; Pepper *et al.*, 2013).

En ecosistemas de agua dulce, estos microorganismos se pueden hallar conformando biopelículas o asentados en sedimentos, o pueden encontrarse de forma planctónica, suspendidos en la columna de agua, incluso pueden pasar de estar adheridos a suspendidos, y viceversa (Sigeo, 2005). De éstos, los microorganismos planctónicos dominan los ecosistemas acuáticos en términos de abundancia y biomasa, además desempeñan un papel central en los ciclos biogeoquímicos que ocurren en el agua (Zinger *et al.*, 2012). En cambio, los microorganismos que se conforman en biopelículas o se encuentran en sedimentos se caracterizan por ser más diversos (Rickard *et al.*, 2003; Flemming y Wuertz, 2019). En ambos casos, las bacterias son consideradas como un componente principal de estos ecosistemas, debido a que se encargan de procesos esenciales como descomposición de materia orgánica, asimilación de compuestos inorgánicos y actúan como fuente de alimento para otros organismos (Sigeo, 2005). En específico, participan en procesos relacionados con reducción de nitrato, degradación de fosfato, reducción de sulfato y metabolismo de lípidos (Falkowski *et al.*, 2008; Llíros *et al.*, 2014; Fenchel *et al.*, 2012).

Las comunidades bacterianas encargadas de estos procesos en agua superficial son de composición diversa, algunos taxones tienen origen terrestre o de sedimentos, sin embargo, su composición nativa se encuentra bien establecida (Barberán y Casamayor, 2010; Tee *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2012). Por ejemplo, a nivel filo, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* y *Actinobacteria* (~42 %, ~18 %, ~10% y ~2 %, respectivamente), se consideran como los más abundantes, ya que en su conjunto contribuyen a más del 70 % de la abundancia total, de tal forma que se han considerado como los linajes ubicuos de agua dulce (Figura 4) (Zwart *et al.*, 2002; Ibekwe *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2021).

2.4.1. *Proteobacteria*

Proteobacteria es un filo compuesto por nueve clases reconocidas: *Acidithiobacillia*, *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Hydrogenophilalia*, *Oligoflexia* y *Zetaproteobacteria* (NCBI, 2021a; Newton *et al.*, 2011; Leff, 2019). Es el filo bacteriano más amplio y diverso de todos, su nombre proviene del griego *proteus*, que significa “diferentes formas”, con referencia en la diversidad de

morfologías y fisiologías de las bacterias que lo componen (LPSN, 2021).

El filo está compuesto mayormente por bacterias Gram negativas y microorganismos de vida libre, aunque también pueden formar asociaciones, vivir de manera intracelular o como parásitos intracelulares obligados. En cuanto a su tipo de respiración, existen desde aerobios y anaerobios estrictos, anaerobios facultativos, hasta microaerófilos (Seong *et al.*, 2019).

En cuanto a la participación de este filo en el ambiente, de manera general, las clases *Alfaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* albergan bacterias participantes en el ciclo del carbono, nitrógeno y azufre (Yannarell y Kent, 2009; Kersters *et al.*, 2006). En particular, miembros del género *Beggiatoa* y *Roseobacter* se relacionan con fijación de carbono (Bryant, 2019; Megonigal *et al.*, 2003); géneros pertenecientes a la familia *Chromatiaceae* son ampliamente relacionados con la oxidación de sulfuro y otros compuestos de azufre reducido, lo que representa una parte fundamental en el ciclo biogeoquímico del azufre (Márquez *et al.*, 2010; Rosenberg *et al.*, 2014); por otro lado, especies del género *Rizhobium* se asocian con la fijación de nitrógeno. De tal manera que se posiciona como un filo dominante y esencial en aguas superficiales, debido a las funciones que cumple en el ecosistema.

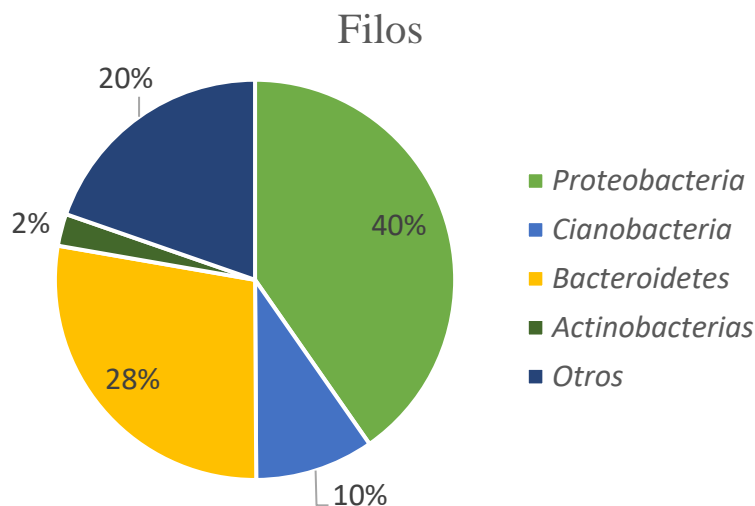


Figura 4. Distribución de los principales filos bacterianos en agua superficial, en términos de abundancia relativa (%).

2.4.2. Bacteroidetes

El filo *Bacteroidetes* comprende a seis clases: *Bacteroidia*, *Chitinophagia*, *Cytophagia*, *Flavobacteria*, *Saprospira* y *Sphingobacteria*, que representan más de 7,000 especies (NCBI, 2021b). Las bacterias de este filo son Gram negativas, algunas estrictamente aerobias y otras estrictamente anaerobias, pueden ser flageladas o inmóviles (Thomas *et al.*, 2011).

Se caracterizan por ser uno de los taxones predominantes de la microbiota animal, especialmente en el tracto gastrointestinal. La microbiota animal se compone principalmente de especies de la clase *Bacteroidia*, en cambio, los *Bacteroidetes* ambientales (suelo, océanos y agua dulce) pertenecen principalmente a las clases *Flavobacteria*, *Cytophagia* y *Sphingobacteria*; estas diferencias han sido utilizadas para generar estrategias de identificación de contaminación de origen fecal-animal (Naphtali *et al.*, 2019; Thomas *et al.*, 2011).

En cuanto a la participación de este filo en el ambiente, se consideran como fundamentales en la degradación de materia orgánica (proteínas y carbohidratos), para lo cual, hacen uso de diferentes mecanismos de degradación (Sigg, 2005). Por ejemplo, miembros pertenecientes a *Cytophagia* y *Flavobacteria* se consideran competentes en la degradación de biopolímeros (quitina, celulosa y pectina) (Kirchman, 2002) y miembros de la clase *Flavobacteria* se asocian con la regulación del flujo de carbono mediante degradación de macronutrientes en ecosistemas acuáticos (Ahmad *et al.*, 2021); de tal manera que sus funciones en el ecosistema se consideran esenciales.

2.4.3. Cyanobacteria

El filo *Cyanobacteria*, también conocido como “*Cianobacterias*”, algas verde-azuladas o bacterias verde-azuladas, son uno de los procariotas más diversos y más ampliamente distribuidos (Walter *et al.*, 2017).

Este filo bacteriano se compone de una clase reconocida: *Cyanophyceae* (Parte *et al.*, 2020). Se considera un filo ubicuo del agua dulce y es característico por contener bacterias capaces de llevar a cabo fotosíntesis oxigénica. Es uno de los filos con mayor información debido a que son más

susceptibles a cultivo en laboratorio. Por otro lado, también han sido de interés para autoridades públicas debido a que las *Cianobacterias* pueden aumentar considerablemente en aguas con nutrientes excesivos (eutrofizada), lo que afecta negativamente a la producción de agua potable, e incluso, pueden representar un alto riesgo, ya que algunas *Cianobacterias* son capaces de producir toxinas nocivas para humanos y animales (Pernthaler, 2013; CDC, 2021).

Las *Cianobacterias* han sido clasificadas en 4 grupos de acuerdo con su comportamiento en el agua: (1) las que son capaces de fijar N₂, (2) las que habitan en la capa de cambio de temperatura más abrupta (metalimnion), y que se conocen por ser capaces por regular flotabilidad, (3) las que habitan en la zona de un progresivo cambio de temperatura y disminución de oxígeno disuelto, que se caracterizan por su capacidad de supervivencia a esos cambios, y finalmente, (4) las formadoras de colonias o agregados (Dokulil y Teubner, 2000). Por ejemplo, el género *Trichodesmium* se asocia específicamente con la fijación de N₂ (Stal, 2007), y los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus* se consideran como los principales productores de oxígeno (Sánchez-Baracaldo *et al.*, 2021).

De manera general, las *Cianobacterias* cumplen funciones importantes en los ciclos biogeoquímicos, y debido a su capacidad de llevar a cabo fotosíntesis oxigénica se consideran fundamentales en la oxigenación de la atmosfera (Hofer, 2013).

2.4.4. Actinobacteria

Actinobacteria es un filo compuesto por seis clases oficiales: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* y *Thermoleophilia* (Stackebrandt *et al.*, 1997). El filo *Actinobacteria* es característico por su alto contenido de G+C (51 % a 71 %) y por la producción de una amplia variedad de compuestos (Ventura *et al.*, 2007). La mayoría de sus componentes son bacterias Gram positivas, aerobias y filamentosas (Ludwig *et al.*, 2015; Yannarell y Kent, 2009). Con referencia a su origen, se creía que este filo era autóctono del suelo, sin embargo, ahora se sabe que está ampliamente distribuido en la naturaleza, incluyendo sistemas de agua dulce. Desde entonces, el estudio de *Actinobacteria* en agua dulce se ha enfocado principalmente a conocer más sobre su diversidad y distribución, motivados por el interés de

descubrir nuevos compuestos bioactivos (Pernthaler, 2013; Zothanpuia *et al.*, 2018).

En cuanto a la participación de este filo en el ambiente, algunos miembros del género *Micromonospora* se les ha atribuido un papel importante en la degradación de materia orgánica (celulosa y quitina, principalmente), mediante la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas (Ranjani *et al.*, 2016). Por otro lado, bacterias del género *Streptomyces* son responsables de la producción de los metabolitos que producen el olor durante la lluvia. Bacterias de este filo no solo se desempeñan como fundamentales en el ecosistema, sino que es un filo ampliamente reconocido por contener bacterias productoras de metabolitos secundarios considerados como bioactivos (Ej. antibióticos) (Zothanpuia *et al.*, 2018).

2.5. Taxones Bacterianos Potencialmente Patógenos en Agua Superficial

La diversidad de comunidades bacterianas está íntimamente ligada con las actividades antropogénicas, así como con los cambios ambientales (Zhang *et al.*, 2019). Se ha comprobado que las comunidades bacterianas responden rápidamente a cambios de temperatura, salinidad y pH, así como a la cantidad de materia orgánica y descarga de aguas residuales (Urban *et al.*, 2021; Crump *et al.*, 2003; Abia *et al.*, 2018; Fortunato y Crump 2011; Lauber *et al.*, 2009).

Como se ha descrito, las principales bacterias presentes en agua superficial cumplen tareas importantes en el ecosistema (Gilbert y Neufeld, 2014), sin ellas, la materia orgánica se acumularía en los ecosistemas y eventualmente organismos más altos en la cadena trófica se quedarían sin fuente de alimentos (Schulz *et al.*, 2018). De tal manera que la alteración ocasionada por contaminantes contribuye directamente con la degradación de los ecosistemas, pérdida de biodiversidad y desarrollo de enfermedades (García-Moreno *et al.*, 2014; ONU, 2014). Esta última, puede llevar a que un ecosistema de agua dulce sea catalogado como gravemente afectado (UNESCO, 2019), de tal forma que la identificación oportuna de patógenos en agua representa una constante preocupación, ya que su aparición podría ocasionar brotes epidemiológicos, floración de algas nocivas, efectos adversos en la salud de plantas y animales acuáticos, así como impactos en la pesca y agricultura (Edge *et al.*, 2020).

La contaminación por patógenos bacterianos en aguas superficiales es una situación ampliamente

reportada, tanto en países desarrollados como en desarrollo. Por ejemplo, en el Río Santa Ana, en Estados Unidos, se reportó la presencia de géneros potencialmente patógenos como *Arcobacter*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Aeromonas* y *Legionella*, todos ellos pertenecientes al filo *Proteobacteria*. Por otro lado, el segundo filo con mayor número de patógenos asociados fue *Actinobacteria*, con la presencia de *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium*, y en tercer lugar, el filo *Bacteroidetes* con géneros asociados a contaminación fecal como *Bacteroides* (Ibekwe *et al.*, 2016).

De la misma manera, en Río Tama, en Japón, se ha reportado presencia de géneros patógenos, como: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y *Legionella*, pertenecientes al filo *Proteobacteria*, además de *Mycobacterium* del filo *Actinobacteria* y *Bacteroides* del filo *Bacteroidetes*; así como *Mycrocystis* y *Cylindrospermopsis*, géneros pertenecientes al filo *Cyanobacteria* que se asocian con la producción de toxinas (Reza *et al.*, 2018).

Asimismo, otros autores ha reportado la presencia de géneros potencialmente patógenos pertenecientes a los mismos filos bacterianos, entre ellos, el que más resalta por su mayor abundancia es *Arcobacter* en el Río Akaki en Etiopía (Acharya *et al.*, 2020), en el Río Cam en Cambridge (Urban *et al.*, 2021) y en el Río Apatlaco en México (Breton-Deval *et al.*, 2019). *Arcobacter* spp, se considera como un patógeno emergente causante de enfermedades gastrointestinales y transmitido por el agua, que generalmente no se identifica directamente por métodos convencionales (Kayman *et al.*, 2012).

De manera global, se puede asumir que gran parte de los patógenos que se han reportado en agua se encuentran albergados en los filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, que además se posicionan como los filos de mayor abundancia y diversidad de estos ecosistemas.

Conocer más acerca de la distribución de estos patógenos en los recursos de agua dulce puede contribuir a prevenir la prevalencia de enfermedades diarreicas, las cuales se posicionan como una de las diez principales causas de defunción a nivel mundial y segunda causa en niños menores de 5 años (OMS, 2017, OMS, 2020).

La prevención de contaminación de alimentos y agua por bacterias patógenas no es un tarea fácil, por ello se ha requerido de investigaciones profundas acerca de los patógenos en agua, desde su supervivencia y comportamiento, hasta cómo llegan y se transmiten en los diferentes cuerpos de agua (Magana-Arachchi y Wanigatunge, 2020).

Como se ha descrito, la presencia de estos microorganismos patógenos se monitorea rutinariamente

mediante bacterias indicadoras, sin embargo, existen nuevas herramientas que permiten obtener una imagen más amplia del ecosistema; por ejemplo, mediante el estudio de comunidades microbianas, pues de esta manera es posible detectar una mayor diversidad de bacterias. De tal forma que la conformación de estas comunidades bacterianas en agua puede ser un favorable indicador de la situación del ecosistema.

Aunque, a nivel filo, la abundancia relativa se encuentra ampliamente establecida y se mantiene constante. En los distintos subniveles (clase, orden, familia y género) se puede encontrar una gran variabilidad de taxones, sobre todo, en aquellos relacionados con enfermedades transmitidas por el agua; por lo que es necesario implementar el uso de estrategias que permitan estudiar la presencia y diversidad de estos taxones de una forma confiable.

2.6. Metagenómica como una Nueva Área de la Microbiología

Los estudios pioneros sobre la caracterización de comunidades microbianas en ecosistemas acuáticos se lograron a través de observación morfológica de microorganismos y métodos de cultivo; sin embargo, de esta manera fue notorio que sólo el 1 % de las bacterias eran cultivables en condiciones de laboratorio (Staley y Konopka, 1985). Más adelante, gracias a los avances en el área de biología molecular, se ha desarrollado mayor información sobre la diversidad microbiana en sistemas acuáticos, pues se comenzó a tomar en cuenta a aquellos microorganismos que no eran aptos para su cultivo o eran difíciles de aislar (Olsen *et al.*, 1986).

En el caso de bacterias, a principios de la década de los 80's según los estudios realizados por Woese (1987), se propuso al gen del ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) como apto para establecer relaciones evolutivas e identificación de bacterias. Desde entonces, hasta la actualidad, el análisis de secuencias de ADN de este gen ha servido de base para una amplia variedad de tecnologías y métodos para el estudio de comunidades bacterianas (Ghosh *et al.*, 2019).

A partir de este desarrollo tecnológico se ha generado una nueva área de la microbiología, la metagenómica, considerada como una herramienta que representa una aproximación totalmente nueva al estudio de las comunidades microbianas.

A grandes rasgos, un análisis metagenómico consiste en llevar a cabo protocolos de extracción de

material genético de muestras ambientales (ADN ambiental), seguido de la determinación del orden nucleotídico del ADN mediante el uso de plataformas de secuenciación, como las tecnologías de siguiente generación (NGS, siglas en inglés) o plataformas más actuales, como Oxford Nanopore y PacBio (tecnologías de 3ra generación) (Clark *et al.*, 2019). Posteriormente, se llevan a cabo análisis bioinformáticos con la ayuda de bases de datos. Finalmente, dependiendo del enfoque metagenómico utilizado, estos análisis podrán proveer información acerca de la estructura de las comunidades microbianas y de las funciones potenciales dentro de un ambiente específico (Song *et al.*, 2013).

2.7. Análisis Metagenómicos

Usualmente, los análisis metagenómicos pueden ser aplicados en dos tipos de enfoques: secuenciación de genomas completos o metagenómica dirigida (Figura 5). En secuenciación completa, se extrae el total de ADN de una muestra y es fragmentado para preparar bibliotecas genómicas, que después serán sometidas a secuenciación. Ese proceso permite determinar el total del contenido genómico y con el uso de herramientas bioinformáticas se puede determinar la diversidad de microorganismos y además permite predecir el potencial funcional de cada miembro de la comunidad microbiana. Por otro lado, el enfoque de metagenómica dirigida se usa para estudiar la diversidad de un gen particular o fragmentos de él (ej. ARN ribosomal), es útil para el estudio de la diversidad taxonómica en términos de abundancia relativa a un menor costo (Song *et al.*, 2013).

Con referencia en el enfoque de metagenómica dirigida, el ribosoma ha jugado un papel fundamental en el estudio de comunidades microbianas. A nivel celular, el ribosoma participa en el proceso de traducción, un proceso que se encuentra bien conservado en todos los organismos vivos. El ribosoma es un organelo que está conformado por proteínas y algunas moléculas de ARN ribosomal (ARNr). En el caso de los ribosomas procariotas, estos están compuestos por 65 % de ARNr y 35 % de proteínas ribosómicas. Su estructura simple está compuesta por dos subunidades conocidas como subunidad mayor (50S) que contiene dos moléculas de ARNr (5S y 23S), y la subunidad menor (30S) la cual contiene una sola molécula de ARNr (16S) (Bharagava *et al.*, 2019).

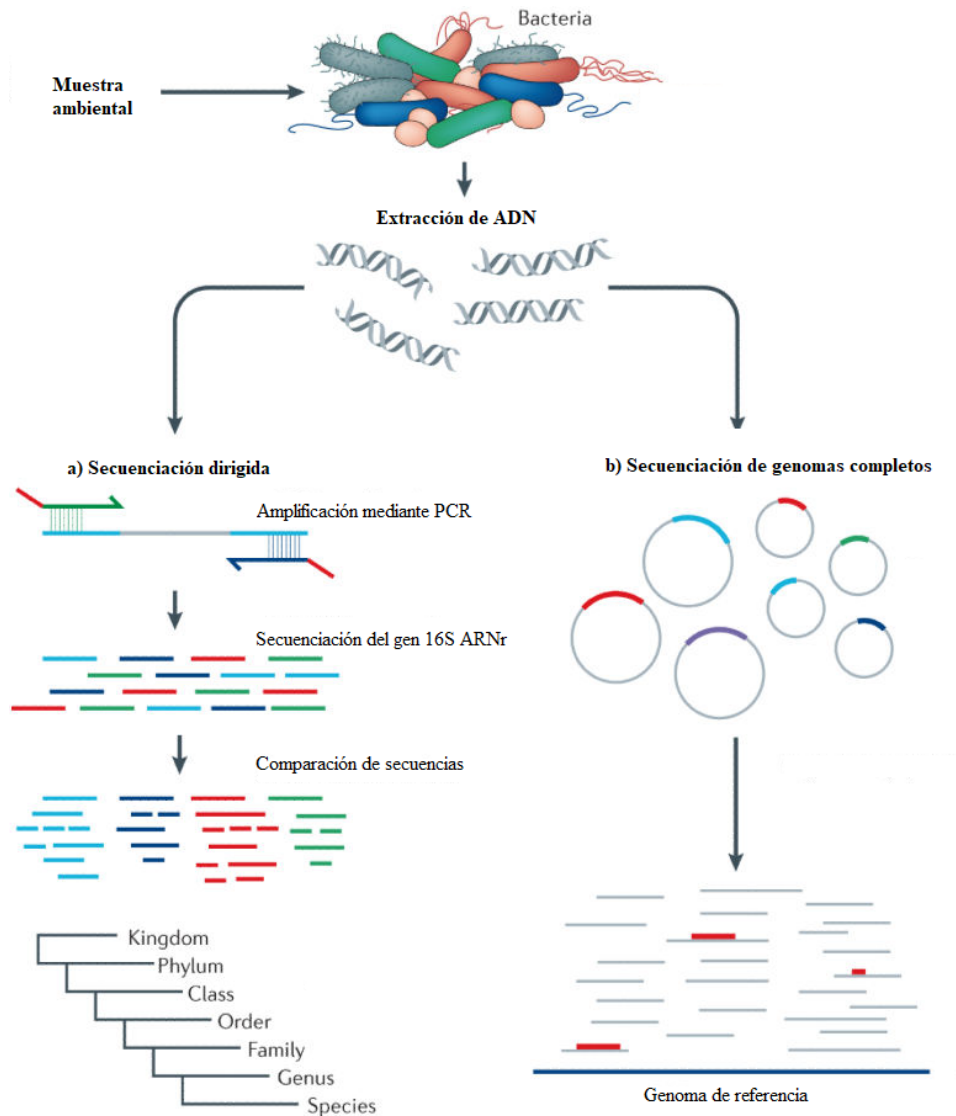


Figura 5. Estrategia general de los enfoques metagenómicos. a) Secuenciación dirigida a un gen marcador y b) secuenciación de genomas completos. Adaptado de Lasken y McLean (2014).

La subunidad menor del ribosoma procarionte ha sido ampliamente utilizada para el estudio de comunidades bacterianas debido a que está presente en todos los procariontes, además es poco susceptible a transferencia horizontal de genes y por lo tanto está altamente conservado de acuerdo a cada género, e incluso, a cada especie. Como lo muestra la Figura 6, el gen ARNr 16S cuenta con regiones conservadas (funcionalmente importantes) y 9 regiones hipervariables (V1-V9) de diferentes tamaños, que en total constituyen una longitud aproximada de 1,500 pb (Takayasu *et al.*, 2019).

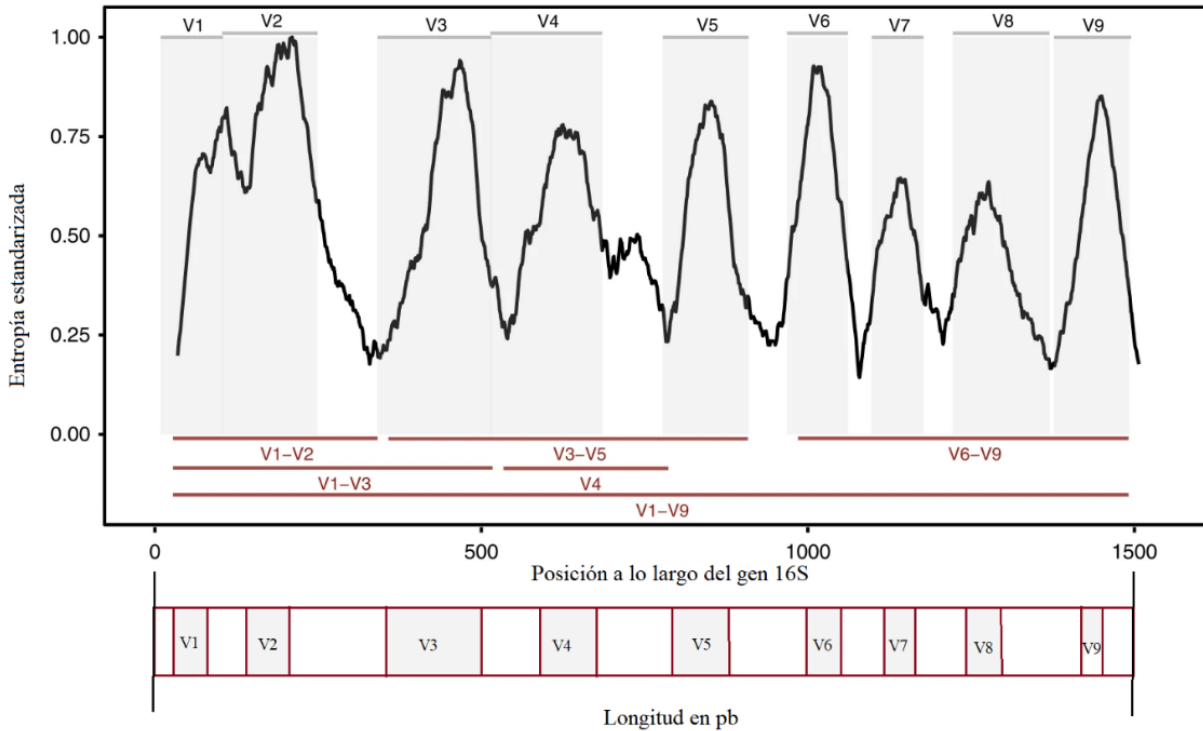


Figura 6. Representación de la longitud y regiones del gen ARNr 16S con base en una comparación *In silico*. La entropía indica la variación a lo largo del gen 16s con base en el alineamiento de cada especie conocida, representada en la base de datos Greengenes. Los paneles grises indican regiones variables (sitios comúnmente utilizados para unión de primers). Imagen modificada de Johnson y colaboradores (2019).

