



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Evaluación físico-química y metataxonómica de una fuente hídrica natural en la localidad de Alchipichí, cantón Quito, para su potencial uso en la piscicultura.

Autor: Joseph Stalin Quinga Sangucho

Director: Ing. Andrés Izquierdo, PhD.

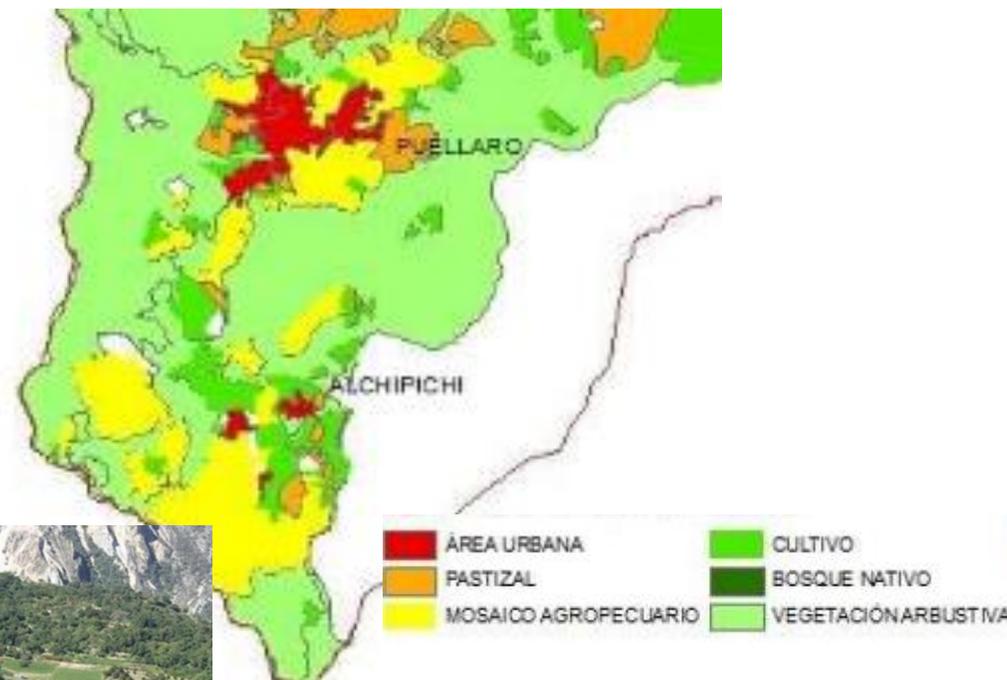
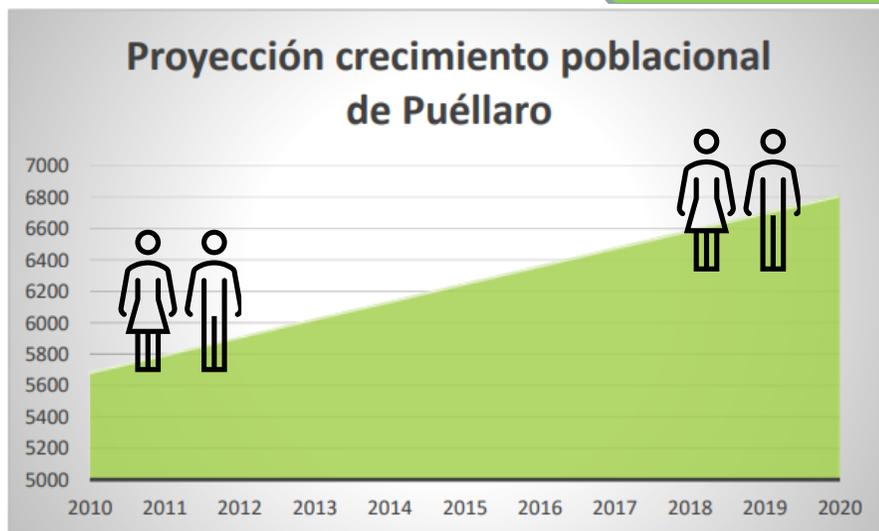
Sangolquí, 4 de julio de 2023



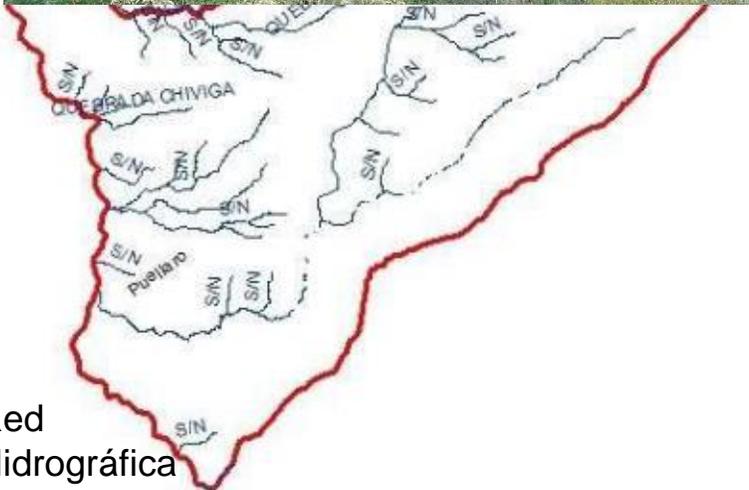
- 1** **Introducción**
- 2** **Objetivos e Hipótesis**
- 3** **Materiales y Métodos**
- 4** **Resultados y Discusión**
- 5** **Conclusiones**
- 6** **Recomendaciones**
- 7** **Agradecimientos**