La secuenciación orientada a todas o algunas de estas regiones, y sus variaciones, son las que permiten clasificar o identificar la diversidad de especies bacterianas en una muestra sin la necesidad de aislar a cada microorganismo de la muestra. Esta técnica se ha considerado como el estándar de oro para el estudio de la diversidad de células procariotas (bacterias y arqueas) en diversos ambientes (Ramazzotti y Bacci, 2018).

2.8. Plataformas Utilizadas para Secuenciación del Gen 16S

El estudio de comunidades bacterianas a partir del gen 16S completo (~1,500 pb) fue posible a través de secuenciación Sanger, un método de secuenciación de primera generación capaz de generar fragmentos largos, pero demandante de tiempo y esfuerzo (Johnson *et al.*, 2019). Más

adelante, el estudio de comunidades bacterianas a través del gen 16S comenzó a ser liderado por la plataforma Illumina, tecnología de nueva generación (NGS) que produce lecturas cortas de 25-350 pb a un menor costo y esfuerzo, comparado con Sanger. De tal manera que se optó en la mayoría de los casos por elegir una región del gen 16S a secuenciar para describir la diversidad microbiana (Santos *et al.*, 2020).

Se ha descrito que elegir entre una u otra región del gen 16S, tendrá una repercusión directa sobre la diversidad bacteriana final. Por ejemplo, la identificación mediante la región V6 (~60 pb) falla en proveer una resolución taxonómica más allá de familia (Tan *et al.*, 2015). También se ha descrito que utilizar regiones más largas como V1-V2 y V2-V3, de aproximadamente 300 pb, V2-V3 resulta en una mejor representación de la diversidad bacteriana, según estudios realizados en comunidades de un lago, mientras que la región V1-V2 ha resultado en una mejor resolución en estudios relacionados con la microbiota de la piel (Bukin *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020).

Estas diferencias han sido expuestas de una manera clara en un análisis de comunidades bacteriana *In silico*, realizado por Johnson *et al.* (2019), donde demostraron que había diferencias marcadas con respecto al total de asignaciones taxonómicas según la región del gen 16S utilizada. Por ejemplo, la región V4 del gen representó la secuencia con menores taxones asignados (Figura 7), en cambio, la secuencia completa del gen representó una asignación completa a todos los taxones esperados.

Actualmente, con el advenimiento de las tecnologías de tercera generación, como la de PacBio y Oxford Nanopore Technologies (ONT), es posible generar secuencias que cubran en una sola lectura al gen 16S completo (1,500 pb), lo cual representa llevar a cabo una mejor discriminación taxonómica (Zhang *et al.*, 2018; Clark *et al.*, 2019). Esta última, es una plataforma de secuenciación basada en medir cambios en la conductividad eléctrica generada por el paso de una molécula (nucleótido) por un nanoporos (Lu *et al.*, 2016).

En el año 2014, la compañía ONT lanzó públicamente la plataforma MinION, un secuenciador portátil, del tamaño de una USB que tiene la facilidad de ser operado en tiempo real por una computadora portátil, tales características, junto con la habilidad de secuenciar fragmentos sumamente largos (~882 kb) posicionó a este dispositivo como uno de los más innovadores y de mayor interés entre la comunidad científica (Benítez-Páez *et al.*, 2016; Jain *et al.*, 2018; ONT, 2017).

En el área de investigación ambiental, la secuenciación portátil de ONT ha permitido investigar las

comunidades de un amplio rango de ambientes, incluyendo lugares remotos. Por ejemplo, el Ártico, "El mar de Bering, permafrost de Alaska e incluso fuera de la tierra, en una unidad espacial internacional" (ONT, 2020), de tal manera que se ha generado un mejor entendimiento de la diversidad e interacciones de microorganismos en una amplia variedad de ambientes.

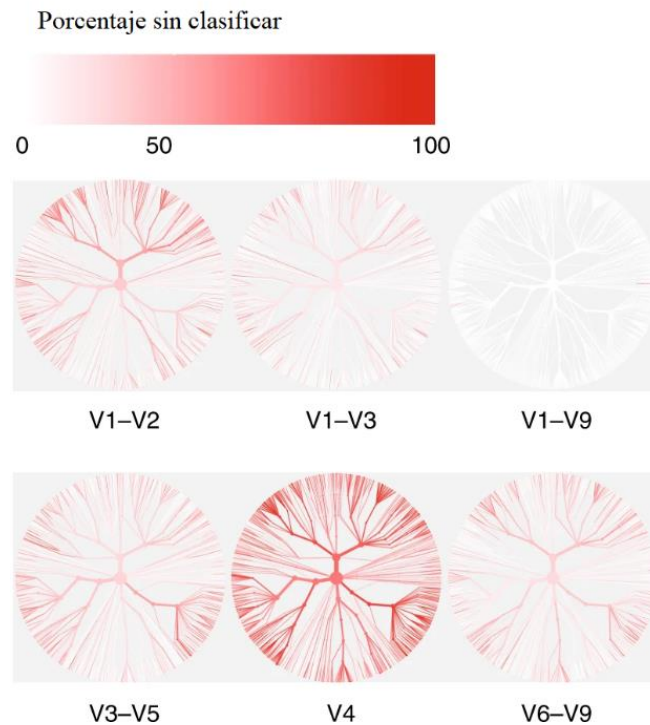


Figura 7. Árboles filogenéticos basados en los niveles de asignación taxonómica según la región del gen 16S utilizada. La intensidad en el color de cada rama refleja la proporción de secuencias dentro de cada clado que no se identificaron a nivel de especie. Adaptado de Johnson y colaboradores (2019).

2.9. Metagenómica en Aguas Superficiales

El estudio de comunidades bacterianas en ecosistemas acuáticos ha sido en gran medida gracias a análisis metagenómicos, sin embargo, a pesar de la gran importancia del agua de los ríos, con respecto a otras fuentes, durante los primeros años del desarrollo de estos análisis (1995-2009), las comunidades bacterianas de sistemas marinos y sistemas lénticos fueron las más exploradas

(Zinger *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). No obstante, durante los últimos 10 años se han realizado mayores esfuerzos sobre la caracterización de comunidades bacterianas de aguas superficiales como los ríos, en su mayoría basados en metagenómica dirigida al gen 16S (Ramazzotti y Bacci, 2018; Abia *et al.*, 2018; Urban *et al.*, 2021; Samson *et al.*, 2019).

Tales análisis han permitido identificar un número importante de bacterias cosmopolitas en río, su distribución, correlación a factores ambientales y contaminantes, así como taxones relacionados con bacterias patógenas. Un ejemplo de ello, es el estudio de comunidades bacterianas (a través V2 del 16S) llevado por Breton-Deval (2019), reporta una composición bacteriana dominada por el filo *Proteobacteria* (57 %), además de la incidencia de géneros patógenos considerados poco comunes o emergentes como: *Myroides* (7 %), *Arcobacter* (2 %) y *Pseudomonas* (2 %), pero ausencia de patógenos clásicos como *Salmonella* y *Escherichia*, en ríos con altos conteos de Coliformes fecales (zonas cercanas a descargas residuales industriales y domésticas).

Por su parte, Ibekwe y colaboradores (2016), mediante la secuenciación de la región V1-V2 del gen 16S, describen una población bacteriana liderada por los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Acidobacteria* (34 %, 18.7 %, 3.99 % y 2.99 %, respectivamente) en el Río Santa Ana, además reportan una alta prevalencia de secuencias asociadas a *Bacteroidales* y *Enterobacteriales* en sitios con altos recuentos de Coliformes fecales; sin embargo, aunque lograron identificar secuencias asociadas a 13 géneros potencialmente patógenos, en los sitios con altos recuentos de Coliformes no identificaron secuencias pertenecientes a *Enterococcus*, *Escherichia* y *Salmonella*. En los estudios mencionados se resalta la limitante de detección de géneros poco abundantes.

Durante los últimos cinco años las tecnologías de tercera generación han facilitado la implementación del monitoreo mediante el gen 16S completo, una opción que se ha descrito como más precisa. En ese sentido, Urban y colaboradores (2021), utilizan metagenómica dirigida al 16S completo para evaluar la diversidad bacteriana y los niveles de contaminación bacteriana acuática en el Río Cam en Cambridge. De tal manera que logran identificar la diversidad propia del río y además 21 géneros potencialmente patógenos, entre ellos: *Arcobacter*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Salmonella* y *Leptospira*. De ellos, el género *Leptospira* se encontró en una mayor abundancia con respecto a los otros patógenos, no obstante, las secuencias se asociaron a especies saprófitas en vez de patógenas, lo cual se comprobó mediante análisis taxogenómicos a nivel especie.

De acuerdo con los estudios mencionados, la composición bacteriana global podría considerarse bien establecida a nivel filo, a pesar de que cada río se encuentra en una zona geográfica y climática distinta. Sin embargo, claramente las diferencias encontradas en cuanto al número de géneros patógenos presentes dependerán del grado de contaminación del área específica de estudio y del grado de discriminación taxonómica basado en la elección del gen a 16S a secuenciar.

Por lo tanto, además de identificar el número de géneros patógenos en una corriente como indicador del "estado de salud", otro aspecto a considerar son los valores de riqueza y diversidad de una comunidad bacteriana; por ejemplo, una mayor diversidad se asocia a una mayor resistencia y mantenimiento de funciones en el ecosistema, por lo tanto un mejor "estado de salud" del ecosistema (Loreau *et al.*, 2001).

Para estimar la diversidad, se utilizan distintas medidas o índices de diversidad (alfa, beta y gama), que consisten en caracterizar en número, composición y variación de taxones bacterianos a nivel comunidad (Figura 8) (Balsega y Gómez-Rodríguez, 2019; Veech, 2018).

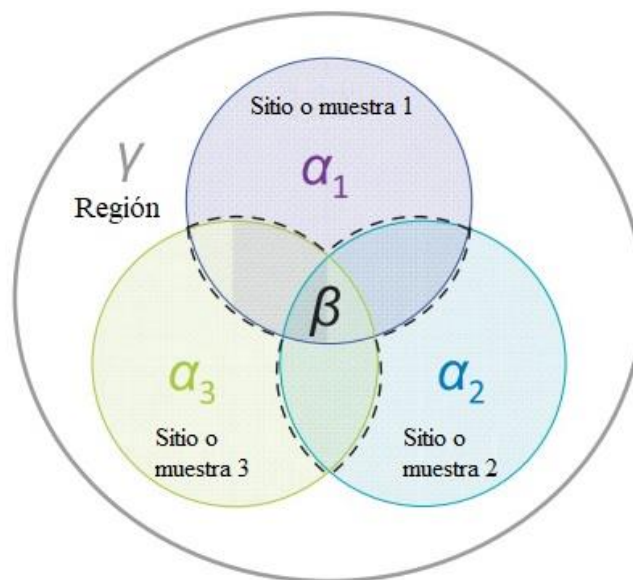


Figura 8. Representación esquemática de la diversidad alfa, beta y gamma. Diversidad alfa: se refiere a la riqueza de especies en un sitio o muestra. Diversidad beta: consiste en determinar diferencias en la diversidad o composición de una comunidad entre dos o más sitios/muestras. Diversidad gamma: se refiere a la diversidad regional, similar a diversidad alfa pero se aplica a un área más grande que abarca las unidades de estudio. Adaptado de Zinger y colaboradores (2012).

En ríos, se han reportado valores de diversidad bacteriana entre 4.49–5.20 según el índice de Shannon, sin embargo, los valores de diversidad pueden diferir ante perturbaciones en pH, nutrientes y temperatura de la corriente (Huang *et al.*, 2021). Por ejemplo, Ibekwe y colaboradores (2016), reportaron una mayor riqueza y diversidad de especies bacterianas en sitios naturales (sin perturbación antropogénica) de agua superficial y sedimentos (4.44 y 5.32, respectivamente), en comparación con agua superficial de escorrentía urbana, canales de irrigación y sitios recreativos (río). Además, cabe mencionar que en tal estudio, los sitios naturales tuvieron recuentos bajos de Coliformes fecales como indicador de microorganismos patógenos pero se demuestra presencia de géneros potencialmente patógenos, según el análisis metagenómico. Por lo tanto, el estudio de la diversidad de los ambientes acuáticos es un complemento necesario para evaluar, monitorear y anticipar un estado sustentable del ecosistema en estudio (Zinger *et al.*, 2012).

2.10. Calidad de Aguas Superficiales del Valle de Culiacán

Se conoce que los ríos mexicanos ayudan a satisfacer gran parte de las necesidades económicas del país. Sin embargo, se ven gravemente afectados por el vertido indiscriminado de aguas residuales de origen municipal, agrícola e industrial, lo que ha amenazado la calidad del agua de distintos ríos (Bravo *et al.*, 2013). Esto ha ocasionado que el agua superficial pueda contener una amplia variedad de patógenos clásicos y emergentes, entre ellos bacterias, virus, protozoarios y otros parásitos (Navarro-Frómata y Navarrete-Rosas, 2020).

De manera más focalizada, el estado de Sinaloa se encuentra ubicado en una región privilegiada con 11 ríos y 11 presas, recursos que le ha permitido posicionarse como uno de los estados agrícolas más destacados del país (INAFED, 2020; CODESIN, 2019). Sinaloa, al ser un estado productor agrícola, concede cerca del 90 % del agua para esa actividad, de la cual, gran parte depende de fuentes superficiales, como el Río Fuerte, Río Sinaloa y Río Culiacán (CONAGUA, 2018; PRONACCH, 2013).

El Río Culiacán, se forma por la convergencia de dos ríos originados en la Sierra Madre Occidental (Ríos Humaya y Tamazula), y se posiciona como uno de los 10 ríos más importantes del país. Donde gran parte de su caudal es utilizado para actividades agrícolas en la zona del Valle de

Culiacán, y un menor porcentaje en abastecimiento público, industria y energía (CONAGUA, 2018).

A causa de la gran importancia económica y social que representan estos recursos, en años recientes se ha evaluado de manera frecuente la calidad química y microbiológica de las aguas superficiales del Valle de Culiacán.

Entre los diversos estudios realizados en el Valle de Culiacán, se ha comprobado que hay un aumento en la concentración de carbono, fósforo y nitrógeno, debido a presencia de materia orgánica y nutrientes en sedimentos, indicando liberación de aguas residuales urbanas y desechos agrícolas (Ruiz-Fernandez *et al.*, 2002).

Por otro lado, se ha encontrado presencia de bacterias patógenas en drenes agrícolas, así como presencia de metales pesados (Ahumada-Santos *et al.*, 2014; Soto-Jiménez *et al.*, 2003). Además, según los últimos reportes sobre el monitoreo de Coliformes fecales en la región Pacífico Norte III en el municipio de Culiacán y Navolato, se ha reportado a la mayoría de las aguas superficiales (ríos, arroyos, drenes, bahía, estuarios y presas) como contaminados y fuertemente contaminados por CF (CONAGUA, 2018).

Otros estudios han reportado la presencia de Coliformes fecales y *E. coli* en canales de riego agrícola, así como la persistencia de *Salmonella* en muestras de agua de los ríos de Culiacán (Castañeda-Ruelas y Jiménez-Edeza, 2018; Jiménez-Edeza y Chaidez, 2012). Estudios más detallados han indicado la presencia de diferentes serotipos y cepas de *Salmonella* y *E. coli* (López-Cuevas *et al.*, 2009).

Para el caso de *Salmonella*, Jiménez-Edeza *et al.* (2014), reportaron su presencia en 111 de 138 muestras de agua de ríos del Valle de Culiacán. Por otro lado, Ahumada-Santos (2014), reportó contaminación fecal y bacterias como *Escherichia coli*, *Kluyvera cryocrescens* y *Enterobacter agglomerans* en canales de drenaje agrícola del Valle de Culiacán, indicando contaminación de origen fecal, además la presencia de estas bacterias se asoció con parámetros como temperatura y porcentaje de oxígeno disuelto; sin embargo, concluyen que se requieren de trabajos más extensos, como estudios de consorcios microbianos para una mayor explicación de lo que ocurre en tales ecosistemas.

Los diferentes estudios llevados a cabo en el Valle de Culiacán sobre la contaminación microbiana en ecosistemas acuáticos han indicado la presencia de bacterias interés en el área de salud pública, como Coliformes, *E. coli* y *Salmonella*, las cuales pueden contribuir a la alta prevalencia de

enfermedades entéricas en la región. No obstante, al momento no se han realizado estudios para describir la diversidad bacteriana completa en esa región. Por tal razón, se requiere la implementación de técnicas de monitoreo complementarias que permitan realizar una descripción global de la diversidad bacteriana, que permitan al mismo tiempo la identificación de bacterias patógenas.

3. HIPÓTESIS

El perfil bacteriano del agua superficial en el Valle de Culiacán es diverso y se encuentra conformado por cuatro filos principales, *Proteobacteria* \approx 42 %, *Bacteroidetes* \approx 18 %, *Cyanobacteria* \approx 10 %, y *Actinobacteria* \approx 2 % y a nivel género, se encuentra por lo menos la presencia de *Salmonella* y *Escherichia* como patógenos potenciales.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar la diversidad y composición bacteriana en muestras de agua superficial del Valle de Culiacán, mediante metagenómica del gen ARNr 16S completo.

4.2. Objetivos Específicos

- 1.- Determinar la estructura (alfa y beta) de las de comunidades bacterianas de muestras de agua superficial.
- 2.- Determinar la distribución taxonómica basada en la comparación de gen ARNr 16S, a nivel filo, orden y género en muestras de agua superficial.
- 3.-Determinar la presencia o ausencia de géneros bacterianos potencialmente patógenos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Área de Estudio

El estado de Sinaloa está ubicado en Noroeste de México (22 ° 31 'a 26 ° 56'N y 105 ° 24' a 109 ° 27'W) y colinda con el Golfo de California. En la zona centro del estado de Sinaloa se encuentra el Valle de Culiacán, una zona de uso extensivo agrícola, con un clima cálido-seco, con lluvias en verano y ligeras en invierno, con una temperatura media anual de 24.9 °C (González Acosta *et al.*, 2006; Ruiz-Fernandez *et al.*, 2002). Dentro de esta zona, se eligieron cinco sitios de muestreo de aguas superficiales, los cuales fueron seleccionados por su cercanía a posibles fuentes de contaminación biológica.

La ubicación geográfica de los sitios de estudio se pueden observar en la Figura 9 donde se recolectaron muestras de 5 sitios, denominados como R1, R2, R3, C4 y C5, en un periodo de dos meses con intervalos mensuales (enero y febrero 2021) (Cuadro 2). No se recolectaron réplicas de los sitios de muestreo, ya que el objetivo de esta investigación fue exclusivamente evaluar la diversidad de las comunidades bacterianas en los sitios de muestreo seleccionados.

Cuadro 2. Sitios de toma de muestra para el monitoreo microbiológico y su ubicación geográfica.

Sitio	Tipo de muestra	Latitud	Longitud
R1	Río Culiacán	24.778067894710503	-107.59336915823582
R2	Río Culiacán	24.78033961954041	-107.5710290619531
R3	Río Culiacán	24.80239994652536	-107.54941545937028
C4	Canal de irrigación	24.724696547404598	-107.59466865470351
C5	Canal de irrigación	24.731781596664188	-107.5457570386035

5.2. Colecta de Muestras

En cada uno de los sitios de estudio se colectó 1 L de agua. Para ello se utilizaron bolsas estériles con un volumen de 2 L (Nasco Whirl-pack, EUA), las muestras se tomaron aproximadamente a 30 cm por debajo de la superficie, en dirección opuesta al flujo de la corriente. Luego fueron transportadas en hieleras a 4-8 °C al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA), del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Culiacán y se procesaron en un periodo no mayor a 12 h.



Figura 9. Mapa de los sitios de muestreo en Valle de Culiacán. Los sitios R1, R2 y R3 se localizan sobre la cuenca Río Culiacán, C4 y C5 sobre canales de riego agrícola. El mapa fue generado con la herramienta Google Maps.

Una vez en el laboratorio, se prepararon las muestras para la extracción de material genético. Brevemente, de cada muestra de agua se filtraron 200 mL a través de un disco de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.45 μm (Millipore, EUA) empleando un embudo conectado a una fuente de vacío. Después, los filtros se retiraron del embudo y se cortaron en tiras (1 cm) con tijeras estériles y se pusieron en tubos con perlas de lisis para la extracción de ADN (Urban *et al.*, 2021).

5.3. Extracción de Material Genético

Para la extracción de ADN total se empleó el kit DNeasy® PowerWater® (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor, a excepción de ligeras modificaciones propuestas por Urban *et al.*, (2021). A los filtros previamente cortados en tiras y colocados en tubos con perlas de lisis de 5 mL, se les añadió 1 mL del buffer de homogeneización PW1, después, los tubos se sometieron a 10 minutos de agitación vigorosa en un vórtex. Después se transfirió el sobrenadante (aproximadamente 600–650 μ L) a un tubo colector de 2 mL, enseguida se centrifugó a 13,000 \times g por 1 min. Evitando recuperar el pellet, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 2 mL. Después se agregaron 200 μ L de la solución IRS y se dio vórtex para mezclar. Inmediatamente después, los tubos se incubaron a 2–8 °C durante 5 min, posteriormente se centrifugaron a 13,000 \times g por un minuto. Evitando el pellet, se transfirió el sobrenadante un tubo de recolección estéril de 2 mL y se agregaron 650 μ L de solución PW3, después se agitó para mezclar. Enseguida se cargaron 650 μ L del sobrenadante en una columna MB y se centrifugó a 13,000 \times g por 1 min, este paso se repitió hasta procesar todo el sobrenadante. Enseguida se colocó el filtro de la columna MB en un tubo estéril de 2 mL y se agregaron 650 μ L de la solución PW4 y se centrifugó a 13,000 \times g por 1 min, después se desechó el filtrado. Luego se añadieron 650 μ L de etanol y se esperó por 5 min antes de centrifugar a 13,000 \times g por 2 min, nuevamente se desechó el filtrado y se centrifugó a 13,000 \times g por 1 min. Después se colocó la columna MB en un tubo de 2 mL y se agregaron 50 μ L de la solución EB al centro de la membrana del filtro y se centrifugó a 13,000 \times g por 1 min. Finalmente se desechó la columna y el ADN se resguardó en ultracongelador a -80 °C para posteriores análisis.

5.4. Determinación de la Calidad del ADN

La calidad del ADN proveniente de cada muestra se evaluó mediante la cuantificación de ácidos nucleicos en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, USA). Como blanco se utilizó 1 μ L de solución EB.

Una muestra fue considerada buena cuando cumplió con una concentración mayor a 5 ng/μL y una relación A260/A280 mayor a 1.8 pero menor a 2.1. El número de muestras y su concentración se pueden consultar en el anexo 10.1.

5.5. Amplificación y Secuenciación del Gen ARNr 16S

A partir del ADN extraído de las muestras de cada uno de los sitios, se seleccionaron 17 muestras que cumplieron con los criterios de calidad, y se enviaron al Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS) en Reino Unido para su secuenciación; el resto de las muestras se resguardó en ultracongelación. A continuación se describe brevemente el procesamiento de muestra realizado. En CEFAS se verificó la calidad e integridad de las muestras mediante un método flourométrico (Quibit, Thermo Fisher, EUA), los datos sobre concentraciones obtenidas se muestran en el anexo 10.2. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a la amplificación del gen 16S completo (V1-V9) por PCR; para ello, se utilizó del kit 16S Barcoding 1-24 SQK-16S024 (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). La reacción de PCR se llevó a cabo con los reactivos descritos en el Cuadro 3 y las condiciones de PCR utilizadas fueron de un ciclo inicial de desnaturalización de 1 min a 95 °C, seguido de 25 ciclos 20 s a 95 °C, 30 s a 55 °C 2 min a 65 °C y por último, un ciclo de extensión final de 5 min a 65 °C y estabilización a 4 °C. El ADN fue amplificado con oligonucleótidos específicos (27F and 1492R) con barcodes adaptados para un fácil ligamiento de adaptadores de secuenciación (ONT, 2019).

Cuadro 3. Componentes para amplificación por PCR del gen 16S.

Reactivos	Cantidad
Agua libre de nucleasas	14 μL
ADN (10 ng)	10 μL
Oligonucleótido 16S barcode	1 μL
Taq LongAmp 2x master mix	25 μL

Los barcodes asignados a cada muestra se pueden revisar en el Anexo 10.2. El siguiente paso

consistió en mezclar las bibliotecas en una proporción de 50-100 fmol/10 μ L y se cargaron en el puerto SpotON del dispositivo de secuenciaron MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido) (Figura 10) (Acharya *et al.*, 2020; Benítez-Páez *et al.*, 2016).

Los archivos generados (fast5) pasaron por un proceso de asignación de bases con el uso de la herramienta Guppy, que se basa en traducir la señal eléctrica a una secuencia de nucleótidos utilizando un modelo de alta precisión (high accuracy model). El total de secuencias generadas se recibieron ya clasificadas en carpetas de acuerdo al barcode utilizado durante la amplificación, conglomeradas en un archivo comprimido bajo el nombre de HA_basecalled.tar.

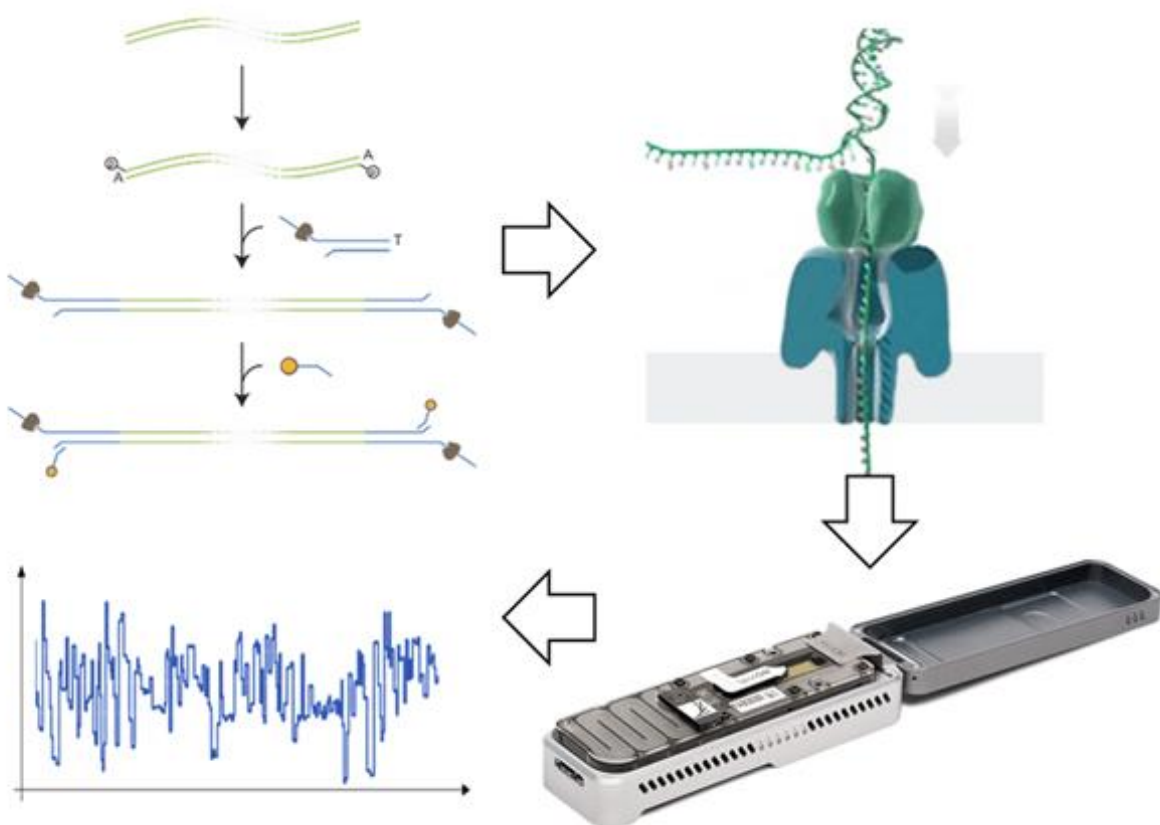


Figura 10. Descripción general del proceso de secuenciación de nanoporos. Tomado de Bhattaru y colaboradores (2019).

5.6. Análisis Bioinformáticos

5.6.1. Análisis de Calidad de Secuencias

Las secuencias del gen 16S contenidas en el archivo HA_basecalled.tar se sometieron a un procesamiento con diferentes programas bioinformáticos con el objetivo final de asignar un taxón, siguiendo las recomendaciones para asignación de lecturas largas según Santos *et al.* (2020). El pipeline utilizado se encuentra descrito detalladamente en el Anexo 10.3.

El primer paso consistió en verificar la calidad de las lecturas, para ello se utilizó el programa NanoPlot (versión 1.38.0), el cual permite procesar datos de secuenciación de lecturas largas y visualizar una serie de gráficos referentes a cantidad, calidad y longitud de lecturas, adicionalmente se utilizó NanoStat (versión 1.5.0) el cual produce un resumen estadístico sobre los datos de secuenciación (De Coster *et al.*, 2018).

Las secuencias pasaron por un proceso de control de calidad, por longitud y calidad de lectura. Para esta tarea se utilizó el programa NanoFilt y los parámetros utilizados fueron `-length`, `--maxlength` y `-q`, para indicar un filtro por longitud de secuencias de 600 pb a 1900 pb y puntaje promedio de calidad de la lectura >8 (De Coster *et al.*, 2018; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2020; Urban *et al.*, 2021). Posteriormente, se realizó un proceso de recorte (trimming) de adaptadores o datos erróneos al inicio/final de las secuencias, para ello se utilizó el programa Porechop (versión 0.2.4), con los parámetros adicionales de `--middle_threshold` y `--discard_middle` para identificar quimeras (secuencias con adaptadores intermedios) y en caso de existir, descartar esa secuencia (Wick, 2017).

Los archivos resultantes se utilizaron para verificar nuevamente las características de las lecturas, para ello se utilizaron los programas NanoPlot y NanoStat, los gráficos de comparación de antes y después del control de calidad se pueden ver en el anexo 10.4 (De Coster *et al.*, 2018).

5.6.2. Asignación Taxonómica

Para la asignación taxonómica se utilizó el programa Centrifuge (v1.0.4), un programa de clasificación taxonómica que permite realizar un etiquetado de lecturas (Kim *et al.*, 2016). Este programa se utilizó en conjunto con la base de datos SILVA DB, la cual contiene secuencias del ARN ribosómico (ARNr) 16S (SilvaDB, 2020). Para llevar a cabo la asignación de taxones primero se descargó la base de datos, se construyó un índice con el parámetro `--centrifuge-build`, lo que resulta en tres índices (.cf) y finalmente se llevó a cabo la asignación con los parámetros adicionales de `-q` (formato del archivo de entrada) y `-p` (para indicar el número de subprocesos ejecutados para realizar el alineamiento). El resultado de la clasificación con Centrifuge se muestra en archivos con un contenido de 8 columnas (anexo 10.5).

5.6.3. Obtención de Tabla de OTUs, Exploración de Datos y Creación de Gráficas

Antes de explorar los datos, los resultados de Centrifuge se transformaron en tablas con el contenido de unidades taxonómicas operacionales, en este caso se utilizó el 16S como unidad de clasificación (OTUs, siglas en inglés) en la página web Pavian (<https://fbreitwieser.shinyapps.io/pavian/>) (Breitwieser y Salzberg, 2020). Para ello, se eligió un formato de salida de abundancia en número de lecturas, a partir de esta tabla se prepararon tres formatos correspondientes a taxonomía, metadata y OTUs; el primero, referente a datos clasificación taxonómica (filo a género), el segundo sobre número y tipo de muestras, y el tercero sobre el contenido de abundancia y número identificador de taxón. Los pasos para obtener estos formatos se encuentran descritos a detalle en el anexo 10.3 (Breitwieser y Salzberg, 2020). Seguido a ello, se llevó a cabo una normalización de los datos por rarefacción, que consiste en submuestrear el mismo número de lecturas hasta ya no encontrar taxones nuevos, de esta manera se establece un número de lecturas donde todas las muestras llegan a una asíntota. Después, los datos normalizados se utilizaron para definir la estructura de la comunidad a través de comparar abundancias a nivel sitio y entre sitios.

5.6.4. Análisis Estructural de Comunidades: Diversidad Alfa y Beta

Para el análisis de diversidad por sitio se utilizaron índices alfa, con base en el índice de Chao1 para riqueza (número de microorganismos), en este caso representado por las secuencias del gen 16S asignadas a un OTU. Para evaluar biodiversidad se utilizaron los índices Shannon, el cual toma en cuenta el número de microorganismos y además su proporción, de tal modo que se refleja la heterogeneidad de la comunidad en función del número de géneros presentes (Fedor, 2013; Veech, 2018). Por otro lado, la diversidad beta se utilizó para evaluar diferencias entre la composición de comunidades entre los diferentes tipos de muestra. Para ello se utilizó el índice de Bray Curtis, el cual se basa en el cálculo de diferencias sobre abundancia (Legendre, 2013). Para análisis de alfa y beta diversidad, así como para el perfilamiento de comunidades se utilizó la herramienta MicrobiomeAnalyst propuesta por Chong *et al.* (2020). Con la misma herramienta se crearon gráficas para géneros potencialmente patógenos, abundancias que se buscaron manualmente en las bibliotecas de abundancias. Se utilizó como referencia un esquema de 55 patógenos que causan enfermedades transmitidas por el agua (Urban *et al.*, 2021).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis de la Estructura y Diversidad Bacteriana en Agua Superficial del Valle de Culiacán

Tras el proceso de secuenciación del gen ARNr 16S mediante la plataforma MinION de Oxford Nanopore Technologies, se obtuvo un rendimiento de 5.5 M lecturas crudas, pertenecientes a los 5 sitios de estudio (Anexo 10.4), después del proceso de limpieza de secuencias, se conservó alrededor de 4.4 M de lecturas (Anexo 10.6), lo que representa el 80.45 % con respecto a las secuencias crudas; que resultó en 2,721,566 lecturas clasificadas a un taxón, distribuidas en 2,862 OTUs (Anexo 10.7), lo que significa que más del 60 % de los taxones existentes en base de datos LSU de SILVA fueron encontrados en este conjunto de datos (SilvaDB, 2020).

Para tener en cuenta las variaciones en la profundidad de secuenciación, las bibliotecas pasaron un proceso de rarefacción, donde los datos se unificaron en función de la muestra con profundidad inferior (Weiss *et al.*, 2017; Escalante, 2008).

Se aplicó un límite de 75,000 lecturas para los sitios de agua superficial de río (R1, R2 y R3) y 123 lecturas para canales de riego (C4 y C5); los resultados tras este proceso se muestran en curvas de acumulación de riqueza (Anexo 10.8). Para ello, se tomó en cuenta que los sitios C4 y C5, no representan la comunidad bacteriana completa, según los valores de cobertura de Goods (Anexo 10.8) (Chao y Jost, 2012); por lo tanto, los datos se unificaron en función del tipo de muestra (río o canal). Para posteriores análisis, se recomienda una secuenciación más profunda, para obtener una mayor estimación de la comunidad y valores de Goods más altos (Fujiyoshi *et al.*, 2020).

6.1.1. Diversidad Alfa

Las 17 bibliotecas resultantes revelaron niveles de riqueza y heterogeneidad bacteriana similares entre los sitios del mismo tipo de muestra. Con referencia al índice Chao1, el cual mide únicamente la riqueza, nos indica que los sitios monitoreados en el Río Culiacán (R1, R2 y R3) tuvieron valores

medios de 800, 797 y 826, una riqueza menor a lo reportado por Jin *et al.* (2018) en comunidades bacterianas de ríos (Chao1 > 2000), pero una riqueza mayor a lo reportado por Ibekwe *et al.* (2016). Además, en tales estudios se obtuvo una menor cobertura de la comunidad (96 % y 33 %, respectivamente), en comparación con los sitios analizados en este trabajo (> 99.8 % para R1, R2 y R3, anexo 10.8); de tal forma que a pesar de haber obtenido una menor riqueza a lo que otros autores han reportado, el número de secuencias obtenidas son una muy buena representación de la comunidad.

Por otro lado, se obtuvieron valores de menor riqueza en las lecturas pertenecientes a canales (C4 y C5) con valores de 60 y 130, lo cual claramente indica un número de individuos muy inferior con respecto a los puntos de río (Figura 11).

Por otra parte, el índice de Shannon es un parámetro que toma en cuenta riqueza y uniformidad de los taxones (Veech, 2018). Este índice indica que el sitio con mayor diversidad fue el punto R2 con un valor de 4.66 y el sitio C5 fue el menos diverso, con un índice de Shannon de 3.16 (Cuadro 4). De manera general, los tres sitios de río fueron representados por valores >4, lo que indica una diversidad elevada y concuerdan con valores reportados por Samson *et al.* (2019) y Xia *et al.* (2014) en comunidades bacterianas de aguas superficiales y sedimentos superficiales de río.

La diversidad obtenida en esta investigación se podría considerar una comunidad más rica y diversa que el tracto gastrointestinal de distintos animales, pero menos diversa que las comunidades pertenecientes a suelos, donde se han reportado índices de diversidad Shannon > 8 (Takayasu *et al.*, 2019).

Con referencia a la diversidad de C4 y C5, se pueden observar valores medios de 3.5 y 3.1, lo que representa una diversidad inferior con respecto a lo obtenido en río. De acuerdo con Ibekwe *et al.*, (2016) una diversidad mayor se asocia a sitios con menor impacto antropogénico y una menor diversidad, en este caso podría atribuirse a que los canales generalmente tienen un flujo de agua bajo y una exposición UV (ultra violeta) continua, resultando en una menor diversidad bacteriana. Con referencia a la exposición UV, se ha reportado que la exposición a luz UV causa daños en el ADN bacteriano, produciendo emparejamiento entre bases, principalmente entre pirimidinas, si el daño no es reparado, la acumulación de dímeros puede ser letal para las células bacterianas (Ben Said *et al.*, 2010).

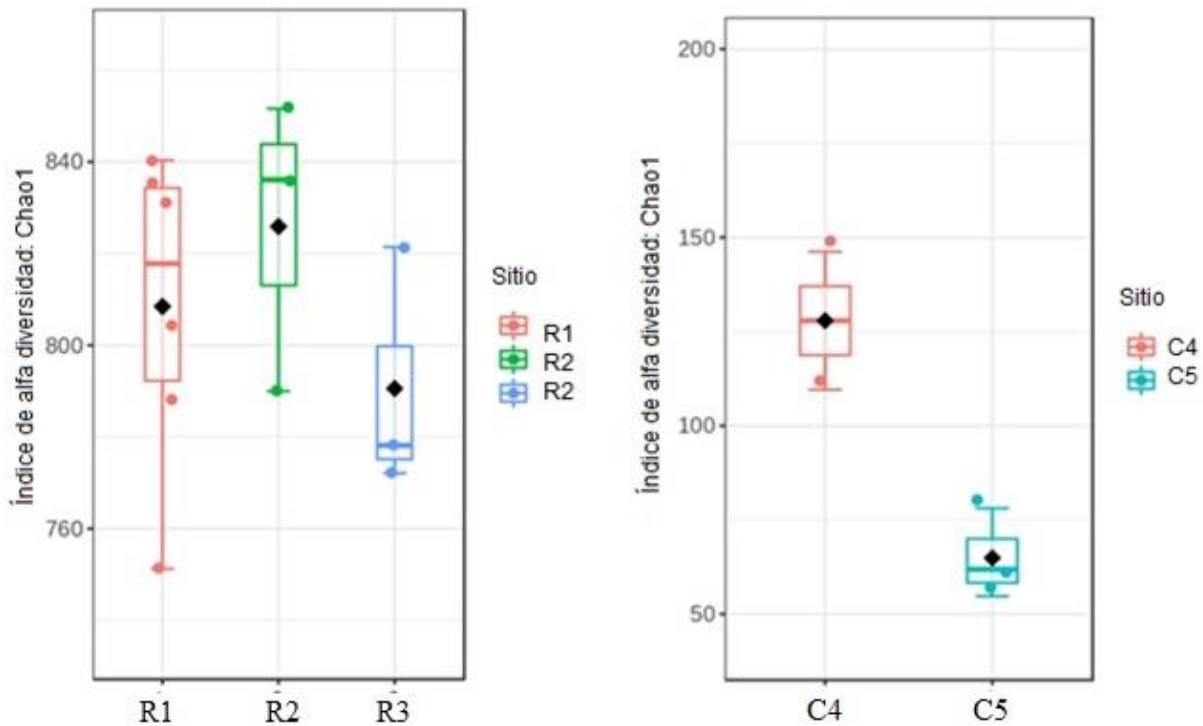


Figura 31. Diagrama de caja sobre la diversidad alfa calculada con base al índice de diversidad alfa Chao1. La diversidad alfa con Chao1 resume riqueza de especies basado en su abundancia en una muestra. a) Diversidad alfa de los sitios sobre el Río Culiacán b) Diversidad alfa de los sitios sobre canales de riego.

Por otro lado, algunos estudios han reportado que cambios en la diversidad bacteriana puede verse afectada por propiedades fisicoquímicas del agua, por la profundidad del canal, concentración de N y P, así como por temperatura (Fortunato y Crump, 2011; Yang *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2021). Con referencia al agua superficial recolectada de los sitios C4 y C5, una menor diversidad bacteriana podría ser explicada por un menor flujo de agua y profundidad, donde la exposición a luz es continua.

Adicionalmente, es necesario tomar en cuenta que las muestras pertenecientes a C4 y C5 presentaron valores de cobertura de Goods menores que los sitios R1, R2 y R3, por lo que el total de la comunidad que podría estar presente en la muestra no se encuentra representada en las secuencias analizadas (Anexo 10.8).

Cuadro 4. Valores de diversidad alfa con base en el índice de Shannon de cada sitios de muestreo. Para estimar la diversidad alfa, el índice de Shannon toma en cuenta riqueza de especies y uniformidad.

Punto	Shannon
R1	4.60
R2	4.66
R3	4.34
C4	3.54
C5	3.16

6.1.2. Diversidad Beta

Con respecto a la diversidad beta, la evaluación con base al índice Bray Curtis sobre las distancias ocasionadas por diferencias entre abundancias, indica que la diversidad de todos los sitios de estudio se asemeja entre sí, al englobar a todos las muestras en un solo grupo. En este caso, los puntos cercanos a cero indican una mayor similitud, por lo tanto, entre más alejados, hay una mayor diferencia.

En la Figura 12 se puede observar que los puntos más cercanos entre sí y cercanos a 0, son los tres sitios de muestreo en el Río Culiacán que se encuentran representados en color azul, mientras que los sitios C4 y C5 se encuentran ligeramente más dispersos; sin embargo, todos englobados por una misma similitud de taxones, de tal manera que la composición de comunidades bacterianas es similar, sobre todo entre los sitios de río, donde incluso se encontró un mismo patrón de similitud a nivel género (Anexo 10.9).

El agua superficial de canales de riego tiene origen en el Río Culiacán; sin embargo, los canales de riego están típicamente separados por una amplia variedad de factores, como el flujo de agua, relación ancho-profundidad y transporte de sedimentos (Theol *et al.*, 2016), este último es casi nulo en los canales de riego. Algunos autores han reportado una creciente disimilitud entre taxones, ocasionado por distancia física entre los sitios de muestreo, por diferencias estacionales de muestreo y por una amplia variedad de propiedades fisicoquímicas entre sitios de estudio

(Zwirgmaier *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2021; Tee *et al.*, 2021).

Aunque entre los sitios analizados no se observa una amplia disimilitud, a nivel OTUs (riqueza) existe una enorme diferencia entre número de taxones, lo cual se reafirma con los diferentes niveles de diversidad indicados por el índice de Shannon; sin embargo, de acuerdo con la similitud indicada por el análisis de coordenadas principales se espera que la composición bacteriana entre los sitios esté conservada, a pesar de las diferencias entre los números de riqueza.

De la misma manera, Zwirgmaier *et al.* (2015) reportó patrones estructurales similares según el índice de beta diversidad, pero patrones distintivos a nivel OTUs, donde enfatizan que la diversidad podría ser explicada por OTUs con funciones muy específicas en un sitio, y no únicamente por patrones estructurales de la comunidad, adicionalmente se tendrían que tomar en cuenta parámetros estacionales, factores físicos y químicos para explicar con un mayor sentido las diferencias entre las comunidades bacterianas de los distintos sitios analizados.

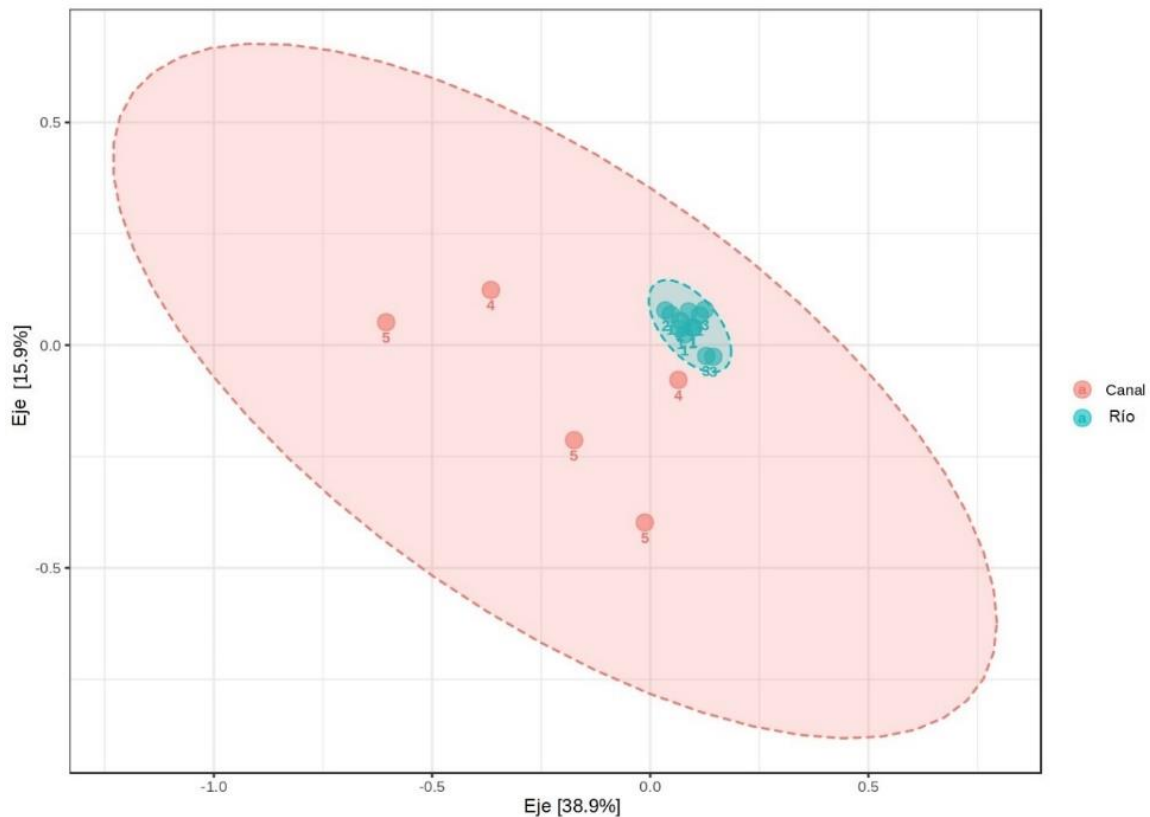


Figura 42. Análisis de coordenadas principales sobre diversidad beta con base al índice de Bray Curtis.

6.2. Diversidad de la Comunidad Bacteriana

6.2.1. Diversidad Bacteriana a Nivel Filo

Con base en los resultados obtenidos del análisis metagenómico se logró identificar a 27 fillos en las muestras de río y 15 en canal, estos últimos compartidos en todos los sitios. De ellos, únicamente 7 fillos tuvieron una abundancia mayor al 1 %. De éstos, el filo dominante fue *Proteobacteria* (48 %), seguido de *Bacteroidetes* (22 %), *Cyanobacteria* (10 %), *Actinobacteria* (7 %), *Planctomycetes* (6 %), *Firmicutes* (2.5 %) y *Verrucomicrobia* (2 %), que en conjunto contemplaron el 97.5 % de la abundancia total (Figura 13). Algunos fillos predominantes coinciden con los principales fillos reportados en distintos ecosistemas de agua dulce como: cenotes, lagos y ríos (Carrillo Jovel, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2015).

La predominancia de *Proteobacteria* (48 %) en agua dulce ha sido ampliamente reportada. Por ejemplo, Breton-Deval (2019), reportó a *Proteobacteria* (57 a 87 %) como el filo más abundante en ríos expuestos a descargas residuales así como en ríos no contaminados.

Por otro lado, Jin y colaboradores (2018), han descrito que *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* (21.9 % y 19.1 %, respectivamente) como los fillos más comúnmente detectados en un río ubicado en una zona urbana. Sumado a ello, Ibekwe y colaboradores (2016), describieron a estos dos fillos como los de mayor abundancia en agua superficial tanto sin impacto antropogénico, como en zonas urbanas y canales de riego agrícola.

En el caso de *Bacteroidetes*, en los sitios correspondientes a canal se observa una mayor abundancia (32.6 %) con respecto a río (17.5 %). Algunos estudios han asociado su riqueza a contaminación de origen fecal (Coliformes fecales), junto con una mayor abundancia de *Proteobacteria* y *Firmicutes*; específicamente el filo *Bacteroidetes* en una alta abundancia, se asocia a sitios con menor diversidad, lo que coincide con los resultados obtenidos en los sitios C4 y C5, los cuales representan las muestras con menor diversidad según el índice de Shannon (Ibekwe *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2018).