Incremento de zonas de cultivo



Alchipichí-Puéllaro



Red Hidrográfica

No hay estudios



Investigación



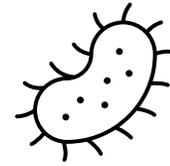
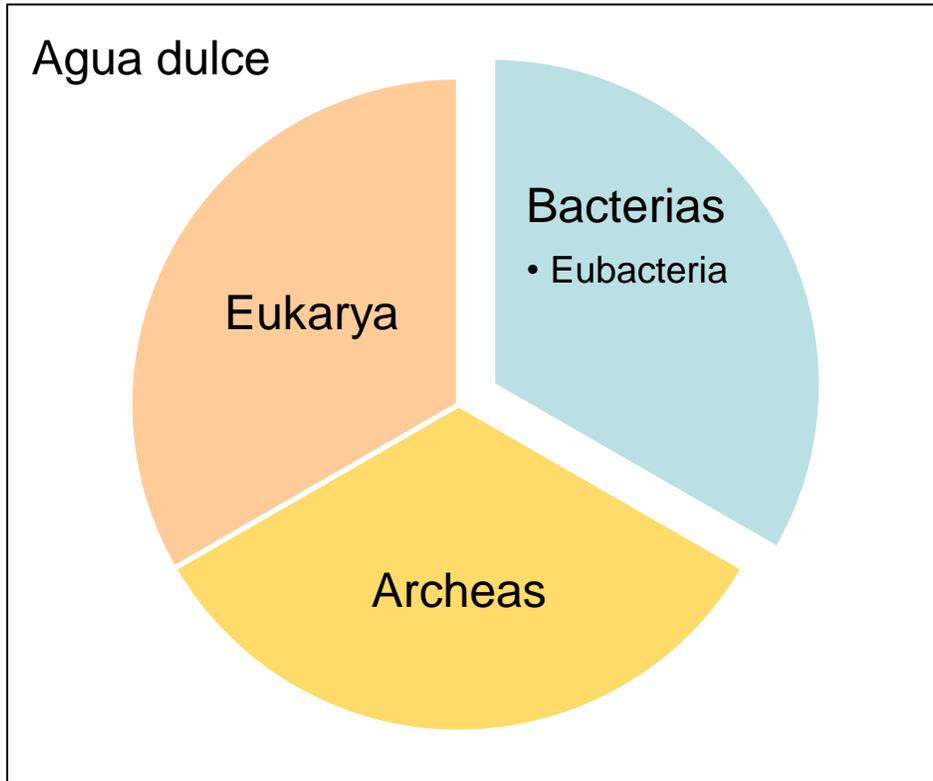
Actividad económica



Piscicultura

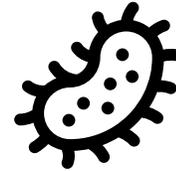


Microorganismos de agua dulce



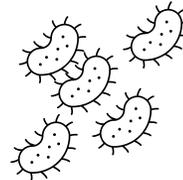
Autótrofos

Bacterias
fotosintéticas



Heterótrofos

C- \rightarrow a partir de
materia orgánica



Pelágicos

Pueden moverse
en el agua

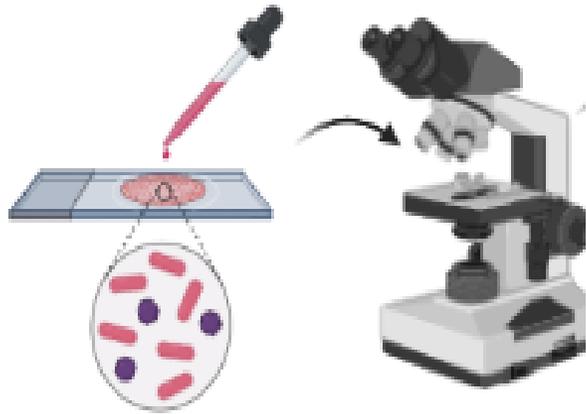


Bentónicos

Interior del
sedimento

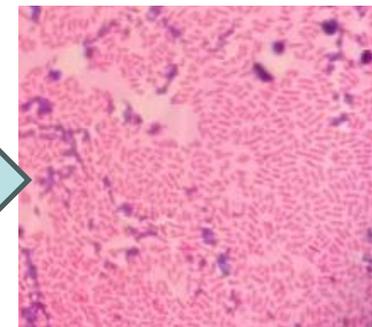
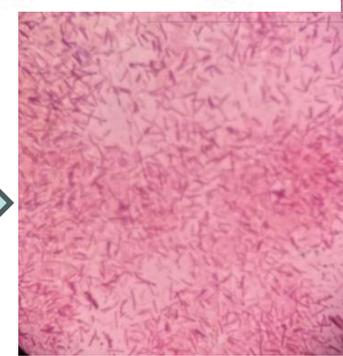
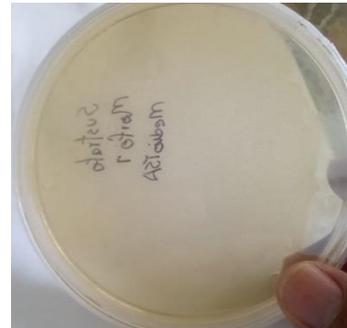
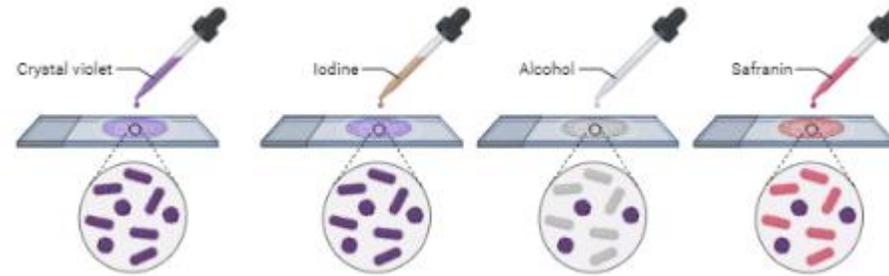
Métodos de Identificación