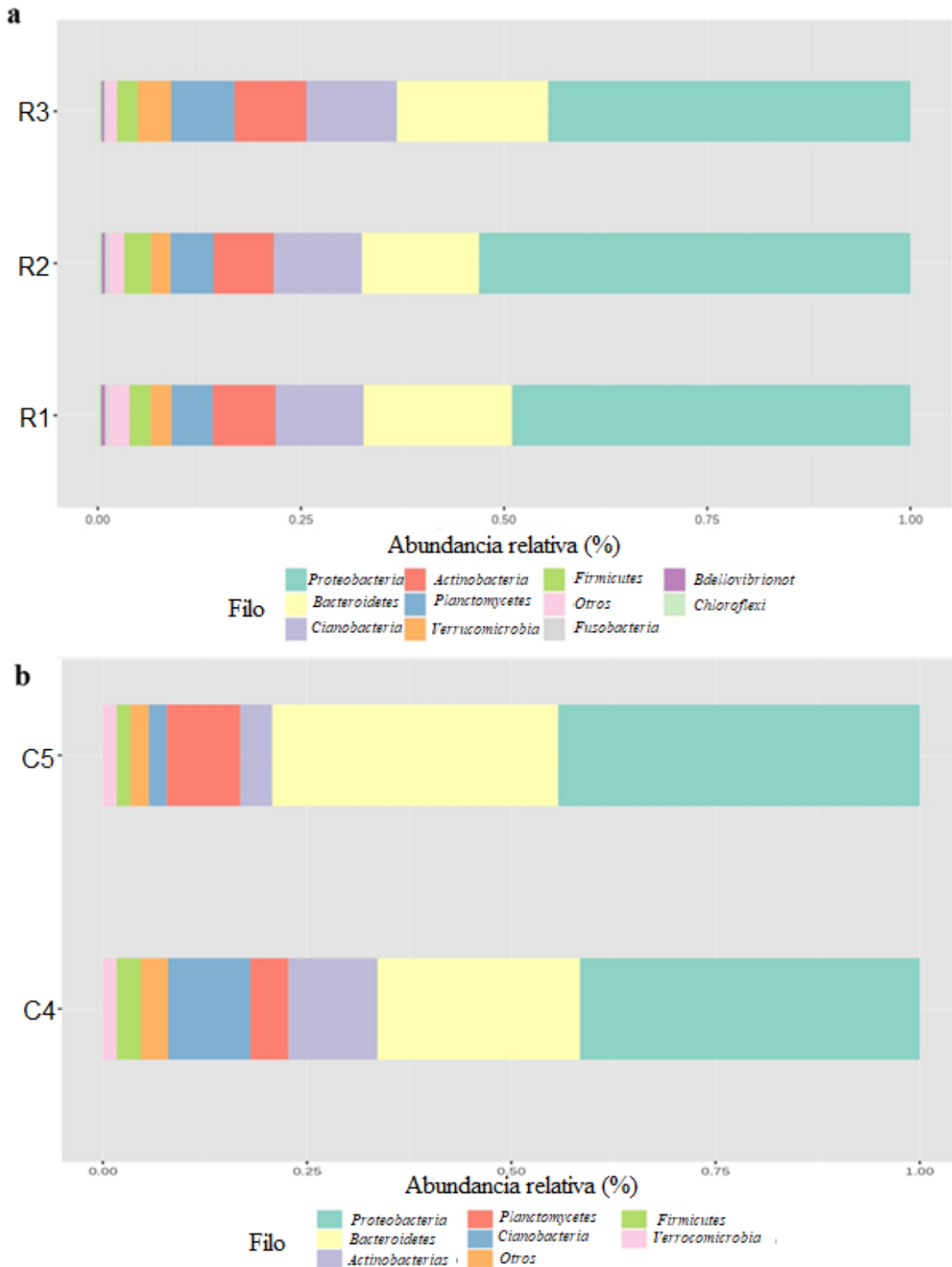


Figura 53. Gráfico de barras sobre la composición de la comunidad bacteriana a nivel filo. El diagrama representa los porcentajes en términos de abundancia relativa de los 7 filos más predominantes. a) Sitios en río y b) Canales de riego.

Con referencia a *Cyanobacteria*, se reconoce como un filo habitual en agua dulce, sin embargo, una abundancia relativa alta se asocia con ambientes eutróficos y floración de algas nocivas (Ej. 30 % de abundancia), de la misma forma se ha asociado al filo *Planctomycetes* con ambientes eutróficos (Yang *et al.*, 2019).

De acuerdo con las abundancias relativas obtenidas para el filo *Cyanobacteria*, ningún sitio mostró un porcentaje > 10 %, incluso en los sitios C4 y C5 *Cyanobacteria* se posicionó como el séptimo filo más abundante (2.8 %) y no entre los tres más abundantes como se posicionó en río. En cambio, el filo *Planctomycetes* representó el tercer filo de mayor abundancia en canales (7.06 %), lo que podría relacionarse con un ambiente eutrófico, según lo reportado por Yang *et al.* (2019), donde se encontró una abundancia significativamente mayor de *Planctomycetes* (3.02 %) en sitios de río ubicados en zonas altamente perturbadas en comparación con zonas menos perturbadas (menor número de habitantes).

En cuanto a los fillos en menor abundancia, éstos comprendieron a *Armatimonadetes*, *Desulfobacterota*, *Chloroflexi*, *Bdellovibrionota*, *Acidobacteriota*, *Myxococcota*, *Fusobacteriota*, *Gemmatimonadota*, *Campilobacterota*, *Spirochaetota*, *Deinococcota* y *Nitrospirota*. Algunos de los fillos de menor abundancia se encontraron únicamente en un sitio; por ejemplo, *Campilobacterota* y *Nitrospirota* se encontraron únicamente en el sitio C4, los cuales, son estrechamente relacionados con la oxidación de sulfuro en ambientes naturales (Carrier *et al.*, 2020; Umezawa *et al.*, 2020).

Por otro lado, el filo *Gemmatimonadota* solo se encontró en el sitio R2, un filo mayormente asociado a suelos; sin embargo, recientemente se ha asociado a ambientes acuáticos (Mujakić *et al.*, 2021).

El filo *Deinococcota* solo se encontró en el sitio R3, y según la literatura es un grupo bacteriano que se distingue por su resistencia altas temperaturas y es ampliamente distribuido en entornos naturales, comúnmente en agua dulce y marina, incluyendo aguas profundas (Battista, 2016).

De manera general, se observaron diferencias mínimas entre abundancias a nivel filo, lo que evidencia claras tendencias sobre la diversidad bacteriana. Estos resultados nos indican que en ambos tipos de muestras y sitios analizados los fillos predominantes son similares, lo cual concuerda con la poca variación mostrada en los análisis de beta diversidad.

6.2.2. Diversidad Bacteriana a Nivel Orden

Se analizaron los órdenes más predominantes, de los cuales siete fueron los principales, comenzado por *Burkholderiales* (29 %) como el más abundante, seguido de *Cytophagales* (9.52 %), *Chitinophagales* (8.59 %), *Rhizobiales* (5.4 %), *Cyanobacteriales* (5.05 %) y *Synechococcales* (4.41 %), además de otros 20 órdenes que contribuyen al resto de la abundancia relativa (27 %).

El orden de mayor abundancia (*Burkholderiales*) (Figura 14), coincide con lo reportado por Staley *et al.* (2014) en el Río Mississippi, donde *Burkholderiales* (~25 %) se posicionó como uno de los principales órdenes en comunidades del río. Por otra parte, se ha descrito que este orden se encuentra en mayor abundancia en reservorios oligotróficos y mesotróficos (niveles bajos y medios de nutrientes) (Llirós *et al.*, 2014).

Por su parte, Starke y colaboradores (2017), revelaron que *Burkholderiales* junto con *Rhizobiales* son de los miembros más activos en comunidades de aguas subterráneas con niveles bajos de oxígeno; por lo tanto, se consideran órdenes comunes en aguas superficiales y subterráneas.

Respecto a *Chitinophagales*, este fue el segundo orden de mayor abundancia en río con 10 % (R1, R2 y R3) y tercero en canales con 7.3 % (C4 y C5). Acerca de *Cytophagales* se observó una mayor abundancia en canal (20 %) con respecto a río (6 %), de tal manera que este orden aporta a la mayor abundancia observada en el filo *Bacteroidetes* en los sitios de canal, que como se mencionó se asocia a sitios menos diversos.

En especial, en el sitio C5, la mayor abundancia del orden *Cytophagales* (22 %) podría atribuirse a su cercanía a campos agrícolas, donde se podría esperar una mayor carga de nutrientes con respecto a río. En ese sentido, Mason *et al.* (2020), indicaron que *Chitinophagales* junto con *Cytophagales*, pueden funcionar como bioindicadores de sitios con altas concentraciones de fósforo o nutrientes, mientras que su ausencia o baja proporción indicarían lo contrario, de acuerdo a resultados obtenidos en comunidades bacterianas de suelos forestales.

Por otro lado, en gráficos representados solo se alcanza a apreciar los órdenes de mayor abundancia, sin embargo, en el grupo de “otros” se encuentran englobados todos aquellos órdenes con abundancia menor al 2.5 %, entre ellos se encuentran órdenes que podrían albergar bacterias patógenas, por ejemplo: *Aeromonadales* (0.5 %), *Pseudomonadales* (0.27 %), *Enterobacterales* (0.14 %), *Bacillales* (0.09 %), *Campylobacterales* (0.07 %) y *Lactobacillales* (0.02 %).

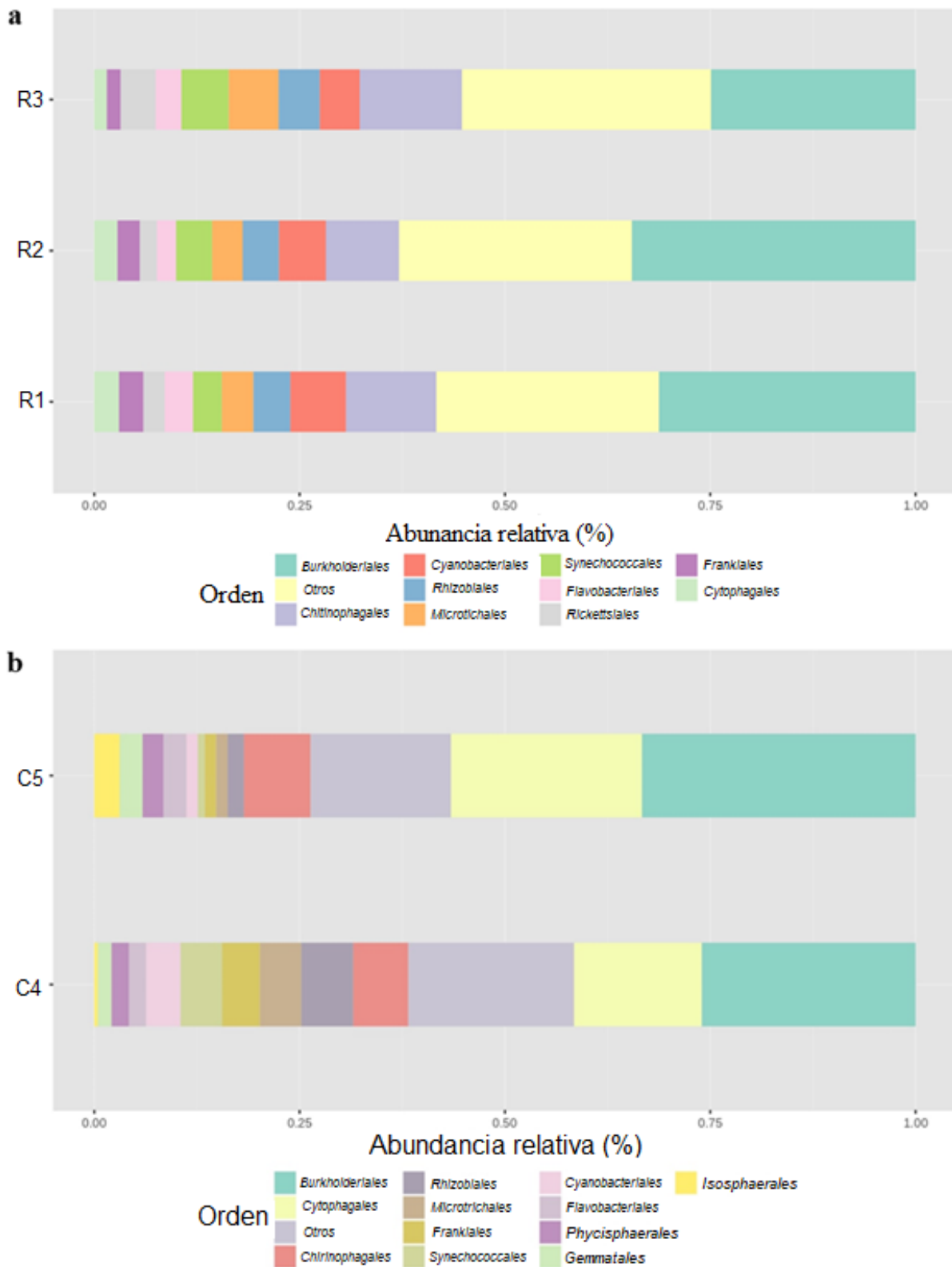


Figura 64. Gráfico de barras sobre la composición de la comunidad bacteriana a nivel orden. a) Abundancia relativa en porcentaje de los sitios R1, R2 y R3 b) Abundancia relativa en porcentaje de los sitios C4 y C5.

Pseudomonadales, es un orden que alberga bacterias patógenas para humanos y plantas, por ejemplo, el género *Xanthomonas* comprende 27 especies causantes de aproximadamente 400 enfermedades a plantas (Sharma *et al.*, 2014). Por otra parte, especies del género *Acinetobacter* son de importancia clínica para humanos (Fusco *et al.*, 2018).

Aeromonadales, es un orden que se asocia comúnmente a ecosistemas acuáticos, sin embargo, algunas especies son patógenas para humanos, así como para animales (ej. peces) (Martin-Carnahan A. y Joseph S.W, 2005).

En el caso del orden *Enterobacterales*, algunos de sus miembros son patógenos para humanos, así como algunas bacterias fitopatógenas. Especies como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Yersinia pestis* para humanos, y géneros como *Pectobacterium* (antes *Erwinia*) y *Pantoea*, como causantes de enfermedades en plantas y asociadas a grandes pérdidas económicas en cultivos (Cothier, 2001; Coutinho y Venter, 2009; Croxen y Finlay, 2010; Geldreich, 1996).

Dentro del filo *Firmicutes*, el orden *Bacillales* se conoce por tener una gran habilidad de formar endosporas, otorgándoles la capacidad de sobrevivir en distintos ambientes. Algunos de sus taxones se han involucrado en oxidación de metales en ambientes marinos (Dick *et al.*, 2006; Ettoumi *et al.*, 2013). Por otro lado, algunos miembros de este orden también han sido ampliamente asociados a infecciones bacterianas en humanos, por ejemplo, asociadas a géneros como *Listeria*, *Staphylococcus* y *Clostridium* (Berman, 2019).

Con referencia a *Campylobacterales*, algunos de sus taxones se asocian con miembros del tracto gastrointestinal de mamíferos y con géneros patógenos como *Arcobacter* y *Helicobacter*; sin embargo, también existen especies que cumplen funciones en la oxidación de compuestos de una amplia variedad de ambientes (Beeby, 2015).

Acerca de *Lactobacillales*, este es un orden que comprende un grupo de bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales se les considera como bacterias de vida libre, comúnmente se asocian con un papel importante en el metabolismo de carbohidratos (Baureder y Hederstedt, 2013). Finalmente, especies del género *Lactobacillus* son miembros normales de la microbiota intestinal humana, pero cambios en su abundancia pueden resultar en infecciones (Dean *et al.*, 2020).

Los órdenes mencionados se encontraron distribuidos en todos los sitios, y aunque se ha descrito que algunos de sus miembros podrían representar un potencial riesgo para la salud de humanos, plantas y animales, también algunos cumplen funciones importantes en el ecosistema, por lo tanto, la correcta caracterización de estas bacterias en el ambiente es de alto interés científico.

6.2.3. Diversidad Bacteriana a Nivel Género

A nivel género, en promedio se asignaron 780 taxones en los sitios de río y 109 taxones en canales, de los cuales, sólo 18 géneros se encontraron en un porcentaje de abundancia relativa igual o mayor al 1 %. Por otro lado, 21 % de la abundancia total fue asignada a bacterias no cultivables o candidatus, una categoría provisional para clasificar taxones que no han sido cultivados en laboratorio (Figura 15) (Murray y Stackebrandt, 1995).

Una de las ventajas de utilizar metagenómica dirigida es que no se depende de técnicas de cultivo en laboratorio, y en teoría se pueden recuperar casi todos los taxones bacterianos de cualquier hábitat. Sin embargo, una desventaja es que a pesar del rápido avance en esta área, es que diversas especies bacterianas ambientales aún no han sido totalmente caracterizadas.

En este caso gran parte de las secuencias pertenecen a taxones conocidos, siendo los más abundantes *Dinghuibacter*, *Limnohabitans*, *Polynucleobacter* y *Pseudarcicella*, tanto en agua de río como en canal (Figura 15).

En el caso de *Dinghuibacter* se encontró en una abundancia de 6.29 % en los sitios de río y 5.04 % en canal, es un género que se ha asociado a sitios contaminados por hidrocarburos y zonas contaminadas por metales como Hg, As, Pb y Zn (en suelo) (Wang *et al.*, 2021; Bourhane *et al.*, 2021). Por otro lado, también se considera como uno de los taxones principales en comunidades bacterianas de lago, con una abundancia de 1.2 % (Fournier *et al.*, 2021).

Para el caso de *Polynucleobacter* se obtuvo una abundancia de 5.48 % y 2.52 %, en río y canales respectivamente. Es un género que considerado abundante en sistemas de agua dulce; por ejemplo, en cenotes se presenta en una abundancia de 7.24 % (Carrillo Jovel, 2019), en lagos se encuentra en una abundancia de 3.5 % (Bourhane *et al.*, 2021) y en río 12 % (Breton-Deval *et al.*, 2019), además se ha encontrado como género principal en agua de lluvia (Reyneke *et al.*, 2020). El género *Polynucleobacter*, se considera cosmopolita de agua dulce y se asocia con un buen estado del ecosistema (Jezberová *et al.*, 2010).

En el caso del género CL_500_29, se encontró en una abundancia promedio de 4.29 %, un valor mayor a lo reportado en el Río Pasvik, en Noruega (0.1 a 3.3 %) (Papale *et al.*, 2020); y según Zhang y colaboradores (2020a) una mayor abundancia de este género se ha asociado a sitios naturales y una menor abundancia a sitios con influencia de agua tratada, según análisis de

comunidades bacterianas en sistemas de agua superficial en Beijín.

Adicionalmente, un valor de abundancia alto (16 %) se ha asociado a una capacidad de absorber C y compuestos ricos en N a niveles bajos de oxígeno, según análisis de comunidades de un río en China (Zhang *et al.*, 2020b). Por lo tanto, que el género CL500_29 se posicione como uno de los más abundantes indica un buen estado de los sitios de estudio.

Por otro lado, el género *Limnohabitans* (3.53 %) se encontró en todos los sitios, es un género que ha sido reportado como omnipresente en ecosistemas de agua dulce, además, su mayor abundancia se ha asociado con sistemas de agua sin perturbación por contaminantes (Abia *et al.*, 2018; Hahn *et al.*, 2010). El género *Limnohabitans* junto con *Polynucleobacter* se consideran como los dos géneros más ampliamente distribuidos en agua dulce (Nuy *et al.*, 2020).

Aunque de manera global, se observa una distribución similar en todos los sitios, se observa una excepción acerca del género *Pseudarcicella*, el cual se encontró como el género predominante en canales, en una abundancia promedio del 18 % (C4 y C5); en cambio, en río no figuró como un género abundante (1.67 %). Este género pertenece al filo *Bacteroidetes*, de tal manera que contribuye a la alta abundancia encontrada de este filo en los sitios C4 y C5.

Pseudarcicella, es un género que se ha asociado con una mayor abundancia en ambientes altamente contaminados por nutrientes, por ejemplo por nitrógeno, según lo descrito por Yang *et al.* (2019), quienes además recomiendan a este género junto con *Limnohabitans*, *Flavobacterium*, *Limnobacter*, *Rhodoferrax*, *Zavarzinia*, *Pseudarcicella*, y *Pseudorhodobacter* como indicadores de remediación en el Río Songhua en China. Adicionalmente se ha reportado que cargas elevadas de nutrientes podrían favorecer el crecimiento de *Pseudarcicella* y *Flavobacterium*, lo que sugiere actividades antropogénicas y cercanía a zonas eutróficas (Li *et al.*, 2017).

En este caso, se conoce que los sitios C4 y C5 corresponden a canales de riego agrícola, por lo tanto una mayor carga de nutrientes es una condición esperada, de tal forma que la presencia de *Pseudarcicella* en estos sitios podría considerarse benéfico para el ecosistema, pues se sabe que este género está involucrado en reducción de nitrato; además, este taxón juega un papel vital en la defensa de la estructura y función de las comunidades ecológicas, según estudios en comunidades bacterianas de río (en abundancia de 7.1 %) (Zhang *et al.*, 2021).

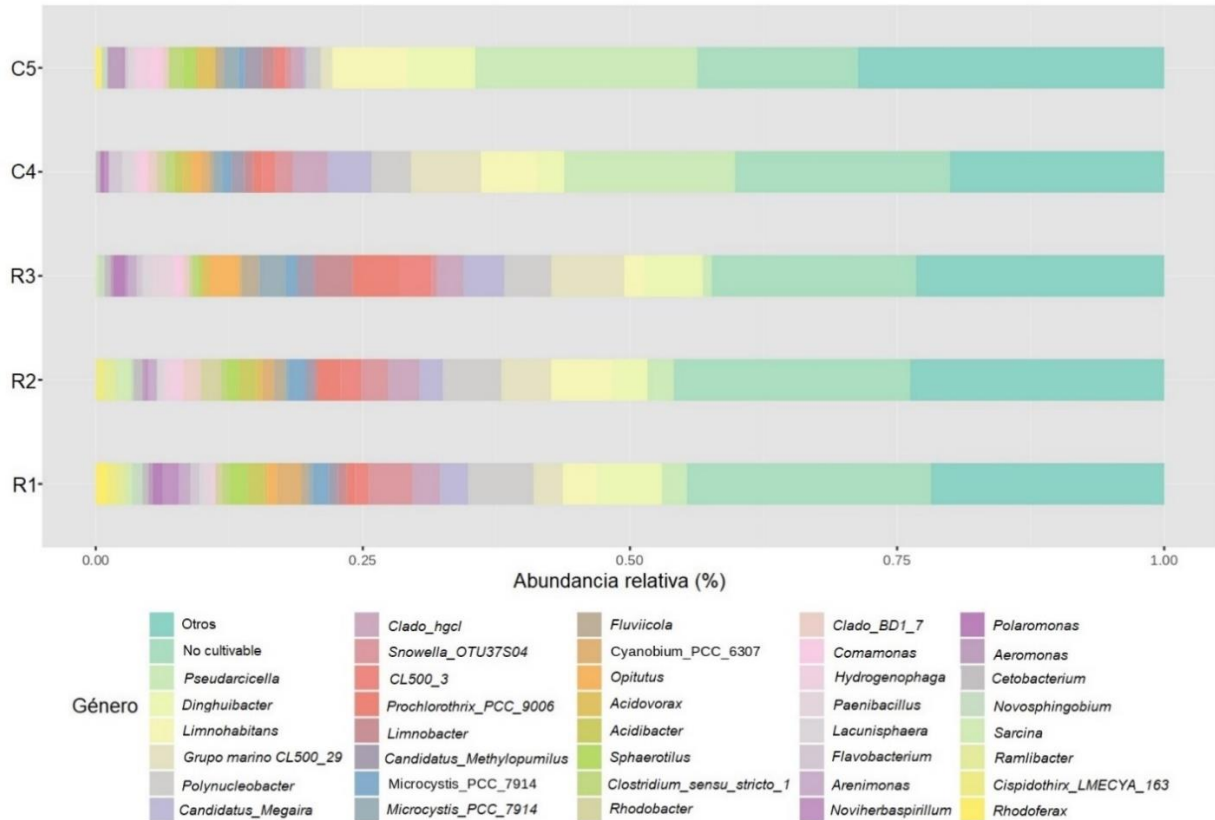


Figura 75. Gráfico de barras sobre la composición de la comunidad bacteriana a nivel género. Se muestran los 45 géneros más abundantes, en el grupo “otros” se agrupan géneros con una abundancia < 0.5 %.

6.3. Géneros Potencialmente Patógenos en Agua Superficial del Valle de Culiacán

Como resultado de la comparación entre los géneros bacterianos detectados en agua superficial, y una lista de 55 bacterias patógenas transmitidas por el agua (Urban *et al.*, 2021), se logró detectar presencia de 37 géneros potencialmente patógenos a lo largo de todos los sitios (Figura 16).

En los sitios R1, R2 y R3, se encontraron en promedio 35 de estos géneros, siendo los de mayor abundancia, *Aeromonas*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Legionella*, *Mycobacterium* y *Pseudomonas*. En cambio, en los sitios C4 y C5 se encontraron 34 géneros, siendo los más abundantes, *Clostridium sensu stricto 1*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Legionella*.

Aeromonas, se encontró en una abundancia de 1.09 % en río y 1.29 % en canal, una abundancia mayor a lo reportado en ríos sin impacto antropogénico (0.65 %) (Ibekwe *et al.*, 2016). *Aeromonas*

es un género típico de agua dulce, pero también es causante de enfermedades en humanos y animales, especialmente en peces (Baron *et al.*, 2017).

En este caso, se encontró una mayor abundancia de *Aeromonas* en canales de riego, lo que podría estar relacionada con los factores que favorecen su abundancia en agua, por ejemplo, agua estancada, alta turbidez y presencia de materia orgánica (Figueras y Ahbolt, 2019). *Aeromonas* se recupera con frecuencia en agua de riego, y también se han recuperado genotipos patógenos en perejil y tomate, lo que demuestra que el agua de riego es fuente probable de contaminación y supone un riesgo para la salud pública (Latif-Eugenin *et al.*, 2016; Latif-Eugenin *et al.*, 2015).

Acerca de *Clostridium sensu stricto 1*, se encontró como el primer género potencialmente patógeno en canales (2.68 %) y segundo lugar en río (1.08 %). Este género se ha asociado con la descomposición de sustratos producidos por la bacteria *Microcystis*, un género que se encuentra con frecuencia en agua dulce eutrófica, la cual además asocia con la producción de toxinas peligrosas para la salud humana y ecológica (Zhao *et al.*, 2017).

De hecho, en los sitios ubicados en el Río Culiacán se encontró presencia del género *Microcystis_PCC_7914* (1.32 %), que de acuerdo con la literatura, el conjunto de estos dos géneros se podría asociar con floración de algas nocivas. Por otra parte, se ha asociado a *Clostridium sensu stricto 1* con la degradación de materia orgánica en comunidades bacterianas de lagos y con fijación de N en el ambiente (Wiegel *et al.*, 2006), y es un género típico en aguas residuales y de heces humanas (Mueller-Spitz *et al.*, 2010). Por lo que, además de género potencialmente patógeno, algunos de sus miembros se relacionan con funciones importantes en el ecosistema.

En el caso *Legionella*, se presentó en una abundancia de 0.42 % en ríos y 0.65 % en canales. Otros autores han reportado una abundancia inferior en sitios naturales (0.022 %), y ausencia en canales de riego (Ibekwe *et al.*, 2016).

De la misma manera que *Aeromonas*, el género *Legionella* se considera ubicuo del agua dulce y suelo. Si bien, no todas las especies existentes de *Legionella* han sido aisladas de muestras clínicas, todas aquellas que han sido detectadas son consideradas patógenas para humanos (Mercante y Winchell, 2015). Por lo tanto, su presencia en agua podría representar un riesgo para la salud pública.

Mycobacterium, es un género considerado como saprófito en una amplia variedad de ambientes; por ejemplo, en el agua dulce. Sin embargo, algunas especies se conoce que son patógenas para humanos y animales debido a que causan enfermedades pulmonares y cutáneas. *Mycobacterium* es

un patógeno que normalmente se adquiere por ingesta, inoculación o inhalación en el ambiente y no de persona a persona, por lo tanto, las fuentes ambientales para la transmisión de esta bacteria podrían ser de gran relevancia (Le Dantec *et al.*, 2002).

Un río impactado por contaminantes urbanos, en Estados Unidos, se reportó a *Mycobacterium* en una abundancia de 0.005 % (Brown *et al.*, 2015), mientras que en agua de río sin impacto antropogénico se encontró en una abundancia 0.01 % (Ibekwe *et al.*, 2016). Por otro lado, Breton-Deval (2019), reportó 2 % de abundancia en sitios con menor impacto antropogénico y 7 % en sitios afectados por descarga de aguas residuales e industriales. Por lo tanto, se podría asumir que una mayor abundancia del género indica una menor calidad del agua superficial. En este caso, *Mycobacterium* se encontró en una abundancia de 0.41 % en río y 0.36 % en canales, abundancia mayor a lo reportado en sitios naturales, pero menores que en sitios altamente contaminados.

El género *Pseudomonas* se presentó en al menos una muestra de cada sitio, la mayoría con conteos > 200 lecturas, siendo una muestra del sitio C5 fue la de mayor número de lecturas (5,096) (Anexo 10.10). El género *Pseudomonas*, es considerado común en ecosistemas de agua dulce y algunas especies se asocian con actividades importantes en el ecosistema (biorremediación) (Tripathy *et al.*, 2007).

Por otro lado, algunos de los miembros del género *Pseudomonas* son importantes fitopatógenos o causantes de enfermedades humanas, donde se sabe que el agua dulce es la principal fuente de infección, pues hay un fuerte vínculo entre aislados ambientales y clínicos (Pereira *et al.*, 2018).

Se ha descrito que mediante análisis del gen 16S el género *Pseudomonas* sólo se detecta ocasionalmente o no es detectado (Ibekwe *et al.*, 2016; Reza *et al.*, 2018); sin embargo, en este caso se identificó en todos los sitios. De la misma manera, un estudio metagenómico del gen 16S completo en río, se reporta al género como uno de los más abundantes entre posibles patógenos, con un promedio de 50 lecturas y un máximo de 100 (Urban *et al.*, 2021).

Adicionalmente, en ríos con zonas catalogadas como ligeramente contaminadas y altamente contaminadas, se identificó a este género en 0.85 % y 2.17 % respectivamente, correlacionado con cambios en la calidad de aguas superficiales, por lo que se ha propuesto como bioindicador (Yang *et al.*, 2019).

En el sitio C5 se encontró una abundancia de 2.43 %, similar a lo reportado en sitios altamente contaminados, mientras que el resto de los sitios representó una abundancia menor. El porcentaje de abundancia de este género es importante ya que además de representar riesgo para humanos y cultivos, su presencia puede indicar una mala calidad del agua (English *et al.*, 2018; Batrich *et al.*,

2019).

Por otra parte, fue posible identificar secuencias asociadas a los géneros *Salmonella* y *Escherichia*, además de secuencias del género *Enterococcus*. Para *Escherichia* y *Salmonella* se encontraron abundancias muy bajas de, 0.01 % (conteos de 0-50 lecturas, Anexo 10.10) y 0.04 % (conteos de 0-253 lecturas, Anexo 10.10), respectivamente. El número de secuencias identificadas por ambos géneros fue mayor a lo reportado recientemente por Urban y colaboradores (2021), para *Escherichia* < 100 lecturas y *Salmonella* < 10, de acuerdo a un análisis de comunidades bacterianas del Río Cam. Por otro lado, los conteos y abundancias son menor a lo reportado por Dutra *et al.* (2016), para *Escherichia* (7.86 %) y *Salmonella* (2.04 %), en comunidades de agua superficial de un río urbano clasificado como altamente contaminado.

Salmonella, junto con *Vibrio*, fueron reconocidos como los primeros patógenos transmitidos por el agua. *Salmonella* spp se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal de animales domésticos y silvestres (Some *et al.*, 2021), por lo que la contaminación con heces en los ecosistemas acuáticos podría estar relacionado con la incidencia de esta bacteria.

En el Valle de Culiacán, se han reportado altas concentraciones de Coliformes fecales y prevalencia de *Salmonella* en el Río Culiacán y canales de riego agrícola (Arce-Navarro *et al.*, 2021; López-Cuevas *et al.*, 2009; Jiménez-Edeza y Chaidez, 2012). Adicionalmente, se ha aislado a *Salmonella* de heces animales dentro de la misma región (Jiménez-Edeza *et al.*, 2011). En consecuencia, la presencia de secuencias del gen ARNr 16S perteneciente a este género podría atribuirse a su cercanía con posibles fuentes contaminantes, ya que en todos los sitios de recolección de muestras se identificaron animales de traspatio cercanos.

De la misma manera, se identificaron secuencias asociadas al género *Escherichia*, incluso gran parte de los sitios donde se encontraron mayor número de secuencias de *Salmonella* coincide con recuentos altos de *Escherichia*. Estas dos bacterias contribuyen con enfermedades transmitidas por agua o alimentos, aunque se sabe que se subestima la incidencia de otros patógenos. En parte, podría ser ocasionado por falta de implementación de metodologías que permitan establecer etiología de una infección, tomando en cuenta distintos patógenos (Rusiñol *et al.*, 2020).

Aunque se encontró una baja abundancia de ambos géneros, se identificaron en por lo menos una muestra de cada sitio. Pese a que en algunos sitios no se identificaron secuencias de estos géneros, su ausencia no podría asegurar que no se encuentren presentes en el medio, sino que puede verse relacionado con el poder discriminativo de la técnica.

En ese sentido, se ha reportado ausencia de ciertos géneros en agua superficial. Por ejemplo, el género *Enterococcus* no fue detectado en estudios metagenómicos del 16S (región V1-V2), pese a haber sido identificado en altas concentraciones en medios de cultivos (Ibekwe *et al.*, 2016); incluso los autores reportaron que en los sitios con mayores conteos *Enterococcus* no fue posible detectar a tal género, así como tampoco secuencias asociadas a otros patógenos comunes como *Escherichia* y *Salmonella*, en cambio, se detectó la presencia de otros 13 géneros potencialmente patógenos.

De la misma manera, Hamner *et al.* (2019), identificaron a *E. coli* en medios de cultivo selectivos, sin embargo, en resultados metagenómicos (genomas completos) de agua superficial el género no fue detectado, los autores lo atribuyen a la gran abundancia y diversidad de microorganismos presentes que no eran *E. coli*.

Los estudios mencionados nos indican que algunos enfoques metagenómicos tienen limitantes para detectar o discriminar entre taxones menos abundantes. Por lo tanto, se resalta la importancia del uso del gen 16S completo y de establecer límites de detección, al menos para taxones bacterianos de mayor interés en la salud pública.

En relación al número de patógenos encontrados, se identificó un total de 37; mientras que otros autores han reportado 15 géneros patógenos en un río de la ciudad de Beijín, China (Jin *et al.*, 2018). Reza *et al.* (2018), reportaron 7 géneros patógenos, en el Río Tama en Japón y, Huang y colaboradores (2021), reportaron 12 géneros potencialmente patógenos en una abundancia menor al 0.1 %.

Es importante resaltar que para tales estudios se utilizó una región del gen 16S (V1-V2, V4-V5 o V3-V4), y se conoce que el uso de una región u otra del gen 16S puede ofrecer una discriminación limitada durante asignación taxonómica (Johnson *et al.*, 2019), lo que podría ocasionar una menor resolución, y por lo tanto, que menor número de patógenos sean identificados. Recientemente, Urban *et al.*, (2021), reporta la presencia de 21 géneros patógenos con un máximo de 1000 lecturas y abundancias menores al 3 % en un río urbano según análisis del 16S completo.

Por lo tanto, se observa una mayor a riqueza de géneros potencialmente patógenos en comparación con lo reportado por otros autores; sin embargo, tomando en cuenta la abundancia de la mayoría de estos géneros, se considera una menor abundancia de bacterias patógenas que en sitios altamente contaminados (abundancias 1 a 7 %) (Breton-Deval *et al.*, 2019; Dutra *et al.*, 2016).

Por lo antes mencionado, podríamos asegurar que los géneros patógenos asociados a transmisión

por el agua están distribuidos en todos los sitios de muestreo. Pero sus abundancias se asocian más con lo que otros autores han reportado en sitios ligeramente perturbados o no perturbados. Sumado a ello, se encontraron géneros relacionados con una “buena salud” del ecosistema. Por ejemplo, *Limnohabitans* y *Polynucleobacter* fueron dos de los géneros más abundantes en la mayoría de las muestras. Cabe resaltar que en río se presentaron en mayor abundancia que en canales, lo que podría atribuirse a una menor calidad del agua ocasionada por mayor carga de nutrientes, pues se sabe que es un factor que modifica la conformación de comunidades bacterianas.

En los sitios C4 y C5, la alta abundancia de *Pseudarcicella* y el género *Pseudomonas* indican una menor calidad del agua, sin embargo, la presencia de estos géneros podría estar relacionados con biorremediación del ecosistema; por lo tanto, su presencia podría considerarse benéfica.

Un enfoque metagenómico del gen 16S completo supone ser una técnica importante para el monitoreo de microorganismos patógenos y no patógenos en agua, y se podría esperar que a medida que los dispositivos de secuenciación continúen desarrollándose y sean más asequibles, la vigilancia en tiempo real de patógenos transmitidos por el agua se convierta en una técnica de monitoreo común. Es importante resaltar que existe la necesidad de tomar en cuenta características específicas de la zona de estudio, como parámetros físicos y químicos del agua, así como temporalidad y fuentes de contaminación, que permitan un mejor entendimiento tanto de las comunidades benéficas de los ecosistemas como de las bacterias patógenas.

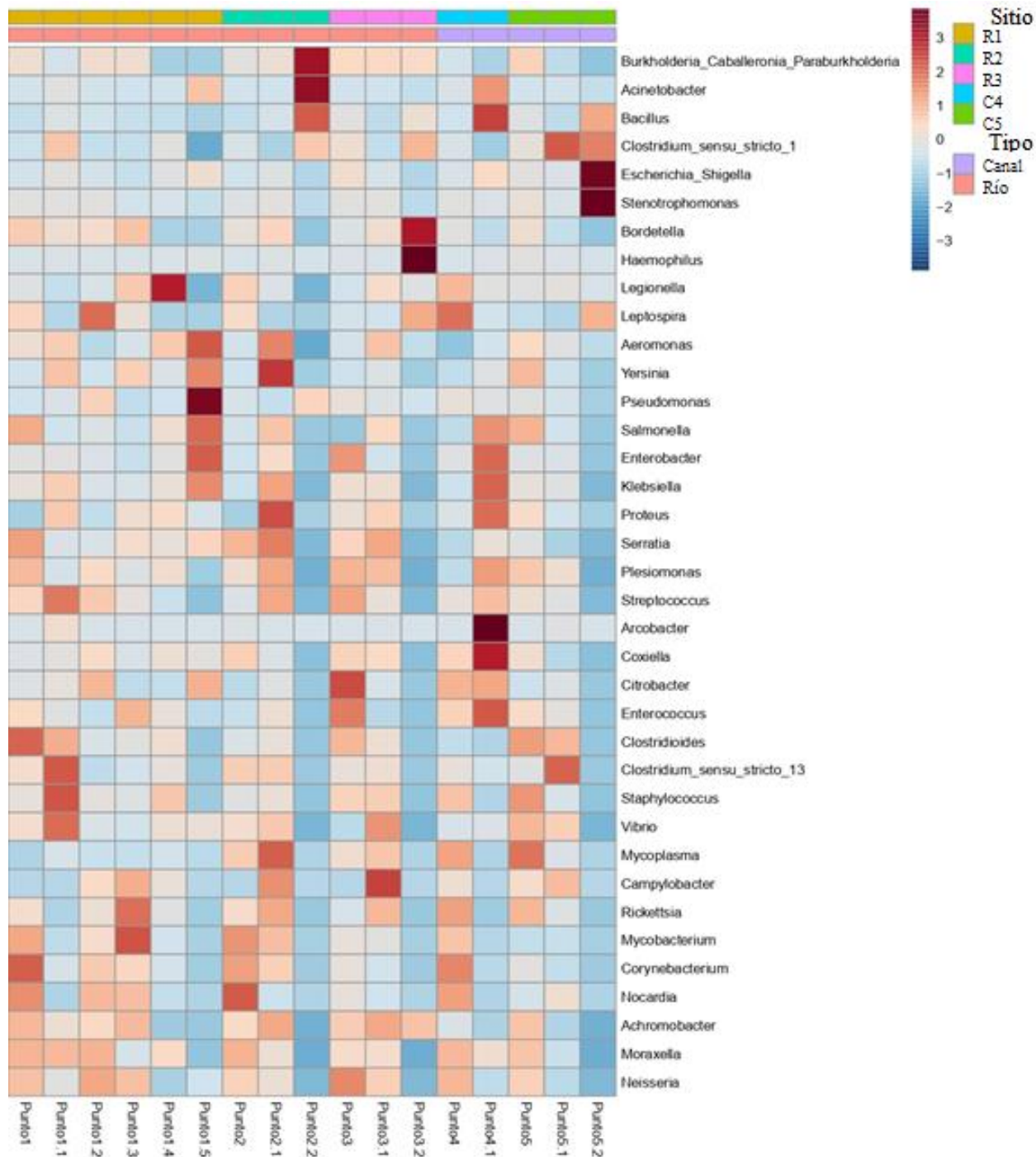


Figura 86. Mapa de calor sobre la abundancia relativa de OTUs asociados a patógenos para humanos, presentes en agua superficial del Valle de Culiacán. Se consideran OTUs con una prevalencia mínima de 10 % en todas las muestras y un conteo mínimo de 4 lecturas. La barra de colores superior indica los sitios, seguido por una barra de clasificación por tipo de muestra y, en la parte inferior se indica sitio y número de muestra.

7. CONCLUSIONES

El análisis de la estructura de las comunidades bacterianas indicó que existe una mayor riqueza y diversidad en los sitios sobre el Río de Culiacán. Sin embargo, según el análisis de coordenadas principales, los sitios tuvieron una composición de comunidades bacterianas similar, lo cual concuerda con el perfilamiento de la comunidad, donde se encontró predominancia de 3 filos bacterianos, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* en todos los sitios. También se demuestra la presencia de géneros que contribuyen a una buena salud del ecosistema, como *Dinghuibacter*, *Polynucleobacter*, *CL_500_29* y *Limnohabitans*, resaltando la presencia del género *Pseudarcicella* y *Pseudomonas* en canales de riego, lo que en un contexto ecológico indica actividades de biorremediación, influenciado por una posible mayor carga de nutrientes en esos sitios. Los resultados de este análisis demuestran la presencia de 37 géneros bacterianos potencialmente patógenos y que frecuentemente se asocian con transmisión por agua, entre ellos *Aeromonas*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Legionella*, *Mycobacterium* y *Pseudomonas* se identificaron en todos los sitios. Adicionalmente, se encontraron secuencias relacionadas con *Salmonella* y *Escherichia*. Estos resultados nos otorgan una mejor comprensión de la ecología de aguas superficiales de la zona del Valle de Culiacán, lo que representa el primer esfuerzo por conocer las comunidades bacterianas que se encuentran en la zona de estudio.

8. RECOMENDACIONES

- Continuar los monitores bacterianos a través del 16S completo y la plataforma Oxford Nanopore Technologies. Además un análisis en conjunto con la medición de parámetros fisicoquímicos e indicadores de contaminación biológica.
- Comparar las comunidades microbianas en zonas libres de “áreas urbanas” vs “con impacto de zonas urbanas”.
- Establecer límites de detección para géneros bacterianos de interés en la salud pública y de interés agrícola.

9. REFERENCIAS

- Abia A. L. K., Alisoltani A., Keshri J. y Ubomba-Jaswa, E. 2018. Metagenomic analysis of the bacterial communities and their functional profiles in water and sediments of the Apies River, South Africa, as a function of land use. *Science of the Total Environment*. 616–617: 326–334.
- Acharya K., Blackburn A., Mohammed J., Tamiru-Haile A., Mekonnen-Hiruy A. y Werner D. 2020. Metagenomic water quality monitoring with a portable laboratory. *Water research*. 184: 116112.
- Ahmad T., Gupta G., Sharma A., Kaur B., El-Sheikh M. A. y Alyemeni M. N. 2021. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of bacterial communities of a Himalayan urban fresh water lake. *PLoS ONE*. 16(3 March): e0248116.
- Ahmed W. 2007. Limitations of library-dependent microbial. *Journal of the Australian Water Association*. 39: 2007.
- Ahmed W., Staley C., Hamilton K. A., Beale D. J., Sadowsky M. J., Toze S. y Haas C. N. 2017. Amplicon-based taxonomic characterization of bacteria in urban and peri-urban roof-harvested rainwater stored in tanks. *Science of the Total Environment*. 576: 326–334.
- Ahmed W., Staley C., Sadowsky M. J., Gyawali P., Sidhu J., Palmer A., Beale D. J. & Toze S. 2015. Toolbox approaches using molecular markers and 16S rRNA gene amplicon data sets for identification of fecal pollution in surface water. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(20): 7067–7077.
- Ahumada-Santos Y., Báez-Flores M., Díaz-Camacho S., Uribe-Beltrán M., López-Angulo G., Vega-Aviña R., Chávez-Duran F., Montes-Avila J., Carranza-Díaz O., Möder M., Kusch P. & Delgado-Vargas F. 2014. Spatiotemporal distribution of the bacterial contamination of agricultural and domestic wastewater discharged to a drainage ditch (Sinaloa, Mexico). *Ciencias Marinas*. 40(4): 277–289.
- Arce-Navarro K. S., Castañeda-Ruelas G. M., Romero-Quintana J. G., Rendon-Maldonado J. G., Leon-Sicairos C. R. y Jiménez-Edeza M. 2021. Faecal bacterial contamination of rivers: Evolution, suitability, and health risk implications for recreational use. *Water and Environment Journal*. 35(4): 1325–1336.
- Balasubramanian A. 2016. River as an Ecosystem (Issue August 2005).
- Balsega A. & Gómez-Rodríguez C. 2019. Diversidad alfa, beta y gamma: ¿cómo medimos diferencias entre comunidades biológicas?. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*. 26: 39–45.
- Barberán A., Casamayor E. O. 2010. Global phylogenetic community structure and β -diversity patterns in surface bacterioplankton metacommunities. *Aquat Microb Ecol*. 59: 1–10.
- Baron S., Granier S. A., Larvor E., Jouy E., Cineux M., Wilhelm A., Gassilloud B., Bouquin S., Le Kempf I. and Chauvin C. 2017. *Aeromonas* diversity and antimicrobial susceptibility in freshwater-An attempt to set generic epidemiological cut-off values. *Frontiers in*

Microbiology. 8(MAR): 503.

- Barrera-Bernal C., Domínguez-Barrera C y Guzmán-Guillermo J. 2020. Agua y salud en México: patógenos y legislación. En: Marroquín A., Olivares J., Cruz L., y Bautista A. Biología. Handbooks-ECORFAN-México, Querétaro, 62–76 pp.
- Batrach M., Maskeri L., Schubert R., Ho B., Kohout M., Abdeljaber M., Abuhasna A., Kholoki M., Psihogios P., Razzaq T., Sawhney S., Siddiqui S., Xoubi E., Cooper A., Hatzopoulos T. and Putonti C. 2019. *Pseudomonas* diversity within urban freshwaters. *Frontiers in Microbiology*. 10(FEB): 195.
- Baureder M. y Hederstedt L. 2013. Heme Proteins in Lactic Acid Bacteria. En: Poole R.K. *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, Cambridge, 1-43 pp.
- Battista J. R. 2016. *Deinococcus Thermus* Group. eLS. 1–12.
- Beeby M. 2015. Motility in the epsilon-proteobacteria. En: Martin S., y Kearns D. *Growth and development: eukaryotes and prokaryotes*. *Current Opinion in Microbiology*, Amsterdam, 115–121 pp.
- Ben Said M., Masahiro O. y Hassen A. 2010. Detection of viable but non cultivable *Escherichia coli* after UV irradiation using a lytic Q β phage. *Annals of Microbiology*. 60(1): 121.
- Benítez-Páez A., Portune K. J. and Sanz Y. 2016. Species-level resolution of 16S rRNA gene amplicons sequenced through the MinION™ portable nanopore sequencer. *GigaScience*. 5(1).
- Berman J. J. 2019. Bacteria. En: Berman J. J. *Taxonomic Guide to Infectious Diseases* (second edition). Academic Press, Cambridge, 39–119 pp.
- Bernhard A. E. y Field K. G. 2000. A PCR Assay To Discriminate Human and Ruminant Feces on the Basis of Host Differences in Bacteroides-Prevotella Genes Encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(10): 4571–4574.
- Bharagava R. N., Purchase D., Saxena G., Mulla S. I. 2019. Applications of Metagenomics in Microbial Bioremediation of Pollutants. En: Das S., y Ranjan D. H. *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Academic press, Cambridge 459–477 pp.
- Bhattaru S. A., Tani J., Saboda K. N., Borowsky J. H., Ruvkun G., Zuber M., Carr C. 2019. Development of a Nucleic Acid-Based Life Detection Instrument Testbed. *Aerospace Conference*. 2019: 1-10.
- Boehm A. B., Van De Werfhorst L. C., Griffith J. F., Holden P. A., Jay J. A., Shanks O. C., Wang D., Weisberg S. B. 2013. Performance of forty-one microbial source tracking methods: A twenty-seven lab evaluation study. *Water Research* 47(18): 6812–6828.
- Bourhane Z., Lanzén A., Cagnon C., Ben Said O., Mahmoudi E., Coulon F., Atai E., Borja A., Cravo-Laureau C. y Duran R. 2021. Microbial diversity alteration reveals biomarkers of contamination in soil-river-lake continuum. *Journal of Hazardous Materials*. 421(July 2021): 126789.
- Bravo L., Saldaña P., Mijangos J. y Izurieta M. 2013. La importancia de la contaminación difusa en México y en el mundo. *El portal del agua desde México*. 1–10.
- Breitwieser F. P. and Salzberg S. L. 2020. Pavian: Interactive analysis of metagenomics data for