Tinción Gram



Gram positivas

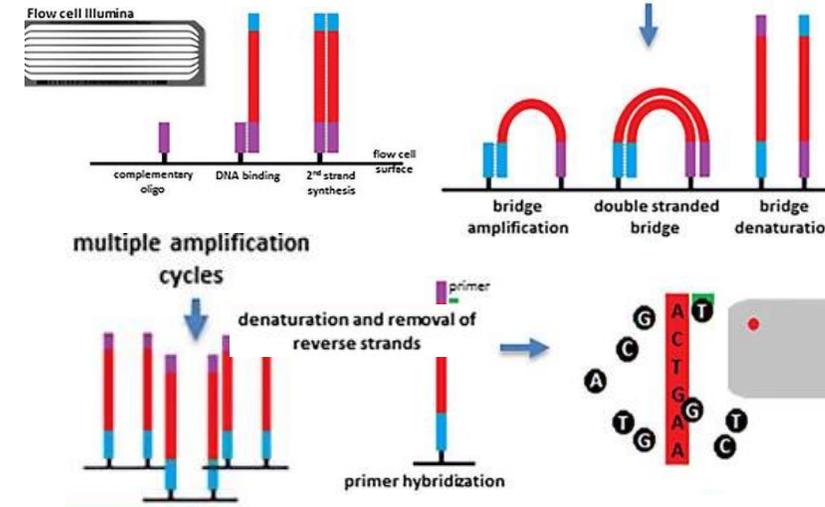
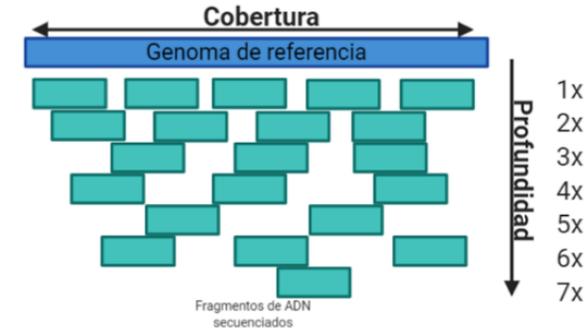
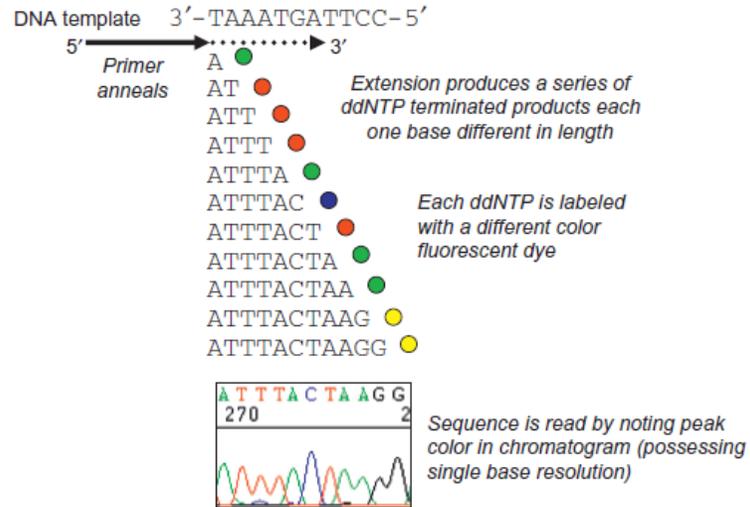
Gram negativas