- microbiome studies and pathogen identification. *Bioinformatics*. 36(4): 1303–1304.
- Breton-Deval L., Sanchez-Flores A., Juárez K., y Vera-Estrella R. 2019. Integrative study of microbial community dynamics and water quality along The Apatlaco River. *Environmental Pollution*. 255: 113158.
- Brown B.L., LePrell RV, Franklin R.B., Rivera M.C., Cabral F.M., Eaves H.L., Gardiakos V., Keegan K.P., and King TL. 2015. Metagenomic analysis of planktonic microbial consortia from a non-tidal urban- impacted segment of James River. *Stand Genom Sci*. 10:65–78.
- Bryant D. A. 2019. Phototrophy and phototrophs. En: Schmidt M.T. *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, Cambridge, 527–537 pp.
- Bukin Y. S., Galachyants Y. P., Morozov I. V., Bukin S. V., Zakharenko A. S. & Zemskaya T. I. 2019. The effect of 16s rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*. 6: 1–14.
- Byappanahalli M. N., Nevers M. B., Korajkic A., Staley Z. R. and Harwood V. J. 2012. *Enterococci* in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76(4): 685–706.
- Carrier V., Svenning M. M., Gründger F., Niemann, H., Dessandier, P. A., Panieri, G. and Kalenitchenko, D. 2020. The Impact of Methane on Microbial Communities at Marine Arctic Gas Hydrate Bearing Sediment. *Frontiers in Microbiology*. 11: 1932.
- Carrillo Jovel, V. H. 2019. Caracterización de la estructura de la comunidad de microorganismos en cuerpos de agua dulce del norte de la Península de Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., Yucatán, México.
- Castañeda-Ruelas G. M. y Jiménez-Edeza M. 2018. Evaluación de ríos del valle de Culiacán, México, como reservorios de serotipos de *Salmonella* resistentes a antibióticos. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*. 34(2): 191–201.
- CDC. (2021). *Illness and Symptoms: Cyanobacteria in Fresh Water | Harmful Algal Blooms | CDC*. Estados Unidos: www.cdc.gov. Recuperado de <https://www.cdc.gov/habs/illness-symptoms-freshwater.html>.
- Chao A. and Jost L. 2012. Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology*. 93(12): 2533-2547.
- Chin D. A. 2010. Linking pathogen sources to water quality in small urban streams. *Journal of Environmental Engineering*. 136(2): 249–253.
- Chong J., Liu P., Zhou G. and Xia, J. 2020. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols*. 15(3) 799–821.
- Clark D., Pazdernik N. y McGehee M. 2019. DNA Sequencing. En: Clark D., Pazdernik N. y McGehee, M. *Molecular Biology (3ra Ed)*. Academic Cell, Cambridge, 240–269 pp.
- Clokic M. R., Millard A. D., Letarov A. V and Heaphy S. 2011. Phages in nature. *Bacteriophage*. 1(1): 31–45.
- CODESIN. (2019). Sinaloa en números. www.codesin.mx. Recuperado de <https://sinaloaennumeros.codesin.mx/wp-content/uploads/2019/07/Brief-Agricultura-en-Sinaloa-2018.pdf>

- CONAGUA. 2002. Normas Oficiales Mexicanas, NOM-001-SEMARNAT-1996, NOM-002-SEMARNAT-1996, NOM-003-SEMARNAT-1996. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Ciudad de México. 66 p.
- CONAGUA. 2012. Agenda del Agua 2030. Avances y logros 2012. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Edición 2011, Ciudad de México. 66 p.
- CONAGUA. 2015. Monitoreo de calidad del agua. México. Recuperado de https://www.gwp.org/Global/GWP-SAM_Files/Publicaciones/Varios/2011-PROTOCOLO-ANAPeru.pdf/nhttp://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/13504/1/ArangoMendozaJulianAndres2014.pdf/nhttp://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd54.
- CONAGUA. 2018. Estadísticas del agua en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Edición 2018, Ciudad de México. 303 p.
- CONAGUA. 2021. *Calidad del agua en México*. Calidad Del Agua. México. Recuperado de <https://www.gob.mx/conagua/articulos/calidad-del-agua>
- Cother E. 2001. Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. Australasian Plant Pathology. 30(1): 77.
- Coutinho T. A. and Venter S. N. 2009. *Pantoea ananatis*: An unconventional plant pathogen. Molecular Plant Pathology. 10(3): 325–335.
- Croxen M. A. and Finlay B. B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nature Reviews Microbiology. 8(1):26–38.
- Crump B. C., Kling G. W., Bahr, M. and Hobbie J. E. 2003. *Bacterioplankton* Community Shifts in an Arctic Lake Correlate with Seasonal Changes in Organic Matter Source. 69(4): 2253–2268.
- Dean S.N., Rimmer M.A., Turner K.B., Phillips D.A., Caruana J.C., Hervey IV W.J., Leary D.H. and Walper S.A. 2020. *Lactobacillus acidophilus* Membrane Vesicles as a Vehicle of Bacteriocin Delivery. Front. Microbiol. 11: 1-14.
- De Coster W., D’Hert S., Schultz D. T., Cruets M. y Van Broeckhoven, C. 2018. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. Bioinformatics. 34(15): 2666–2669.
- Devane M. L., Moriarty E., Weaver L., Cookson A. and Gilpin B. 2020. Fecal indicator bacteria from environmental sources; strategies for identification to improve water quality monitoring. Water Research. 185: 116204.
- Dhar B. C. & Lee N. Y. 2018. Lab-on-a-Chip Technology for Environmental Monitoring of Microorganisms. Biochip Journal. 12(3): 173–183.
- Dick G. J., Lee Y. E. and Tebo B. M. 2006. Manganese(II)-oxidizing *Bacillus* spores in Guaymas basin hydrothermal sediments and plumes. Applied and Environmental Microbiology. 72(5): 3184–3190.
- Dokulil M. T. & Teubner K. 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. Hydrobiologia. 438(1): 1–12.
- Dutra J., Cantão M. E., Cesar D. E., Nicolás M. F., Diniz C. G., Silva V. L., Vasconcelos A. T. R. & Coelho C. M. 2016. Comparative metagenome of a stream impacted by the urbanization phenomenon. Brazilian Journal of Microbiology. 47(4), 835–845.

- Edge T. A., Baird D. J., Bilodeau G., Gagné N., Greer C., Konkin D., Newton G., Séguin A., Beaudette L., Bilkhu S., Bush A., Chen W., Comte J., Condie J., Crevecoeur S., El-Kayssi N., Emilson E. J. S., Fancy D. L., Kandalafi I. y Macklin J. 2020. The Ecobiomics project: Advancing metagenomics assessment of soil health and freshwater quality in Canada. *Science of the Total Environment*. 710: 135906.
- Efron S. T., Aquino J., De Cabo, L., Dos Santos A. M. & Graziano M. 2014. Evaluación de la capacidad de auto-depuración de un arroyo urbano y el uso de macrófitas nativas como estrategia de restauración. *Biología Acuática*. 30(5): 275–285.
- English E. L., Schutz K. C., Willsey G. G. y Wargo M. J. 2018. Transcriptional responses of *Pseudomonas aeruginosa* to potable water and freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*. 84(6): e02350-17.
- Escalante A. E. 2008. Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas. En: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. *Ecología Molecular*. MARC, México, 393–424 pp.
- Ettoumi B., Guesmi A., Brusetti L., Borin S., Najjari A., Boudabous A. and Cherif A. 2013. Microdiversity of Deep-Sea Bacillales Isolated from Tyrrhenian Sea Sediments as Revealed by ARISA, 16S rRNA Gene Sequencing and BOX-PCR Fingerprinting. *Microbes and Environments*. 28(3): 361.
- Falkowski P. G., Fenchel T. y Delong E. F. 2008. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science*. 320(5879): 1034–1039.
- Fedor P. J. 2013. Shannon-Wiener Index. En: Fedor P. J. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier, Ámsterdam, 1–4 pp.
- Fenchel T., King G. M., Blackburn T. H. 2012. Microbial Biogeochemical Cycling and the Atmosphere. *Bacterial Biogeochemistry*. 183–219.
- Field K. G., Samadpour M. 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Research*. 41(16): 3517–3538.
- Figueroa M. J and Ashbolt N. 2019. *Aeromonas*. En: JB Rose y B. Jiménez-Cisneros. *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project). Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiology Aspects - Section 2: Bacteria*. Michigan State University, Lansing, MI, pp.
- Flemming H. and Wuertz S. 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. 17: 247–260.
- Fortunato C. S., & Crump B. C. 2011. Bacterioplankton Community Variation Across River to Ocean Environmental Gradients. *Microbiology of Aquatic Systems*. 62: 374–382.
- Fournier I. B., Lovejoy C. and Vincent W. F. 2021. Changes in the Community Structure of Under-Ice and Open-Water Microbiomes in Urban Lakes Exposed to Road Salts. *Frontiers in Microbiology*. 12: 655.
- Fujiyoshi S., Muto-Fujita A. & Maruyama F. 2020. Evaluation of PCR conditions for characterizing bacterial communities with full-length 16S rRNA genes using a portable nanopore sequencer. *Nature*. 10 (1): 1-10.

- Furukawa T. and Suzuki Y. 2013. A Proposal for Source Tracking of Fecal Pollution in Recreational Waters by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Microbes and Environments*. 28(4): 444–449.
- Fusco V., Abriouel H., Benomar N., Kabisch J., Chieffi D., Cho G.-S., y Franz, C. M. A. P. 2018. Opportunistic Food-Borne Pathogens. *Food Safety and Preservation*. 269–306.
- García-Moreno J., Harrison I., Dudgeon D., Clausnitzer V., Darwall W., Farrel T., Savy C., Tockner K. and Tubbs N. 2014. The global water system in the anthropocene: Challenges for science and governance. En: A. Bhaduri, J. Bogardi, J. Leentvaar., S. Marx. *The Global Water System in the Anthropocene: Challenges for Science and Governance*. Springer, New York, 247–270 pp.
- Geldreich E. E. 1996. Pathogenic agents in freshwater resources. *Hydrological Processes*. 10(2): 315–333.
- Ghaju Shrestha R., Tanaka Y., Malla B., Bhandari D., Tandukar S., Inoue, D., Sei, K., Sherchand J. B., Haramoto E. 2017. Next-generation sequencing identification of pathogenic bacterial genes and their relationship with fecal indicator bacteria in different water sources in the Kathmandu Valley, Nepal. *Science of The Total Environment*. 601–602: 278–284.
- Ghosh A., Mehta, A. y Khan, A. M. 2019. Metagenomic analysis and its applications. En: Ranganathan S., Gribskov M., Nakai K., y Schönbach C. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*. Academic Press, Cambridge, 184–193 pp.
- Gilbert J. A., Neufeld J. D. 2014. Life in a World without Microbes. *PLoS Biology*. 12(12): 1–3.
- González Acosta A., del Pozo Núñez E. M., Galván Piña B., González Castro A. y González Cárdenas J. C. 2006. Biological and physical barriers as control alternative of whitefly (*Bemisia* spp.) in eggplant (*Solanum melongena* L.) at the Culiacan Valley, Sinaloa, México. *Revista Científica UDO Agrícola*. 6(1): 76–83.
- Hahn M. W., Kasalický V., Jezbera J., Brandt U., Jezberová J. and Šimek K. 2010. *Limnohabitans curvus* gen. nov., sp. nov., a planktonic bacterium isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60(6): 1358–1365.
- Hamner S., Brown B. L., Hasan N. A., Franklin M. J., Doyle J., Eggers M. J., Colwell R. R. and Ford T. E. 2019. Metagenomic profiling of microbial pathogens in the little bighorn river, Montana. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 16(7).
- Hofer U. 2013. Bacterial evolution: Getting to the bottom of *Cyanobacteria*. *Nature Reviews Microbiology*. 11(12): 818–819.
- Huang H., Liu J., Zhang F., Zhu K., Yang C., Xiang Q. and Lei B. 2021. Characteristics of planktonic and sediment bacterial communities in a heavily polluted urban river. *PeerJ*. 9: e10866.
- Ibekwe A. M., Ma J. & Murinda S. E. 2016. Bacterial community composition and structure in an urban river impacted by different pollutant sources. *Science of the Total Environment*. 566–567: 1176–1185.
- INAFED. 2020. Medio Físico - Sinaloa. *Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México*. Recuperado de

<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM25sinaloa/mediofisico.html>.

- Jain M., Koren S., Miga K. H., Quick J., Rand A. C., Sasani T. A., Tyson J. R., Beggs A. D., Dilthey A. T., Fiddes I. T., Malla S., Marriott H., Nieto T., O'Grady J., Olsen H. E., Pedersen B. S., Rhie A., Richardson H., Quinlan A. R. y Loose M. 2018. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature Biotechnology*. 36(4), 338–345.
- Jang J., Hur H.-G., Sadowsky M. J., Byappanahalli M. N., Yan T. and Ishii S. 2017. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*. 123(3): 570–581.
- Jezberová J., Jezbera J., Brandt U., Linstrom E.S., Langenheder S. and Hahn M.W. 2010. Ubiquity of *Polynucleobacter necessarius* subsp. *asymbioticus* in lentic freshwater habitats of a heterogenous 2000 km² area. *Environ microbiol*. 12(3): 658-669.
- Jiménez-Edeza M. & Chaidez C. 2012. Improving *Salmonella* determination in Sinaloa rivers with ultrafiltration and most probable number methods. *Environmental Monitoring and Assessment*. 184(7): 4271–4277.
- Jiménez-Edeza M., Martínez-Urtaza J. y Chaidez C. 2011. Geographical and Temporal Dissemination of *Salmonellae* Isolated from Domestic Animal Hosts in the Culiacan Valley, Mexico. *Microbial Ecology*. 61(4): 811–820.
- Jiménez-Edeza M., Martínez-Urtaza J., Rodríguez-Alvarez M. X., Leon-Felix J. and Chaidez C. 2014. Prevalence and genetic diversity of *Salmonella* spp. in a river in a tropical environment in Mexico. *Journal of Water and Health*. 12(4): 874–884.
- Jin D., Kong X., Cui B., Jin S., Xie Y., Wang X. & Deng Y. 2018. Bacterial communities and potential waterborne pathogens within the typical urban surface waters. *Scientific Reports*. 8(1): 1–9.
- Johnson J. S., Spakowicz D. J., Hong B.-Y., Petersen L. M., Demkowicz P., Chen L., Leopold S. R., Hanson B. M., Agresta H. O., Gerstein M., Sodergren E. & Weinstock G. M. 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*. 10(1): 1–11.
- Kayman T., Abay S., Hizlisoy H., Ibrahim Atabay H., Serdar Diker K. and Aydin F. 2012. Emerging pathogen *Arcobacter* spp. in acute gastroenteritis: Molecular identification, antibiotic susceptibilities and genotyping of the isolated arcobacters. *Journal of Medical Microbiology*. 61(PART 10): 1439–1444.
- Kerstens K., De Vos P., Gillis M., Swings J., Vandamme P. and Stackebrandt E. 2006. Introduction to the *Proteobacteria*. En: Martin D., Stanley F., Rosenberg E., Schleifer K. H., y Stackebrandt E. *The Prokaryotes*. Springer, New York, 3-37 pp.
- Kim D., Song L., Breitwieser F. P. and Salzberg S. L. 2016. Centrifuge: Rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Research*. 26(12): 1721–1729.
- Kirchman D. L. 2002. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*. 39(2): 91–100.
- Knights D., Kuczynski J., Charlson E. S., Zaneveld J., Mozer M. C., Collman R. G., Bushman F. D., Knight R. & Kelley S. T. 2011. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nature Methods*. 8(9): 761–765.

- Krauss S. and Griebler G. 2016. Pathogenic Microorganisms and Viruses in Groundwater Steffen Krauss and Christian Griebler acatech Materialien – Nr . 6 ,, Geoessource Wasser – Herausforderung Globaler Wandel”. Deutsche Akademie der Technikwissenschaften.
- Larrea-Murrell J. A., Rojas-Badía M. M., Romeu’Álvarez B., Rojas-Hernández N. y Heydrich-Pérez M. M. 2013. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de calidad de las aguas. CENIC. 44: 24–34.
- Lasken R. & McLean J. 2014. Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells. *Nat Rev Genet.* 176(1): 139–148.
- Latif-Eugenin F., Beaz-Hidalgo R. and Figueras, M.J. 2016. Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas* spp. from water and shellfish samples. *Journal of Applied Microbiology.* 121: 883-891.
- Latif-Eugenin F. (2015). *Aeromonas*, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal. Tesis (doctorado). Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, España.
- Lauber C. L., Hamady M., Knight R. and Fierer N. 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology.* 75(15): 5111–5120.
- Le Dantec C., Duguet J. P., Montiel A., Dumoutier N., Dubrou S. and Vincent V. 2002. Occurrence of Mycobacteria in Water Treatment Lines and in Water Distribution Systems. *Applied and Environmental Microbiology.* 68(11): 5318.
- Leff L. G. 2019. Freshwater habitats. En: Schmidt T.M. *Encyclopedia of Microbiology.* Academic Press, Cambridge, 300–314 pp.
- Legendre P. 2013. Indicator Species: Computation. En: Levin S.A. *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition.* Academic Press, Cambridge, 264–268 pp.
- Li Z., Lu L., Guo J., Yang J., Zhang J., He B. & Xu L. 2017. Responses of spatial-temporal dynamics of bacterioplankton community to large-scale reservoir operation: a case study in the Three Gorges Reservoir, China. *Sci Rep.* 7: 42469.
- Llirós M., Inceoğlu Ö., García-Armisen T., Anzil A., Leporcq B., Pigneur L. M., Viroux L., Darchambeau F., Descy J. P. y Servais P. 2014. Bacterial community composition in three freshwater reservoirs of different alkalinity and trophic status. *PLoS ONE.* 9(12): 1–27.
- López Cuevas O., León Félix J., Jiménez Edeza, M., y Chaidez Quiroz C. 2009. Detection and antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* in water and agricultural soil. *Travel & Tourism Analyst.* 63: 328–331.
- Loreau M., Naeem S., Inchausti P., Bengtsson J., Grime J. P., Hector A., Hooper D. U., Huston M. A., Raffaelli D., Schmid B., Tilman D. y Wardle D. A. 2001. Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. *Science.* 294(5543): 804–808.
- LPSN. 2021. Phylum *Proteobacteria*. Recuperado de <https://lpsn.dsmz.de/phylum/proteobacteria>.
- Lu H., Giordano F. y Ning Z. 2016. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics.* 14(2016):265-279.
- Ludwig W., Euzéby J., Schumann P., Busse H., Trujillo M. E., Kämpfer P. & Whitman W. B. 2015. Road map of the phylum Actinobacteria . En: Garrity G. M., y Holt J.G. *Bergey’s*

- Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Wiley Press, Hoboken, New Jersey 1–37 pp.
- Magana-Arachchi D. N., & Wanigatunge R. P. 2020. Ubiquitous waterborne pathogens. En: Vara Prasad M.N., y Grobelak A. Waterborne Pathogens. Butterworth-heinemann, Oxford, 15–42 pp.
- Martin-Carnahan A., Joseph S.W. 2005. *Aeromonadales* ord. nov. En Martin-Carnahan A. Joseph S.W. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, Nueva York, 556–587 pp.
- Martínez-Romero A., Foseca Gómez K., Ortega Sánchez J. y García-Lujan C. A. A. 2009. Monitoreo de la calidad microbiológica del agua en la cuenca hidrológica del Río Nazas, México. *Química Viva*. 8(1): 35–47.
- Márquez J., Revah S. y Le Borgne S. 2010. Rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitotróficas, relevancia ambiental y biotecnología. *Mensaje Bioquímico*. 34: 101–120.
- Mason L. M., Eagar A., Patel P., Blackwood C. B. and DeForest J. L. 2020. Potential microbial bioindicators of phosphorus mining in a temperate deciduous forest. *Journal of Applied Microbiology*. 130(1): 109–122.
- Mathai P. P., Staley C. y Sadowsky M. J. 2020. Sequence-enabled community-based microbial source tracking in surface waters using machine learning classification: A review. *Journal of Microbiological Methods*. 177(May): 106050.
- Megonigal J. P., Hines M. E. y Visscher P. T. 2003. Anaerobic Metabolism: Linkages to Trace Gases and Aerobic Processes. En: Holland H.D., y Turekian K.K. *Treatise on Geochemistry*. Pergamon, Oxford, 317–424 pp.
- Mena-Mejía I., Bustamante González Á., Vargas López S., Olvera Hernández J. I. y Méndez Espinoza J. A. 2017. Evaluación de la condición ecológica del Río Zahuapan. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 33(1): 7–19.
- Mercante J. W. y Winchell J. M. 2015. Current and emerging legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(1): 95–133.
- Molero J., Saez J. y Soler A. 2001. La autodepuración en las corrientes de agua. *Química Del Agua*. 2: 43–50.
- Mueller-Spitz S. R., Stewart L. B., Val Klump J. & McLellan, S. L. 2010. Freshwater suspended sediments and sewage are reservoirs for enterotoxin-positive *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(16): 5556–5562.
- Mujakić I., Andrei A., Shabarova T., Fecskeová L. K., Salcher M. M., Piwosz K., Ghai, R. y Koblížek M. 2021. Common Presence of Phototrophic Gemmatimonadota in Temperate Freshwater Lakes. *MSystems*. 6(2): e01241-20.
- Muñoz-Nava H., Suárez-Sánchez J., Vera-Reyes A., Orozco-Flores S., Batlle-Sales J., Ortiz-Zamora A. de J. y Mendiola-Argüelles J. 2011. Demanda bioquímica de oxígeno y población en la subcuenca del Río Zahuapan, Tlaxcala, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 28(1): 27–38.
- Murray R. G. E. and Stackebrandt E. 1995. Taxonomic note: Implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described prokaryotes. *International Journal of*

Systematic Bacteriology. 45(1): 186–187.

- Naphtali P., Mohiuddin M. M., Paschos A. and Schellhorn H. E. 2019. Application of high-throughput 16S rRNA sequencing to identify fecal contamination sources and to complement the detection of fecal indicator bacteria in rural groundwater. *Journal of Water and Health*. 17(3): 393–403.
- Navarro-Frómata A. E., y Navarrete-Rosas D. 2020. Addressing Stressors to Riverine Waters Quality: The Case of the Nexapa River. En Otazo-Sánchez E. M., Navarro-Frómata A. E. y Singh V. P. *Water Availability and Management in Mexico*. Springer, New York, 127-149 pp.
- NCBI. (2021a). *Taxonomy browser (Proteobacteria)*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1224>
- NCBI. (2021b). *Taxonomy browser (Bacteroidetes)*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=976>
- Newton R. J., Jones S. E., Eiler A., McMahon K. D. and Bertilsson S. 2011. A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 75(1): 14-19.
- Nuy J.K., Hoetzing M., Hahn M.W., Beisser D. and Boenigk J. 2020. Ecological Differentiation in Two Major Freshwater Bacterial Taxa Along Environmental Gradients. *Front microbiol*. 11:154
- O’Dea C., Zhang Q., Staley C., Masters N., Kuballa A., Fisher P., Veal C., Stratton H., Sadowsky M. J., Ahmed W. y Katouli M. 2019. Compositional and temporal stability of fecal taxon libraries for use with SourceTracker in sub-tropical catchments. *Water Research*. 165(2019): 114967.
- Ochoa C. 2021. Calidad del agua del Río Copalita (parte baja), Oaxaca, México. *Ensayo de investigación*. 25: 11-16.
- Okoh A., Odjadjare E., Gbinosa E. & Osode A. 2007. Wastewater treatment plants as a source of microbial pathogens in receiving watersheds. *African Journal of Biotechnology*. 6(25): 2932–2944.
- Olsen G. J., Lane D. J., Giovannoni S. J., Pace N. R. y Stahl D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*. 40: 337–365.
- OMS. (2017). Enfermedades diarreicas. *Enfermedades Diarreicas*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
- OMS. (2019). *Agua*. *Agua*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>.
- OMS. (2020, December 9). *Las 10 principales causas de defunción*. Las 10 Principales Causas de Defunción. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>.
- ONT. (2019). 16S Barcoding Kit (SQK-RAB204). *16 Barcoding Kit*, 25–28. Recuperado de <https://store.nanoporetech.com/16s-barcoding-kit.html>.
- ONT. (2017). Oxford Nanopore Technologies. *MinION Mk1: Portable, Real-Time Biological*

Analyses, May, 1–6. Recuperado de <https://nanoporetech.com/>

- ONT. (2020). Addressing the Challenges of metagenomics. Recuperado de <https://nanoporetech.com/nanopore-sequencing-data-analysis>.
- ONU. (2014). *Decenio internacional para la acción “el agua fuente de vida” 2005-2015*. Decenio Internacional Para La Acción “el Agua Fuente de Vida” 2005-2015. Recuperado de <https://www.un.org/spanish/waterforlifedecade/quality.shtml>
- ONU. (2021). *Agua | Naciones Unidas*. Recuperado de <https://www.un.org/es/global-issues/water>
- Pandey P. K., Kass P. H., Soupir M. L., Biswas S. & Singh V. P. 2014. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. *AMB Express*. 4(1): 1–16.
- Papale M., Rappazzo A. C., Mikkonen A., Rizzo C., Moscheo F., Conte A., Michaud L. and Giudice A. Lo. 2020. Bacterial diversity in a dynamic and extreme sub-arctic watercourse (Pasvik river, norwegian arctic). *Water (Switzerland)*. 12(11): 1–19.
- Parte A. C., Carbasse J. S., Meier-Kolthoff J. P., Reimer L. C. y Göker M. 2020. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70(11): 5607–5612.
- Pepper I. L., Gerba C. P., & Brusseau M. L. 2013. *Environmental & Pollution Science*. Academic Press. Tercera edición. Cambridge. 633 pp.
- Pereira P.A., Peplies J., Mushi D., Brettar I. and Höfle M. 2019. Pseudomonas-Specific NGS Assay Provides Insight Into Abundance and Dynamics of Pseudomonas Species Including *P. Aeruginosa* in a Cooling Tower. 9: 1958.
- Pernthaler J. 2013. Freshwater microbial communities. En: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E. y Thompson F. *The Prokaryotes: Prokaryotic Communities and Ecophysiology*. Springer, Berlin Heidelberg, 97–112 pp.
- PRONACCH. 2013. Programa contra Contingencias Hidráulicas. En: CONAGUA. Región Hidrológica Administrativa III, Ciudad de México, 44-86 pp.
- Ramazzotti M. y Bacci G. 2018. 16S rRNA-Based Taxonomy Profiling in the Metagenomics Era. En: Nagarajan M. *Metagenomics: Perspectives, Methods, and Applications*. Elsevier, Cambridge, 103–119 pp.
- Ramírez-Castillo F. Y., Loera-Muro A., Jacques M., Garneau, P., Avelar-González, F. J., Harel J. and Guerrero-Barrera A. L. 2015. Waterborne pathogens: Detection methods and challenges. *Pathogens*. 4(2): 307–334.
- Ranjani A., Dhanasekaran D. and Gopinath P.M. 2016. An Introduction to *Actinobacteria*. En: Ranjani A., Dhanasekaran D. and Gopinath P.M *Basics and Biotechnological Applications*. Intechopen, Londres, 1-37 pp.
- Reyneke B., Waso M., Khan S. and Khan W. 2020. Rainwater treatment technologies: Research needs, recent advances and effective monitoring strategies. *Current Opinion in Environmental Science and Health*. 16: 28–33.
- Reza M. S., Mizusawa N., Kumano A., Oikawa C., Ouchi D., Kobiyama A., Yamada Y., Ikeda Y., Ikeda D., Ieko K., Sato S., Ogata T., Kudo T., Jimbo M., Yasumoto K., Yoshitake K. y Watabe S. 2018. Metagenomic analysis using 16S ribosomal RNA genes of a bacterial