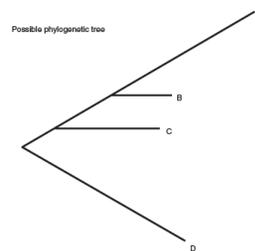
Métodos moleculares

Secuenciación Sanger

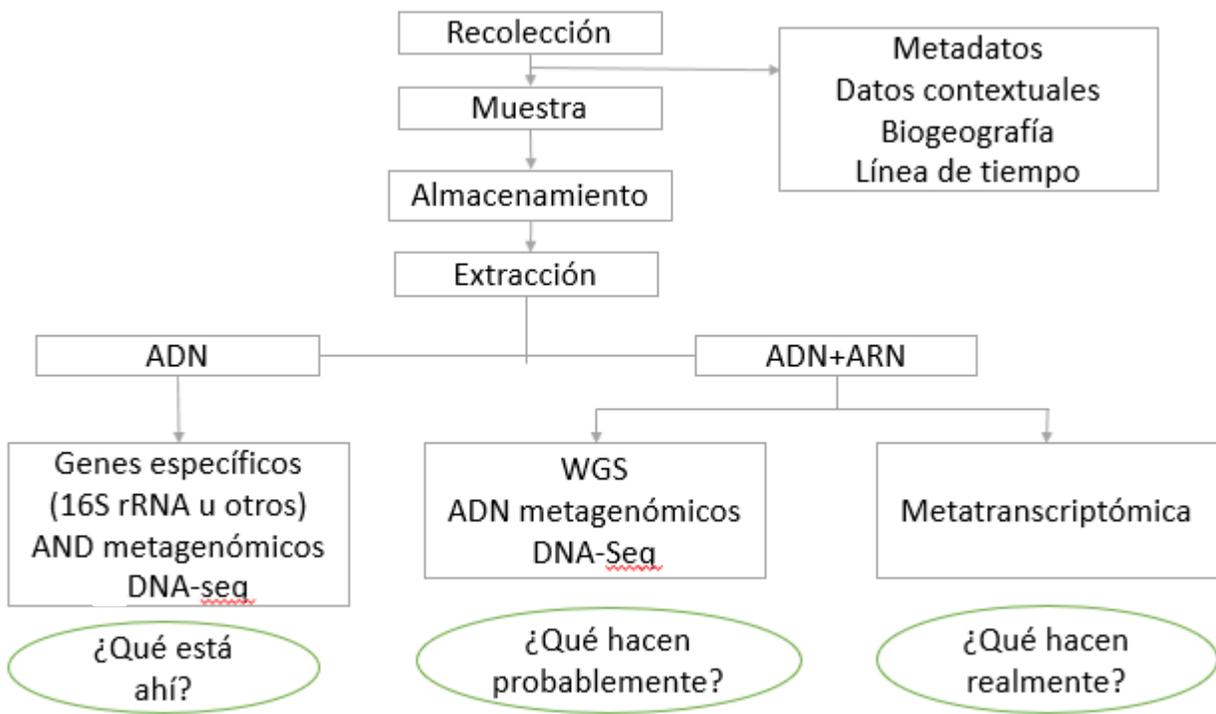
Secuenciación masiva Illumina



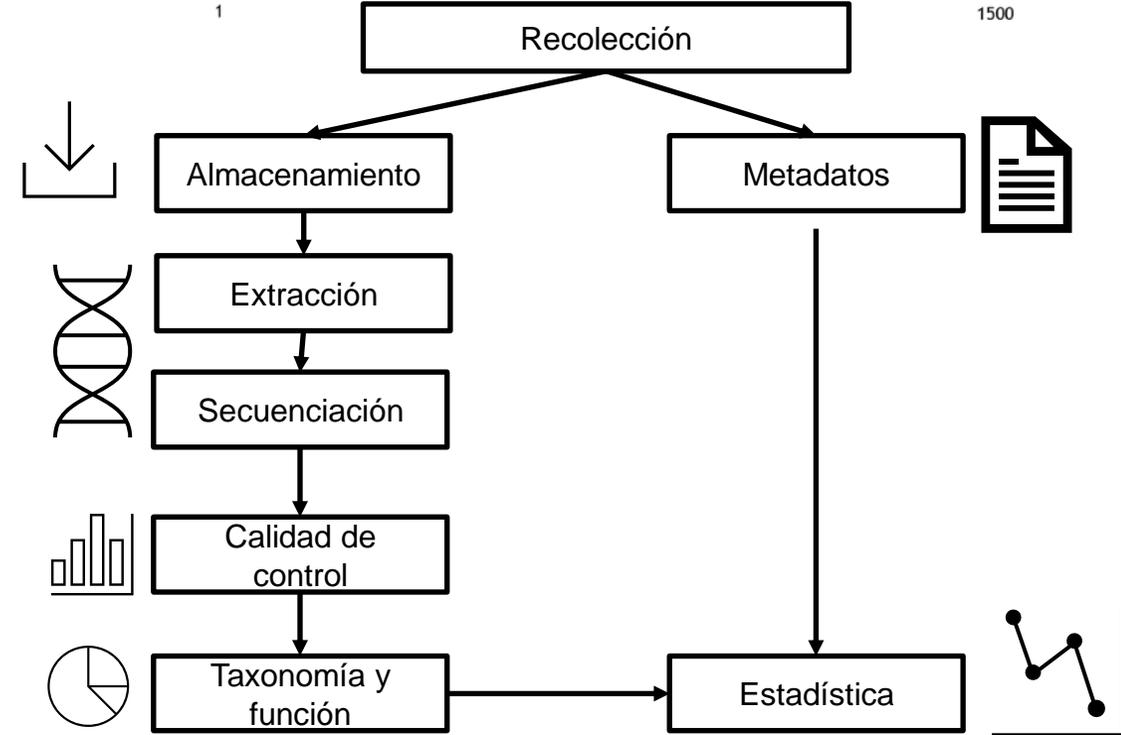
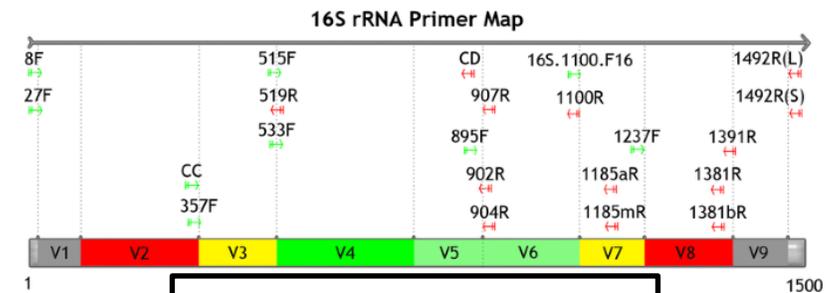
Organism	Sequence
A	C A U A G A C C U G A C G C C
B	C C U A G A G C U G G C G C G
C	C G A A A G G G U G G C G C C
D	G C U A G A A G U G G C G G C

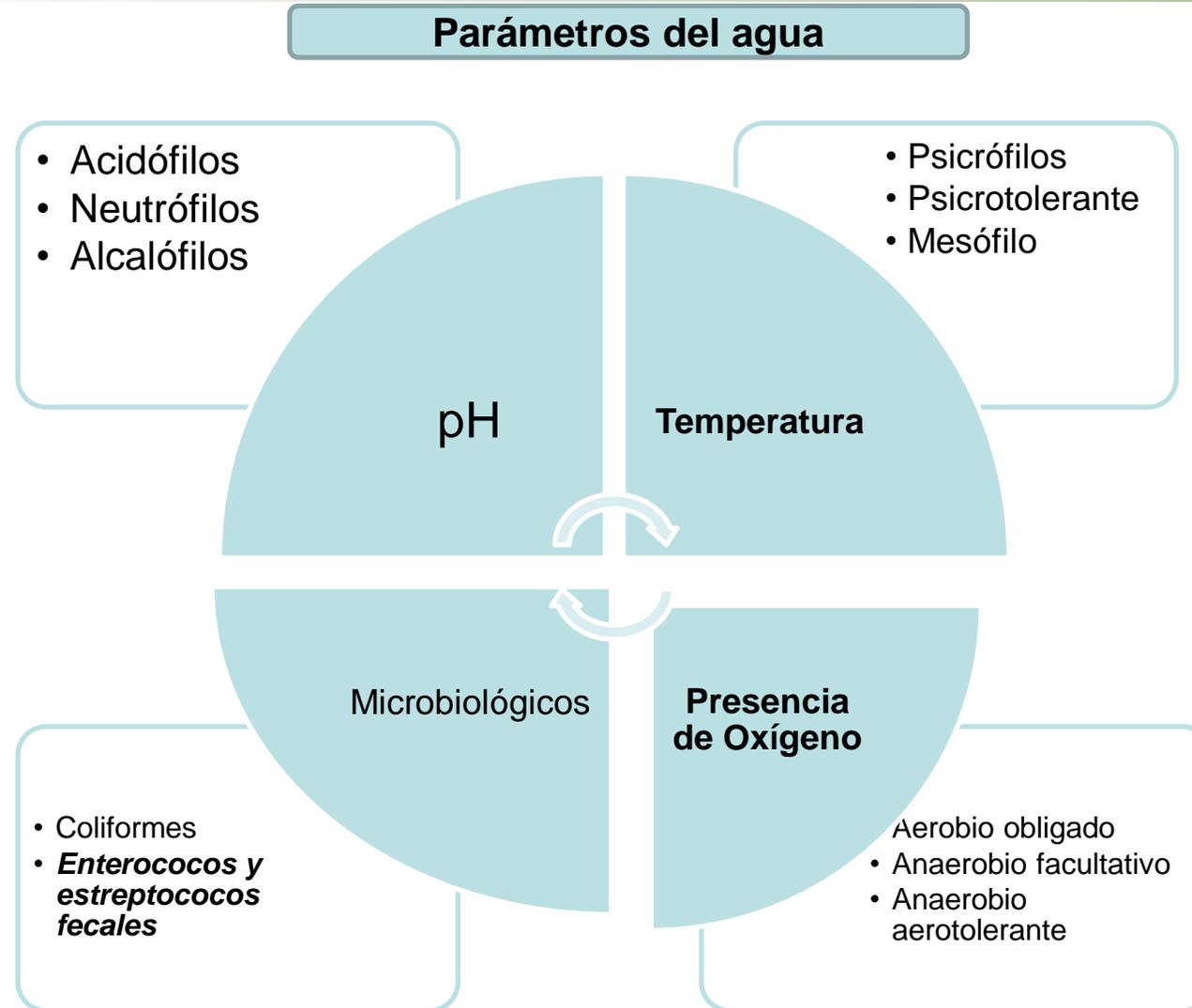


Metagenómica



Metataxonómica





Normas de Calidad de Agua

Parámetro	Unidad	Límite máximo permitido
Oxígeno Disuelto	mg/L	no menor a 6
pH		6.5-9
NH₃	mg/L	0.02
Al	mg/L	0.1
As	mg/L	0.05
Ba	mg/L	1
Be	mg/L	0.1
B	mg/L	0.75
Cd	mg/L	0.001
Zn	mg/L	0.18
Co	mg/L	0.2
Cu	mg/L	0.02
Cr	mg/L	0.05
Fe	mg/L	0.3
Hg	mg/L	0.0002
Ni	mg/L	0.025
Coliformes	NMP/100mL	20

Acuerdo ministerial
097-A emitido en el
año 2015

Libro VI del Texto
Unificado de
Legislación
Secundaria del
Ministerio del
Ambiente

Enfermedades bacterianas presentes en la piscicultura



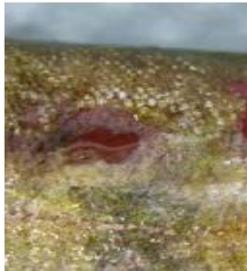
Renibacteriosis

- *Rinabacterium salmoninarum*



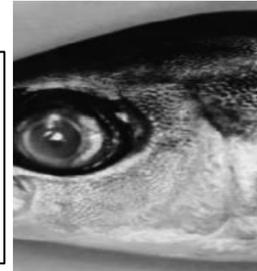
Flavobacteriosis

- Especies del género *Flavobacterium*



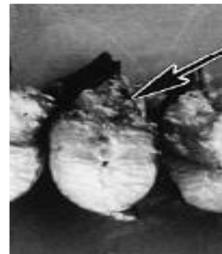
Francisellosis

- Bacterias del género *Francisella*



Streptococcosis

- Especies de *Streptococcus*



Edwardsielosis

- Por el género *Edwardsiella*

- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos e Hipótesis**
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 **Resultados y Discusión**
- 5 **Conclusiones**
- 6 **Recomendaciones**
- 7 **Agradecimientos**

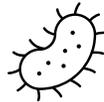


Objetivo General



Evaluar de forma físico-química y metataxonómica una fuente hídrica natural en la localidad de Alchipichí, cantón Quito, para su potencial uso en la piscicultura.