- community in an urban stream, the Tama River, Tokyo. *Fisheries Science*. 84(3): 563–577.
- Rickard A. H., McBain A. J., Ledder R. G., Handley P. S. y Gilbert P. 2003. Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. *FEMS Microbiology Letters*. 220(1): 133–140.
- Rochelle-Newall E., Nguyen T. M. H., Le T. P. Q., Sengtaheuanghoung O. and Ribolzi O. 2015. A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: Knowledge gaps and future directions. *Frontiers in Microbiology*. 6(MAR): 1–15.
- Rodicio M. D. R. y Mendoza M. D. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22(4): 238–245.
- Rodríguez-Pérez H., Ciuffreda L. y Flores C. 2020. NanoCLUST: a species-level analysis of 16S rRNA nanopore sequencing data. *Bioinformatics*. 0–2.
- Rosenberg E., DeLong E.I., Lory S., Stackebrandt E. & Thompson F. 2014. *The prokaryotes*. Springer. Cuarta edición. 775 p.
- Ruiz-Fernandez H.M.C., Ghaleb B., Soto-Jiménez M. y Paez-Osuna F. 2002. Recent sedimentary history of anthropogenic impacts on the Culiacan River Estuary, northwestern Mexico: geochemical evidence from organic matter and nutrients. *Environmental Pollution*. 118: 365–377.
- Ruiz J., Fechner D., Mores A. y Vazquez F. 2010. Dbo 5 Y Otros Parametros Fisico-Quimicos Como Indicadores De Contaminacion Rio Parana, Costa Corrientes. *Facena*. 26(1): 3–14.
- Rusiñol M., Martínez-Puchol S., Timoneda N., Fernández-Cassi X., Pérez-Cataluña A., Fernández-Bravo A., Moreno-Mesonero L., Moreno Y., Alonso J. L., Figueras M. J., Abril, J. F., Bofill-Mas S. y Girones R. 2020. Metagenomic analysis of viruses, bacteria and protozoa in irrigation water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 224(July 2019): 113440.
- Sagova-Mareckova M., Boenigk J., Bouchez A., Cermakova K., Chonova T., Cordier T., Eisendle U., Elersek T., Fazi S., Fleituch T., Frühe L., Gajdosova M., Graupner N., Haegerbaeumer A., Kelly A. M., Kopecky J., Leese F., Nöges P., Orlic S. y Stoeck T. 2021. Expanding ecological assessment by integrating microorganisms into routine freshwater biomonitoring. *Water Research*. 191:116767.
- Saingam P., Li B. y Yan T. 2020. Fecal indicator bacteria, direct pathogen detection, and microbial community analysis provide different microbiological water quality assessment of a tropical urban marine estuary. *Water Research*. 185: 116280.
- Samson R., Shah M., Yadav R., Sarode P., Rajput V., Dastager S. G., Dharne M. S. y Khairnar K. 2019. Metagenomic insights to understand transient influence of Yamuna River on taxonomic and functional aspects of bacterial and archaeal communities of River Ganges. *Science of the Total Environment*. 674: 288–299.
- Sánchez-Baracaldo P., Bianchini G., Wilson J. D. and Knoll A. H. 2021. *Cyanobacteria* and biogeochemical cycles through Earth history. *Trends in Microbiology*. 1–15.
- Santos A., Van Aerle R., Barrientos L. y Martinez-Urtaza J. 2020. Computational methods for 16S metabarcoding studies using Nanopore sequencing data. *Computational and Structural*

Biotechnology Journal. 18: 296–305.

Schulz K., Smit M. W., Herfort L. & Simon H. M. 2018. The Unseen World in the River. *Frontiers for Young Minds*. 6.

Scott T. M., Rose J. B., Jenkins T. M., Farrah S. R. and Lukasik J. 2002. Microbial source tracking: Current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 5796–5803.

SEMARNAT. 2005. Estadísticas del Agua en México 2005. Secretaría de medio ambiente y Recursos naturales. Edición 2005. Ciudad de México. 78 pp.

SEMARNAT. (2012). Programa Hídrico Nacional. Región Hidrológico-Administrativa III Pacífico Norte. *Programa Hídrico Regional Visión*. Recuperado de www.semarnat.gob.mx

SEMARNAT. 2015. Capítulo 6 Agua. En: Secretaría del medio ambiente y recursos naturales. Informe de la situación del medio ambiente en México, Edición 2015. Ciudad de México, 363–429 pp.

SEMARNAT. 2018. Estadísticas del agua en México 2018. Secretaría de medio ambiente y Recursos naturales. Edición 2018. Ciudad de México. 303 pp.

SEMARNAT. (2019). *SEMARNAT*. Recuperado de http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_R_AGUA05_01%26IBIC_user=dgeia_mce%26IBIC_pass=dgeia_mce

SEMARNAT. 2020a. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México (pp. 379–449).

SEMARNAT. (2020b). Red nacional de monitoreo de la calidad del agua. Recuperado de http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_R_AGUA05_03&IBIC_user=dgeia_mce&IBIC_pass=dgeia_mce.

Seong C.N., Kim M. S., Won K. J. and Moon P. H. 2019. Taxonomic hierarchy of the phylum *Proteobacteria* and Korean indigenous novel *Proteobacteria* species. *Journal of Species Research*. 8(2): 197–214.

Sharma A., Gautam S., Wadhawan, S. 2014. *Xanthomonas*. En Batt C.A, Tortorello M.L. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Cambridge, 811–817 pp.

Sigee D. C. 2005. *Freshwater microbiology*. John Wiley & sons, LTD. West Sussex, England. 524 p.

SilvaDB. (2020). Silva database. Recuperado de <https://www.arb-silva.de/>.

Some S., Mondal R., Mitra D., Jain D., Verma D. y Das S. 2021. Microbial pollution of water with special reference to coliform bacteria and their nexus with environment. *Energy Nexus*. 1:100008.

Song S., Jarvie T. y Hattori M. 2013. Our Second Genome-Human Metagenome. How Next-Generation Sequencer Changes our Life Through Microbiology. En: Poole R. K. *Advances in Microbial Physiology*. Elsevier, Amsterdam, 119–144 pp.

Soto-Jiménez M., Páez-Osuna F. y Ruiz-Fernández A. C. 2003. Geochemical evidences of the

anthropogenic alteration of trace metal composition of the sediments of Chiricahueto marsh (SE Gulf of California). *Environmental Pollution*. 125(3): 423–432.

St-Pierre K., Lévesque S., Frost E., Carrier N., Arbeit R. D. and Michaud S. 2009. Thermotolerant coliforms are not a good surrogate for *Campylobacter* spp. in environmental water. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(21): 6736–6744.

Stackebrandt E., Rainey F. A. and Ward-Rainey N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47(2): 479–491.

Stal L. J. 2007. *Cyanobacteria*. En: Stal S. J. *Cyanobacteria Diversity and Versatility, Clues to Life in Extreme Environments*. Springer, New York, 659–680 pp.

Staley C., Gould T. J., Wang P., Phillips J., Cotner J. B. and Sadowsky M. J. 2014. Core functional traits of bacterial communities in the Upper Mississippi River show limited variation in response to land cover. *Frontiers in Microbiology*. 5: 414.

Staley J.T y Konopka A. 1985. Measurement of In Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annual Review of Microbiology*. 39(1): 321–346.

Starke R., Müller M., Gaspar M., Marz M., Küsel K., Totsche K. U., Von Bergen M. y Jehmlich N. 2017. Candidate Brocadiales dominates C, N and S cycling in anoxic groundwater of a pristine limestone-fracture aquifer. *Journal of Proteomics*. 152: 153–160.

Straub T. M., Dockendorff B. P., Quiñonez-Díaz M. D., Valdez C. O., Shutthanandan J. I., Tarasevich B. J., Grate J. W. and Bruckner-Lea C. J. 2005. Automated methods for multiplexed pathogen detection. *Journal of Microbiological Methods*. 62(3): 303–316.

Takayasu L., Suda W. and Hattori M. 2019. Mapping the environmental microbiome. En: Ranganathan S., Gribskov M., Nakai K., Schönbach C. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*. Academic Press, Cambridge. 17–28 pp.

Tan B. F., Ng C., Nshimiyimana J. P., Loh L. L., Gin K. Y. H. and Thompson J. R. 2015. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: Current progress, challenges, and future opportunities. *Frontiers in Microbiology*. 6(SEP): 1027.

Tee H. S., Waite D., Lear G. and Handley K. M. 2021. Microbial river-to-sea continuum: gradients in benthic and planktonic diversity, osmoregulation and nutrient cycling. *Microbiome*. 9(1): 1–18.

Theol S. A., Fraiture C. y Suryadi F. X. 2016. Understanding Cohesive Sediments Behaviour in Irrigation Canals Using Delft 3D Model Simulation. 2ndWorld Irrigation Forum. 6-8 nov 2016.

ThermoFisher. (2021). *Environmental Pathogen Detection Kits | Thermo Fisher Scientific*. Recuperado de <https://www.thermofisher.com/search/browse/featured/mx/es/80012654/Environmental-Pathogen-Detection-Kits?navId=22180%2B26163>.

Thomas F., Hehemann J. H., Rebuffet E., Czjzek, M. and Michel G. 2011. Environmental and gut *Bacteroidetes*: The food connection. *Frontiers in Microbiology*. 2(MAY): 1-16.

Tripathy S., Kumar N., Mohanty S., Samanta M., Mandal R. N. y Maiti N. K. 2007.

Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from freshwater culture systems. *Microbiological Research*. 162(4): 391–396.

- Umezawa K., Kojima H., Kato Y. y Fukui M. 2020. Disproportionation of inorganic sulfur compounds by a novel autotrophic bacterium belonging to Nitrospirota. *Systematic and Applied Microbiology*. 43(5): 126110.
- UNESCO. 2019. Informe de las Naciones Unidas: No Dejar a Nadie Atras. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Edición 2019. París, Francia. 215 pp.
- Unno T., Staley C., Brown C. M., Han D., Sadowsky M. J. and Hur H. G. 2018. Fecal pollution: new trends and challenges in microbial source tracking using next-generation sequencing. *Environmental Microbiology*. 20(9): 3132–3140.
- Urban L., Holzer A., Baronas J. J., Hall M. B., Braeuning-Weimer P., Scherm M. J., Kunz D. J., Perera S. N., Martin-Herranz D. E., Tipper E. T., Salter S. J. y Stammnitz M. R. 2021. Freshwater monitoring by nanopore sequencing. *ELife*. 10: 1–27.
- USEPA. (1996). Environmental indicators of water quality in the United States. United States Environmental Protection Agency. Edición 1996. Washington D. C., Estados Unidos.
- Veech J. A. 2018. Measuring Biodiversity. En: Dellasala D.A., Goldstein M.I. *Encyclopedia of the Anthropocene*. Elsevier, Amsterdam, 287-295 pp.
- Vega-Rodríguez M. B. 2007. Cuantificación y sobrevivencia de *Enterococcus* en agua de mar de la bahía de Altata y Mazatlán (tesis pregrado). Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán Rosales, México.
- Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G. F., Chater K. F. and Sinderen D. van. 2007. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. MMBR: 71(3), 495.
- Walter J. M., Coutinho F. H., Dutilh B. E., Swings J., Thompson F. L. and Thompson C. C. 2017. Ecogenomics and taxonomy of Cyanobacteria phylum. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV): 2132.
- Wang M., Sha C., Wu J., Su J., Wu J., Wang Q., Tan J. y Huang S. 2021. Bacterial community response to petroleum contamination in brackish tidal marsh sediments in the Yangtze River Estuary, China. *Journal of Environmental Sciences (China)*. 99: 160–167.
- Wang Y., Sheng H., He Y., Wu J., Jiang Y., Tam N. F. and Zhou H. 2012. Comparison of the Levels of Bacterial Diversity in Freshwater, Intertidal Wetland, and Marine Sediments by Using Millions of Illumina Tags. *Journals ASM*. 78(23): 8264–8271.
- Wei Y. M., Wang J. Q., Liu T. T., Kong W. W., Chen N., He X. Q. y Jin Y. 2015. Bacterial communities of Beijing surface waters as revealed by 454 pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(16): 12605–12614.
- Weiss S., Xu Z. Z., Peddada S., Amir A., Bittinger K., Gonzalez A., Lozupone C., Zaneveld J. R., Vázquez-Baeza Y., Birmingham A., Hyde E. R. and Knight R. 2017. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*. 5(1): 1–18.
- Wiegel J., Tanner R. & Rainey F. A. 2006. An Introduction to the Family Clostridiaceae. En:

- Wiegel J., Tanner R. & Rainey F. A. The Prokaryotes. Springer, Nueva York, 654–678 pp.
- WHO. 2004. Guidelines for Drinking-water Quality. Tercera edición, Geneva, Switzerland. 668 p.
- WHO. 2016. Protecting Surface Water for Health. Identifying, Assessing and Managing Drinking-water Quality Risks in Surface-Water Catchments. World Health Organization. Edición 2016. Ginebra, Suiza. 178 pp.
- Wick R. (2017). rrrwick/Porechop: Adapter Trimmer for Oxford Nanopore reads. GitHub. Recuperado de <https://github.com/rrwick/Porechop>.
- Woese C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiological Reviews. 51(2): 221–271.
- Wolf-Rainer A. 2011. Megacities as sources for pathogenic bacteria in rivers and their fate downstream. International Journal of Microbiology. 2011: 798292.
- Xia N., Xia X., Liu T., Hu L., Zhu B., Zhang X. & Dong J. 2014. Characteristics of bacterial community in the water and surface sediment of the Yellow River, China, the largest turbid river in the world. Journal of Soils and Sediments. 14(11): 1894–1904.
- Yang Y., Li S., Gao Y., Chen Y., Zhan A. 2019. Environment-driven geographical distribution of bacterial communities and identification of indicator taxa in Songhua River. Ecological Indicators. 101(April 2018): 62–70.
- Yannarell A. C. and Kent A. D. 2009. Bacteria, Distribution and Community Structure. En: Likens G.E. Encyclopedia of Inland Waters. Academic Press, Cambridge, 201–210 pp.
- Zhang J, Zhang H., Li L., Wang Q., Yu J., & Chen Y. 2020a. Microbial community analysis and correlation with 2-methylisoborneol occurrence in landscape lakes of Beijing. Environmental Research. 183(February): 109217.
- Zhang J., Ding X., Guan R., Zhu C., Xu C., Zhu B., Zhang H., Xiong Z., Xue Y., Tu J. & Lu Z. 2018. Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. Science of The Total Environment. 618: 1254–1267.
- Zhang L., Zhong M., Li X., Lu W., Li J. 2020b. River bacterial community structure and co-occurrence patterns under the influence of different domestic sewage types. Journal of Environmental Management. 266(February): 110590.
- Zhang L., Zhou Y., Cheng Y., Lu W. & Liang Y. 2021. Effect of different types of industrial wastewater on the bacterial community of urban rivers. Journal of Freshwater Ecology. 36(1): 31-48.
- Zhang M., Wu Z., Sun, Q., Ding Y., Ding Z. & Sun, L. 2019. The spatial and seasonal variations of bacterial community structure and influencing factors in river sediments. Journal of Environmental Management, 248(June), 109293.
- Zhao D., Cao X., Huang R., Zeng J., Wu, Q. L. 2017. Variation of bacterial communities in water and sediments during the decomposition of *Microcystis* biomass. PLOS ONE. 12(4): e0176397.
- Zinger L., Gobet A. and Pommier T. 2012. Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. Molecular Ecology. 21(8): 1878–1896.
- Zothanpuia Passari A. K., Leo V. V. and Singh B. P. 2018. Freshwater *Actinobacteria*: Potential Source for Natural Product Search and Discovery. En: Singh B.P., Gupta V.K., and Passari

A.K. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications*. Elsevier, Amsterdam, 67-77 pp

Zwart G., Crump B. C., Kamst-van Agterveld M. P., Hagen F., Han S. K. 2002. Typical freshwater bacteria: An analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology*. 28(2): 141–155.

Zwirgmaier K., Keiz K., Engel M., Geist J. and Raeder U. 2015. Seasonal and spatial patterns of microbial diversity along a trophic gradient in the interconnected lakes of the Osterseen Lake District, Bavaria. *Frontiers in Microbiology*. 6(OCT): 1168.

10. ANEXOS

10.1. Concentración de ADN Obtenido por Sitios de Muestreo.

El 90 % resultaron dentro de parámetros deseables, las muestras que no cumplieron fueron por una baja concentración o una mayor o menor proporción 260/280, todas ellas correspondientes a extracciones de agua superficial de canal.

Número de muestra	Sitio	Conc. de Ac. nucleicos	Unidad	280/260	Total (ng)	Tipo de muestra
1	R1	95.2	ng/μL	1.89	4760	DNA
2	R1	92.2	ng/μL	1.91	4610	DNA
3	C4	6.8	ng/μL	2.31	-	DNA
4	C4	3.7	ng/μL	3.13	-	DNA
5	C5	28	ng/μL	1.98	1400	DNA
6	C5	33.8	ng/μL	1.91	1690	DNA
7	R3	63	ng/μL	1.91	3150	DNA
8	R3	43.1	ng/μL	1.69	2155	DNA
9	R2	82.3	ng/μL	1.91	4115	DNA
10	R2	72.3	ng/μL	1.92	3615	DNA
11	R1	20.3	ng/μL	2.09	2030	DNA
12	R1	25.7	ng/μL	1.95	2570	DNA
13	R1	90.9	ng/μL	1.86	4545	DNA
14	R1	135.6	ng/μL	1.84	6780	DNA
15	R2	67.4	ng/μL	1.88	3370	DNA
16	R2	100.9	ng/μL	1.83	5045	DNA
17	R3	60.1	ng/μL	1.83	3005	DNA
18	R3	77	ng/μL	1.85	3850	DNA
19	C4	10.8	ng/μL	1.77	-	DNA
20	C4	14.6	ng/μL	1.86	730	DNA
21	C5	27	ng/μL	1.66	-	DNA
22	C5	10.2	ng/μL	1.85	510	DNA
23	C4	11.4	ng/μL	1.87	570	DNA
24	C4	12.7	ng/μL	1.86	635	DNA

25	C5	10	ng/μL	1.94	500	DNA
26	C5	11	ng/μL	1.85	550	DNA
27	R1	89.9	ng/μL	1.86	4495	DNA
28	R1	81.5	ng/μL	1.9	4075	DNA
29	R2	84.2	ng/μL	1.89	4210	DNA
30	R2	48.7	ng/μL	1.95	2435	DNA
31	R3	59.5	ng/μL	1.91	2975	DNA
32	R3	59.5	ng/μL	1.9	2975	DNA
33	C4	9.9	ng/μL	2.19	495	DNA
34	C4	9.2	ng/μL	2.13	460	DNA
35	C5	8.1	ng/μL	2.14	405	DNA
36	C5	9.8	ng/μL	2.17	490	DNA
37	R1	127.8	ng/μL	1.87	6390	DNA
38	R2	109.9	ng/μL	1.86	5495	DNA
39	R3	146.2	ng/μL	1.87	7310	DNA

10.2. Muestras Secuenciadas en CEFAS, Concentraciones por Método Fluorométrico y Barcode Asignado.

Sample No.	Site	Sample type	Nanodrop (ng/ μL)	Qubit (ng/μL)	Barcode (SQK-16S024)
1	R1	DNA	95.2	102	13
5	C5	DNA	28	34	14
7	R3	DNA	63	87	15
9	R2	DNA	82.3	96	16
11	R1	DNA	20.3	32	17
13	R1	DNA	90.9	106	18
15	R2	DNA	67.4	84	19
17	R3	DNA	60.1	68	20
23	C4	DNA	11.4	11	21
25	C5	DNA	10	9	22
27	R1	DNA	89.9	94	23
29	R2	DNA	84.2	91	24
31	R3	DNA	59.5	71	1
33	C4	DNA	9.9	9	2
35	C5	DNA	8.1	7	3

37	R1	DNA	127.8	106	4
39	R3	DNA	146.2	112	5
Negative control	N/A	Water	N/A	0	7

10.3. Pipeline para el Procesamiento de Lecturas Largas del Gen 16S.

#Control de calidad de secuencias: filtrado y recorte de adaptadores

```
$ NanoPlot --summary sequencing_summary.txt -o summary-plots
```

```
$ gunzip -c *.fastq.gz | NanoFilt -q 8 --length 600 --maxlength 1900 | gzip > *.fastq.gz-nanofilt.fastq.gz
```

```
$ Porechop -i *.nanofilt.fastq.gz -o nanofilt.fastq.gz-trim.fastq.gz --middle_threshold 85 --discard_middle --threads 20
```

#Asignación taxonómica

```
$/16S_silva_installation.sh
```

```
$~/silva/database
```

```
$centrifuge-build --conversion-table ~/seqid2taxid.map --taxonomy-tree taxonomy/nodes.dmp --name-table taxonomy/names.dmp /library/silva.fnacentrifuge-build --conversion-table seqid2taxid.map --taxonomy-tree ./taxonomy/nodes.dmp --name-table ./taxonomy/names.dmp ./library/silva.fna silva_database
```

```
$centrifuge -q -x ~/silva138/silva138 *-trim.fastq -S "$files"-silva-full.tsv --report-file *-trim.fastq-silva-summary.tsv --min-totalen 900 -p 30
```

```
$centrifuge-kreport -x ~/silva138/silva138 *-silva-full.tsv > *-silva-full.tsv-silva-kraken.csv
```

#visualizar tablas en Pavian (<https://fbreitwieser.shinyapps.io/pavian/>) y obtener tabla OTUs con la opción “reads” y el nivel taxonómico deseado.

#Formatear las tablas OTUs: para crear tres archivos (Taxonomy, Otu y metadata).

#Taxonomy

```
$cut -f3 --output-delimiter="," Uploaded_sample_set-matrix-all-210405.tsv | sed 's/taxID/#TAXONOMY/g' > taxID.csv
```

```
$cut -f1 --output-delimiter="," Uploaded_sample_set-matrix-all-210405.tsv | sed 's/name/Genus/g'> genus.csv
```

```
$awk '{print $NF}' Uploaded_sample_set-matrix-all-210405.tsv | tail -n +2 | sed 's/>"/"/g' > lineage.csv
```

```
#Crear tabla OTU
```

```
$ sed 's/.cladeReads//g' Uploaded_sample_set-matrix-all-210405.tsv | sed 's/NA/0/g' | cut -f5-11 --output-delimiter="," > abundance.csv
```

```
paste -d="," taxID.csv abundance.csv | sed 's/=/,/g' | sed 's/#TAXONOMY/#NAME/g'>OTU.csv
```

```
paste -d="," taxID.csv lineage.csv genus.csv | sed 's/=/,/g'> Taxonomy.csv
```

```
#Metadata
```

Es un archivo .csv con los datos referetes a las muestras metagenómicas

```
#Gráficas y análisis de datos
```

Los tres archivos resultantes su utilizan en <https://www.microbiomeanalyst.ca/MicrobiomeAnalyst/home.xhtml>, mediante la opción de Marker Data Profiling y taxonomy labels de SILVA DB.