Objetivos Específicos



Estimar propiedades físico-químicas de la fuente hídrica tanto en época lluviosa como en seca.

Aislar e identificar bacterias mesófilas mediante métodos microbiológicos y moleculares.

Evaluar la diversidad bacteriana de la fuente hídrica natural mediante metataxonómica.

Hipótesis

El agua de la fuente hídrica ubicado en la localidad de Alchipichí, cantón Quito, con coordenadas 0°01'35.2"N 78°24'08.8"W es adecuada para su uso en la piscicultura.



- 1 Introducción
- 2 Objetivos e Hipótesis
- 3 Materiales y Métodos**
- 4 Resultados y Discusión
- 5 Conclusiones
- 6 Recomendaciones
- 7 Agradecimientos



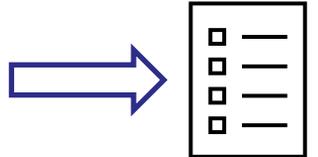
Propiedades Físico-químicas



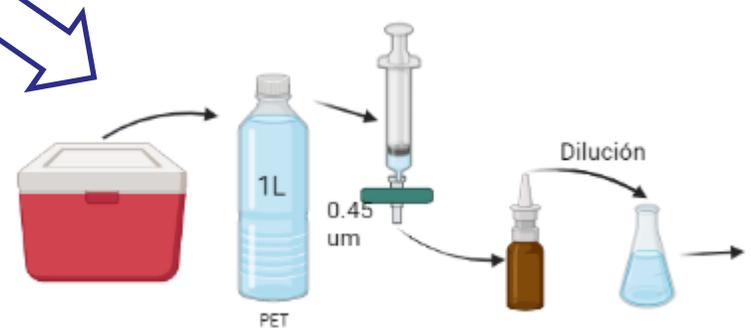
Alchipichí, vía Pisque-Puéllaro
 0°01'35.2"N 78°24'08.8"W

10 mediciones
 Seco (5) / lluvioso(5)

Fase de campo



Recolección



<https://app.biorender.com/illustrations>



Espectrómetro de absorción atómica
 (Perkin Elmer y modelo AANALYST 200)

Ca
 Pb
 Fe
 Zn

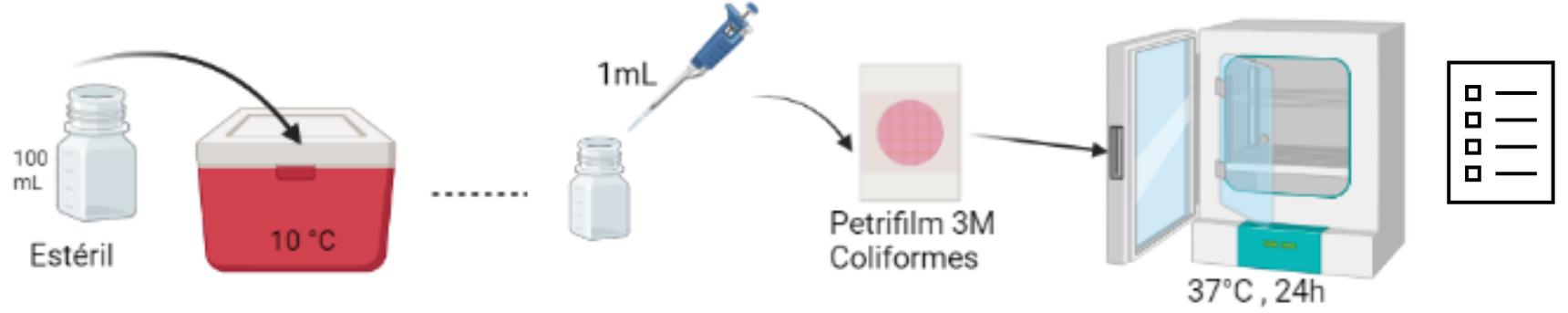


ESPE
 UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
 INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