10.4. Estadísticos sobre número de lecturas, calidad y longitud antes y después de filtrado de secuencias.

Número de secuencias	Promedio de calidad de lectura	Promedio de longitud de lectura
5,507,863	11.9	1227 pb
4,431,120	13.6	1,372.1

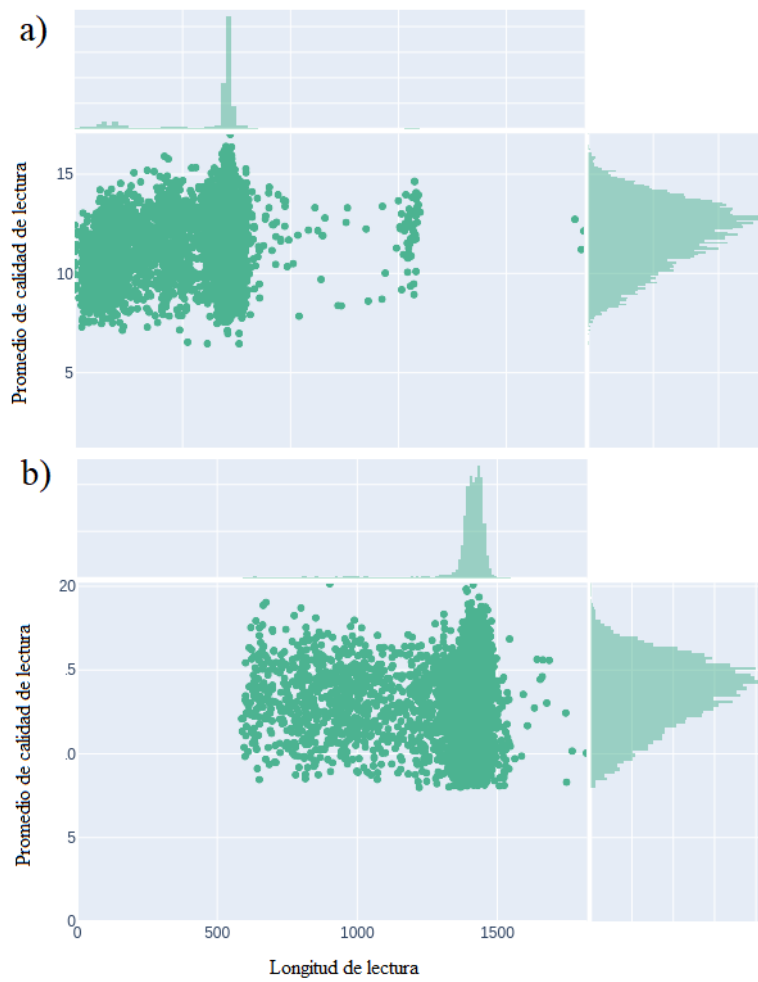
10.5. Formato de Salida sobre la Clasificación Taxonómica con el Programa Centrifuge.

Adaptado de Kim *et al.*, 2016.

ID de Lectura	ID de Sec	ID de Tax	Puntaje	2doMejorPuntaje	Longitud de aciertos	No./longitud de aciertos	No.Asignaciones
1_1	gi 4	9646	4225	0	80	80	1

- ID de Lectura: ID de lectura de una lectura de secuenciación sin procesar.
- ID de Seq: ID de secuencia de la secuencia genómica, donde se clasifica la lectura.
- ID de Tax: ID taxonómico de la secuencia genómica en la segunda columna.
- Puntaje: puntuación de la clasificación, que es la suma ponderada de los resultados.
- 2doMejorPuntaje: puntuación para la siguiente mejor clasificación.
- Longitud de aciertos: un número aproximado de pares de bases de la lectura que coinciden con la secuencia genómica.
- No. /longitud de aciertos: es un par de dos números: (1) un número aproximado de pares de bases de la lectura que coinciden con la secuencia genómica y (2) la longitud de una lectura o la longitud combinada de los pares de parejas.
- No.Asignaciones: número de clasificaciones para esta lectura, que indica cuántas asignaciones se hicieron.

10.6. Gráfico de puntos sobre secuencias del gen 16S antes de control de calidad y después. a) Secuencias antes de limpieza b) Secuencias después de limpieza y recorte de adaptadores.

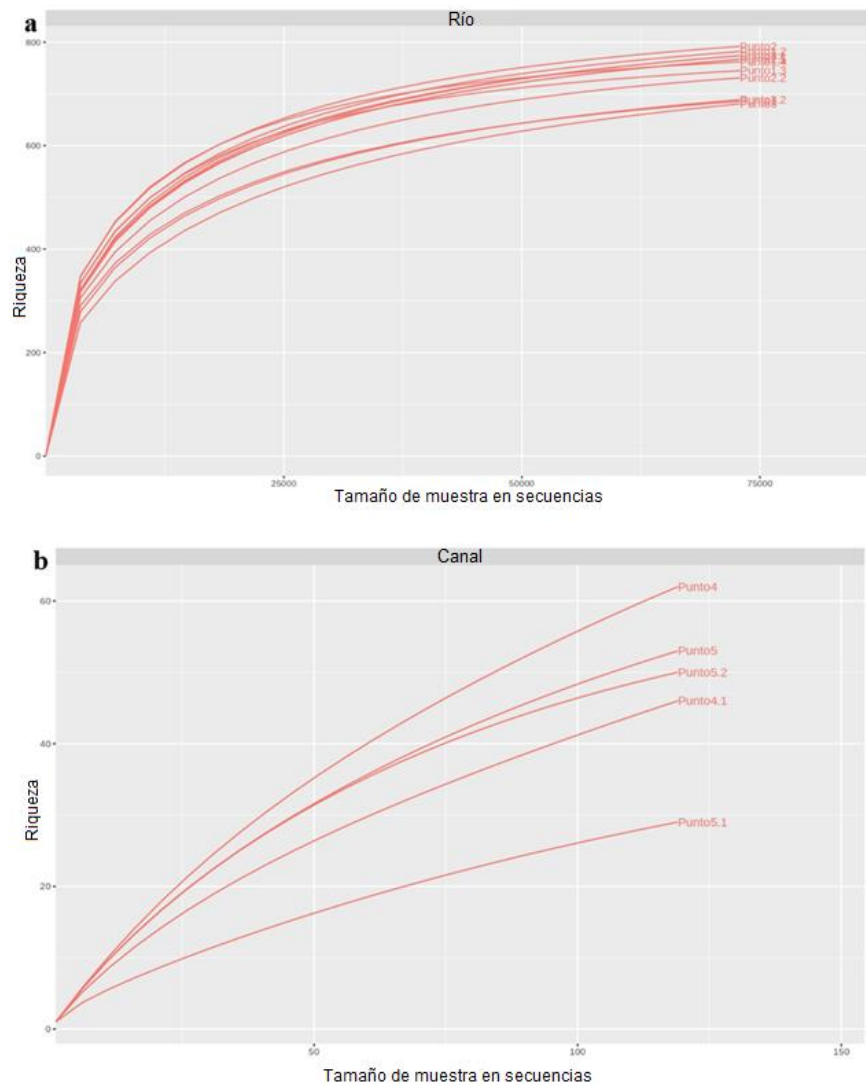


10.7. Datos generales sobre las bibliotecas generadas por la asignación taxonómica en
MicrobiomeAnalyst.

Tipo de datos:	Tabla de abundancia en OTUs
Anotación de OTUS	SILVA
Numero de OTUs :	2862
OTUs con ≥ 2 conteos:	2457
Conteo total de lecturas:	2721566
Conteo promedio por muestra:	160092
Conteo máximo por muestra:	365529
Conteo mínimo por muestra	123
Número de muestras en metadata:	17

10.8. Curvas de Acumulación de Riqueza.

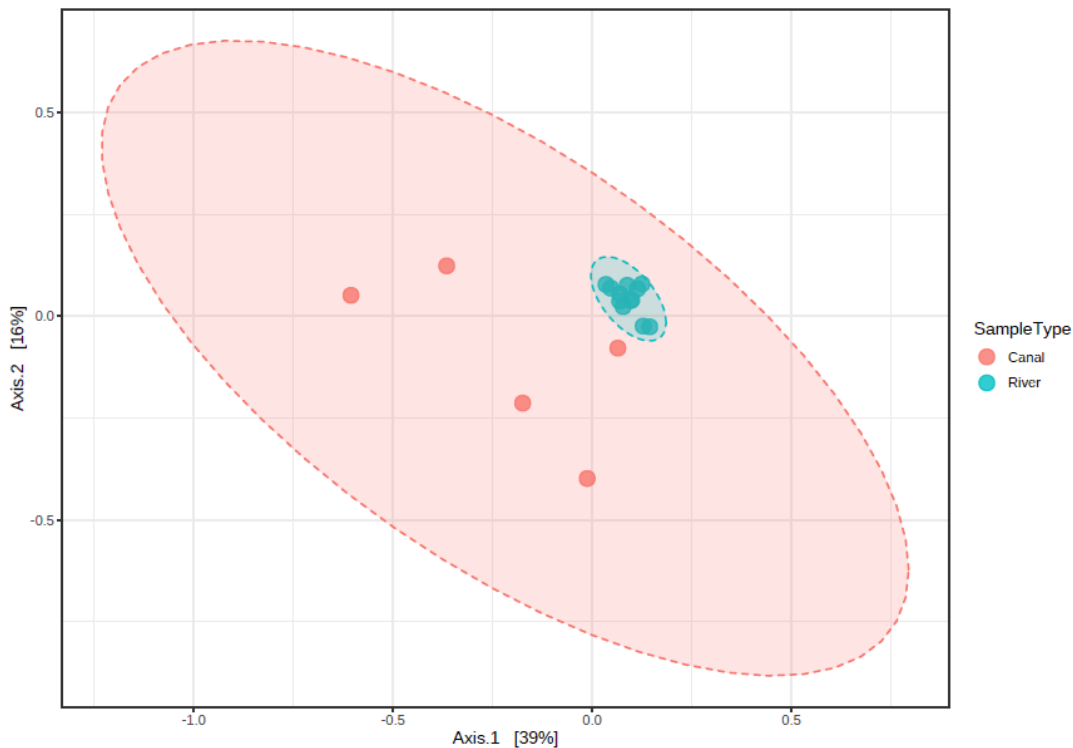
Con el objetivo de llevar a cabo una comparación justa entre los distintos sitios de estudio, que resultaron en tamaños de bibliotecas muy variables. Las lecturas pasaron un proceso de rarefacción, donde los datos se unificaron en función de la muestra con profundidad inferior (Weiss *et al.*, 2017; Escalante, 2008). Adicional, se incluyen valores de cobertura de Goods.



Curvas de acumulación de taxones de las bibliotecas generadas por punto de muestreo. Las curvas revelan la calidad del muestreo, ya que las comunidades tienen una cantidad finita de especies, si se continúan muestreando individuos (secuencias), las curvas eventualmente alcanzan una asíntota (línea vertical), lo que indica que ya no se encontraran más OTUs. a) Lecturas pertenecientes a sitios sobre el Río Culiacán b) Lecturas pertenecientes a canales de riego.

Punto	Cobertura de Goods (%)
1	99.87127604
2	99.86510277
3	99.84040972
4	72.26890756
5	82.07282913

10.9. Análisis de Coordenadas Principales, con el Índice de Bray Curtis a Nivel Género.



10.10. Conteos de Lecturas Correspondientes a Géneros Potencialmente Patógenos por Sitios de Muestreo.

OTU	Genus	Punto1	Punto1	Punto1	Punto1	Punto1	Punto1
46190	<i>Achromobacter</i>	161	277	263	113	77	205
3711	<i>Acinetobacter</i>	28	108	43	54	11	35
43314	<i>Actinomyces</i>	4	7	3	2	1	3
1804	<i>Aerococcus</i>	0	0	0	0	0	0
3318	<i>Aeromonas</i>	505	384	989	641	205	420
44483	<i>Arcobacter</i>	5	3	3	47	2	0
1688	<i>Bacillus</i>	64	243	199	114	69	138
26096	<i>Bartonella</i>	1	6	6	0	4	3
46194	<i>Bordetella</i>	67	127	86	52	20	83
46614	<i>Borrelia</i>	0	0	0	0	0	1
43427	<i>Brevibacterium</i>	2	5	2	0	1	0
26097	<i>Brucella</i>	1	4	0	0	0	0
46221	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	270	541	587	188	171	449
44491	<i>Campylobacter</i>	0	3	2	0	0	2
46704	<i>Chlamydia</i>	0	0	0	0	0	0
46459	<i>Citrobacter</i>	4	28	5	5	8	14
45621	<i>Clostridioides</i>	11	6	15	8	4	5
45342	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	422	1531	1034	854	349	624
45346	<i>Clostridium sensu stricto 13</i>	13	33	16	32	6	7
45348	<i>Clostridium sensu stricto 15</i>	1	3	1	1	1	2
45351	<i>Clostridium sensu stricto 18</i>	1	2	1	1	0	2
43344	<i>Corynebacterium</i>	16	42	9	4	3	14
26614	<i>Coxiella</i>	37	188	91	43	34	90
2768	<i>Ehrlichia</i>	0	0	0	0	0	0
46462	<i>Enterobacter</i>	16	48	27	17	21	23
1831	<i>Enterococcus</i>	3	10	5	2	3	2
46463	<i>Escherichia-Shigella</i>	30	103	83	51	36	49
26657	<i>Francisella</i>	0	3	0	1	1	0
3698	<i>Haemophilus</i>	3	6	15	4	2	4
46492	<i>Hafnia-Obesumbacterium</i>	0	2	0	0	0	2
44493	<i>Helicobacter</i>	0	4	4	1	0	2
46465	<i>Klebsiella</i>	13	27	23	19	8	17
3560	<i>Legionella</i>	303	1698	535	225	137	454
46603	<i>Leptospira</i>	210	1261	105	34	54	658
45258	<i>Listeria</i>	0	0	1	0	0	0

3714	<i>Moraxella</i>	5	15	8	5	2	8
43354	<i>Mycobacterium</i>	332	805	101	51	81	310
45267	<i>Mycoplasma</i>	0	11	8	1	1	1
46354	<i>Neisseria</i>	52	172	80	32	38	97
43358	<i>Nocardia</i>	5	14	2	0	1	6
NA	<i>Parachlamydia</i>						
46470	<i>Plesiomonas</i>	21	25	34	11	12	26
46519	<i>Proteus</i>	0	4	4	3	1	1
3723	<i>Pseudomonas</i>	154	867	423	214	157	676
2784	<i>Rickettsia</i>	9	49	24	2	3	13
46474	<i>Salmonella</i>	9	6	15	3	0	6
46541	<i>Serratia</i>	26	21	22	12	10	18
45295	<i>Staphylococcus</i>	8	39	29	22	6	12
3818	<i>Stenotrophomonas</i>	37	111	84	40	20	61
1853	<i>Streptococcus</i>	9	21	13	16	7	16
46624	<i>Treponema</i>	2	9	8	7	2	4
43367	<i>Tsukamurella</i>	1	1	0	0	0	0
45268	<i>Ureaplasma</i>	0	0	1	0	0	1
3783	<i>Vibrio</i>	16	34	39	32	4	18
46542	<i>Yersinia</i>	2	4	11	6	1	3

OTU	Genus	Punto2	Punto2	Punto2
46190	<i>Achromobacter</i>	135	197	202
3711	<i>Acinetobacter</i>	73	20	34
43314	<i>Actinomyces</i>	2	0	4
1804	<i>Aerococcus</i>	0	0	0
3318	<i>Aeromonas</i>	1153	751	586
44483	<i>Arcobacter</i>	28	5	13
1688	<i>Bacillus</i>	150	60	94
26096	<i>Bartonella</i>	2	4	4
46194	<i>Bordetella</i>	65	57	69
46614	<i>Borrelia</i>	0	0	0
43427	<i>Brevibacterium</i>	0	0	3
26097	<i>Brucella</i>	0	2	0
46221	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	334	359	357
44491	<i>Campylobacter</i>	5	4	0
46704	<i>Chlamydia</i>	0	1	0
46459	<i>Citrobacter</i>	11	4	3
45621	<i>Clostridioides</i>	20	5	5
45342	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	3630	432	777
45346	<i>Clostridium sensu stricto 13</i>	82	14	26

45348	<i>Clostridium sensu stricto 15</i>	0	0	1
45351	<i>Clostridium sensu stricto 18</i>	5	2	3
43344	<i>Corynebacterium</i>	7	4	19
26614	<i>Coxiella</i>	55	65	101
2768	<i>Ehrlichia</i>	0	0	1
46462	<i>Enterobacter</i>	39	14	18
1831	<i>Enterococcus</i>	6	1	2
46463	<i>Escherichia-Shigella</i>	104	37	42
26657	<i>Francisella</i>	1	4	1
3698	<i>Haemophilus</i>	9	3	2
46492	<i>Hafnia-Obesumbacterium</i>	0	0	0
44493	<i>Helicobacter</i>	0	2	3
46465	<i>Klebsiella</i>	32	16	14
3560	<i>Legionella</i>	907	454	733
46603	<i>Leptospira</i>	78	93	296
45258	<i>Listeria</i>	0	0	0
3714	<i>Moraxella</i>	6	4	8
43354	<i>Mycobacterium</i>	187	147	579
45267	<i>Mycoplasma</i>	3	3	4
46354	<i>Neisseria</i>	47	52	71
43358	<i>Nocardia</i>	6	1	10
NA	<i>Parachlamydia</i>			
46470	<i>Plesiomonas</i>	41	23	24
46519	<i>Proteus</i>	3	3	0
3723	<i>Pseudomonas</i>	512	245	301
2784	<i>Rickettsia</i>	17	15	15
46474	<i>Salmonella</i>	8	7	5
46541	<i>Serratia</i>	14	28	36
45295	<i>Staphylococcus</i>	17	13	11
3818	<i>Stenotrophomonas</i>	76	41	50
1853	<i>Streptococcus</i>	17	8	9
46624	<i>Treponema</i>	4	3	5
43367	<i>Tsukamurella</i>	1	0	1
45268	<i>Ureaplasma</i>	0	0	0
3783	<i>Vibrio</i>	52	30	25
46542	<i>Yersinia</i>	5	3	3

OTU	Genus	Punto3	Punto3	Punto3
46190	<i>Achromobacter</i>	309	110	211
3711	<i>Acinetobacter</i>	33	82	19
43314	<i>Actinomyces</i>	8	2	3

1804	<i>Aerococcus</i>	0	0	0
3318	<i>Aeromonas</i>	753	2187	1087
44483	<i>Arcobacter</i>	1	2	0
1688	<i>Bacillus</i>	131	204	115
26096	<i>Bartonella</i>	8	1	2
46194	<i>Bordetella</i>	137	41	74
46614	<i>Borrelia</i>	0	0	0
43427	<i>Brevibacterium</i>	2	1	2
26097	<i>Brucella</i>	2	1	0
46221	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	536	195	309
44491	<i>Campylobacter</i>	4	3	3
46704	<i>Chlamydia</i>	0	1	0
46459	<i>Citrobacter</i>	4	8	5
45621	<i>Clostridioides</i>	7	16	5
45342	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	761	1867	323
45346	<i>Clostridium sensu stricto 13</i>	14	36	20
45348	<i>Clostridium sensu stricto 15</i>	7	0	0
45351	<i>Clostridium sensu stricto 18</i>	0	1	0
43344	<i>Corynebacterium</i>	15	13	10
26614	<i>Coxiella</i>	70	165	45
2768	<i>Ehrlichia</i>	1	0	0
46462	<i>Enterobacter</i>	19	56	27
1831	<i>Enterococcus</i>	8	8	3
46463	<i>Escherichia-Shigella</i>	33	147	46
26657	<i>Francisella</i>	0	1	0
3698	<i>Haemophilus</i>	5	9	6
46492	<i>Hafnia-Obesumbacterium</i>	1	0	1
44493	<i>Helicobacter</i>	1	0	1
46465	<i>Klebsiella</i>	20	47	29
3560	<i>Legionella</i>	955	3386	346
46603	<i>Leptospira</i>	294	48	29
45258	<i>Listeria</i>	0	0	1
3714	<i>Moraxella</i>	5	13	4
43354	<i>Mycobacterium</i>	955	289	333
45267	<i>Mycoplasma</i>	1	3	6
46354	<i>Neisseria</i>	101	40	43
43358	<i>Nocardia</i>	7	2	1
NA	<i>Parachlamydia</i>			
46470	<i>Plesiomonas</i>	23	53	28
46519	<i>Proteus</i>	4	8	7
3723	<i>Pseudomonas</i>	201	533	142
2784	<i>Rickettsia</i>	38	22	18

46474	<i>Salmonella</i>	5	18	9
46541	<i>Serratia</i>	32	49	36
45295	<i>Staphylococcus</i>	13	42	10
3818	<i>Stenotrophomonas</i>	41	84	49
1853	<i>Streptococcus</i>	13	15	15
46624	<i>Treponema</i>	4	3	5
43367	<i>Tsukamurella</i>	0	3	3
45268	<i>Ureaplasma</i>	0	0	0
3783	<i>Vibrio</i>	20	51	24
46542	<i>Yersinia</i>	10	9	14

OTU	Genus	Punto4	Punto4
46190	<i>Achromobacter</i>	1	76
3711	<i>Acinetobacter</i>	0	371
43314	<i>Actinomyces</i>	0	2
1804	<i>Aerococcus</i>	0	5
3318	<i>Aeromonas</i>	2	609
44483	<i>Arcobacter</i>	0	604
1688	<i>Bacillus</i>	1	779
26096	<i>Bartonella</i>	0	2
46194	<i>Bordetella</i>	1	36
46614	<i>Borrelia</i>	0	0
43427	<i>Brevibacterium</i>	0	2
26097	<i>Brucella</i>	0	3
46221	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	2	132
44491	<i>Campylobacter</i>	0	0
46704	<i>Chlamydia</i>	0	0
46459	<i>Citrobacter</i>	0	17
45621	<i>Clostridioides</i>	0	2
45342	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	6	409
45346	<i>Clostridium sensu stricto 13</i>	0	12
45348	<i>Clostridium sensu stricto 15</i>	0	1
45351	<i>Clostridium sensu stricto 18</i>	0	4
43344	<i>Corynebacterium</i>	0	3
26614	<i>Coxiella</i>	0	246
2768	<i>Ehrlichia</i>	0	0
46462	<i>Enterobacter</i>	0	82
1831	<i>Enterococcus</i>	0	11
46463	<i>Escherichia-Shigella</i>	0	132
26657	<i>Francisella</i>	0	0
3698	<i>Haemophilus</i>	1	7

46492	<i>Hafnia-Obesumbacterium</i>	0	3
44493	<i>Helicobacter</i>	0	7
46465	<i>Klebsiella</i>	0	54
3560	<i>Legionella</i>	2	549
46603	<i>Leptospira</i>	2	153
45258	<i>Listeria</i>	0	0
3714	<i>Moraxella</i>	0	6
43354	<i>Mycobacterium</i>	0	48
45267	<i>Mycoplasma</i>	0	0
46354	<i>Neisseria</i>	0	32
43358	<i>Nocardia</i>	0	0
NA	<i>Parachlamydia</i>		
46470	<i>Plesiomonas</i>	0	43
46519	<i>Proteus</i>	0	9
3723	<i>Pseudomonas</i>	1	406
2784	<i>Rickettsia</i>	0	1
46474	<i>Salmonella</i>	0	18
46541	<i>Serratia</i>	0	25
45295	<i>Staphylococcus</i>	0	5
3818	<i>Stenotrophomonas</i>	0	50
1853	<i>Streptococcus</i>	0	19
46624	<i>Treponema</i>	0	7
43367	<i>Tsukamurella</i>	0	0
45268	<i>Ureaplasma</i>	0	0
3783	<i>Vibrio</i>	0	20
46542	<i>Yersinia</i>	0	5

OTU	Genus	Punto5	Punto5	Punto5
46190	<i>Achromobacter</i>	0	115	0
3711	<i>Acinetobacter</i>	0	576	1
43314	<i>Actinomyces</i>	1	1	0
1804	<i>Aerococcus</i>	0	0	0
3318	<i>Aeromonas</i>	1	4188	0
44483	<i>Arcobacter</i>	0	6	0
1688	<i>Bacillus</i>	1	74	1
26096	<i>Bartonella</i>	0	1	0
46194	<i>Bordetella</i>	0	40	0
46614	<i>Borrelia</i>	0	0	0
43427	<i>Brevibacterium</i>	0	2	0
26097	<i>Brucella</i>	0	0	0
46221	<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0	208	2

44491	<i>Campylobacter</i>	0	0	0
46704	<i>Chlamydia</i>	0	1	0
46459	<i>Citrobacter</i>	0	37	0
45621	<i>Clostridioides</i>	0	0	0
45342	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	4	22	2
45346	<i>Clostridium sensu stricto 13</i>	0	1	0
45348	<i>Clostridium sensu stricto 15</i>	0	0	0
45351	<i>Clostridium sensu stricto 18</i>	0	0	0
43344	<i>Corynebacterium</i>	0	1	0
26614	<i>Coxiella</i>	0	173	0
2768	<i>Ehrlichia</i>	0	0	0
46462	<i>Enterobacter</i>	0	198	0
1831	<i>Enterococcus</i>	0	4	0
46463	<i>Escherichia-Shigella</i>	1	253	0
26657	<i>Francisella</i>	0	0	0
3698	<i>Haemophilus</i>	0	19	0
46492	<i>Hafnia-Obesumbacterium</i>	0	4	0
44493	<i>Helicobacter</i>	0	1	0
46465	<i>Klebsiella</i>	0	108	0
3560	<i>Legionella</i>	1	21	0
46603	<i>Leptospira</i>	1	31	0
45258	<i>Listeria</i>	0	0	0
3714	<i>Moraxella</i>	0	3	0
43354	<i>Mycobacterium</i>	0	5	0
45267	<i>Mycoplasma</i>	0	1	0
46354	<i>Neisseria</i>	0	93	0
43358	<i>Nocardia</i>	0	0	0
NA	<i>Parachlamydia</i>			
46470	<i>Plesiomonas</i>	0	19	0
46519	<i>Proteus</i>	0	5	0
3723	<i>Pseudomonas</i>	0	5096	1
2784	<i>Rickettsia</i>	0	3	0
46474	<i>Salmonella</i>	0	50	0
46541	<i>Serratia</i>	0	74	0
45295	<i>Staphylococcus</i>	0	5	0
3818	<i>Stenotrophomonas</i>	1	39	0
1853	<i>Streptococcus</i>	0	2	0
46624	<i>Treponema</i>	0	2	0
43367	<i>Tsukamurella</i>	0	0	0
45268	<i>Ureaplasma</i>	0	0	0
3783	<i>Vibrio</i>	0	59	0
46542	<i>Yersinia</i>	0	34	0