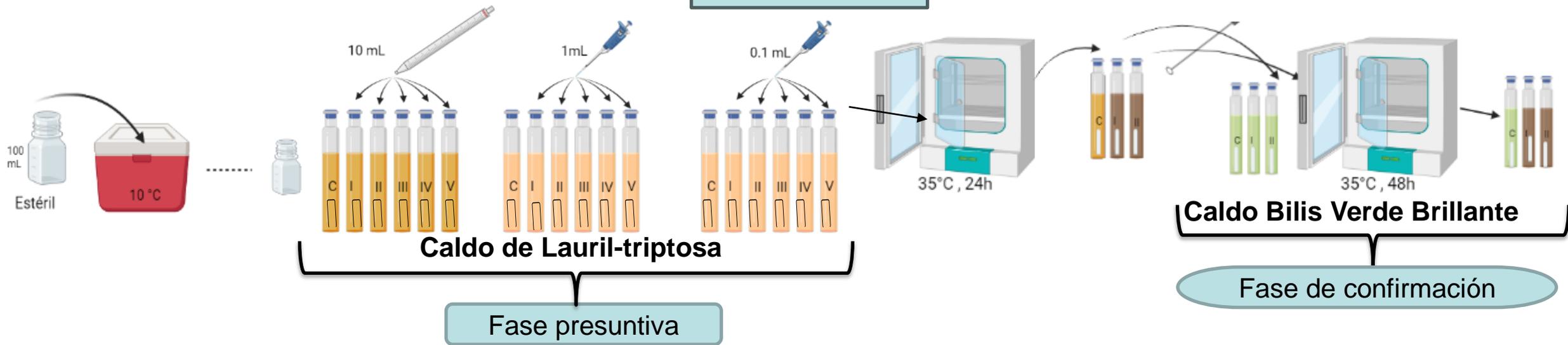
2

Cuantificación de coliformes

Placas Petrifilm



Método NMP

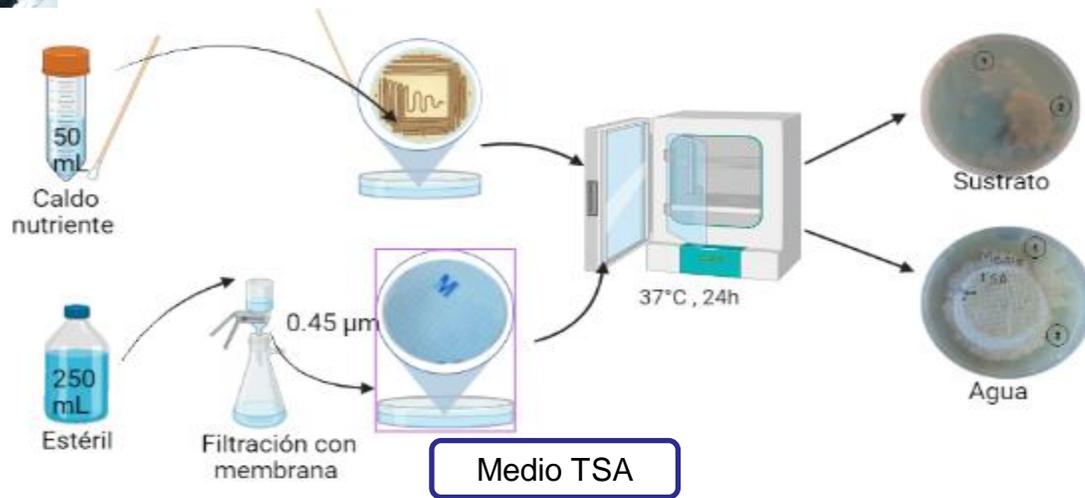


<https://app.biorender.com/illustrations>

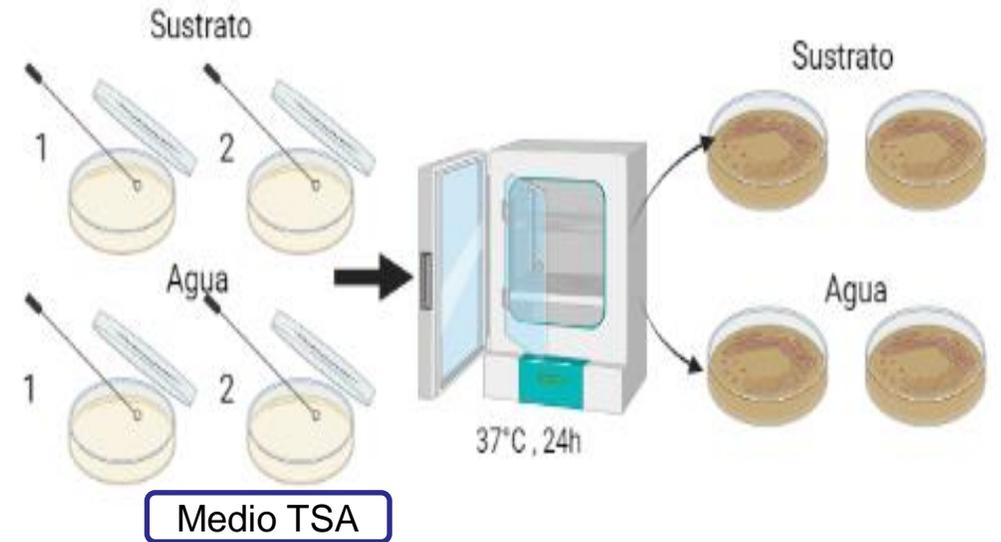
3

Aislamiento e identificación de bacterias

Siembra bacteriana



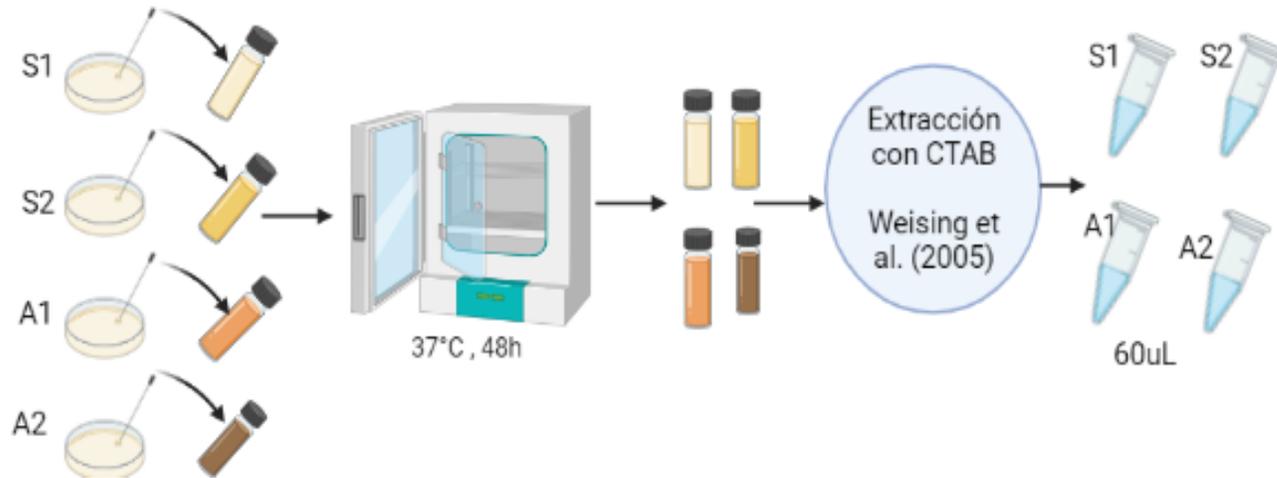
Aislamiento



Tinción Gram



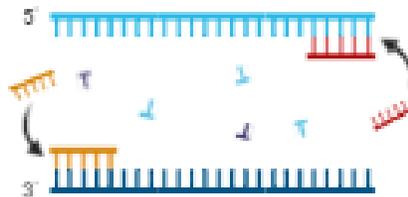
Extracción de ADN



PCR

27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'

1492R 5' ACGGCTACCTTGTTACGA 3'



Secuenciación Sanger



4

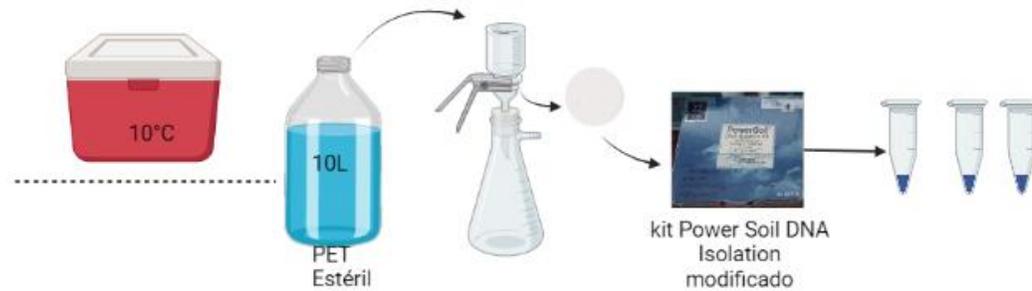
Agua



Sedimento



Metabarcoding



Cadena de frío



Secuenciación NGS Metagenómica de Amplicón

Amplificó la región v3-v4 del gen ribosomal 16S

- 341F (5'CCTACGGGNGGCWGCAG3')
- 805R (5'GACTACHVGGGTATCTAATCC3')

<https://app.biorender.com/illustrations>



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

5

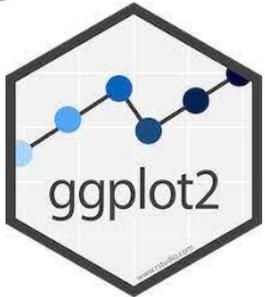
Análisis bioinformático

Datos de
Parámetros
físico-químicos

Datos de
secuenciación
Sanger

Datos de Metabarcoding

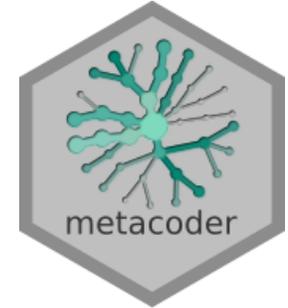
R Studio®



geneious
prime



R Studio®



Control de calidad

- Mapa de calor -> "plotQualityProfile"
- Recorte y Filtración -> "filterandTrim"
- Tasa de errores -> "learnErrors"

Agrupación de ASVs

- "dada"
- "makeSequenceTable"

Anotación taxonómica

- "assignTaxonomy"
- "phyloseq"



silva_nr_v138_train_set.fa.gz McLaren (2020)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos e Hipótesis**
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 **Resultados y Discusión**
- 5 **Conclusiones**
- 6 **Recomendaciones**
- 7 **Agradecimientos**

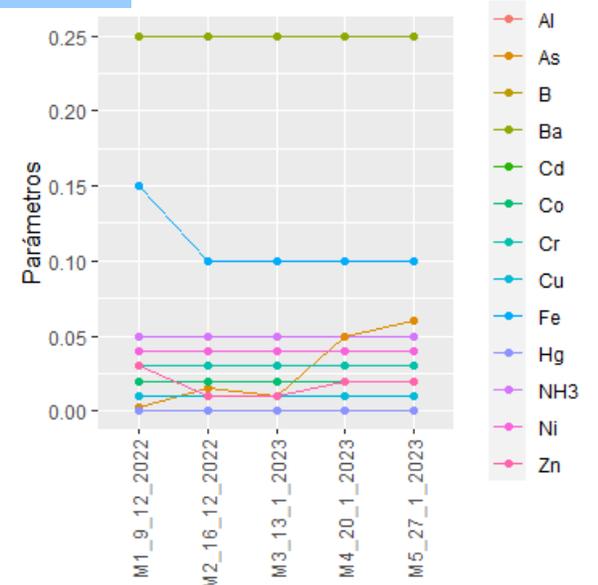
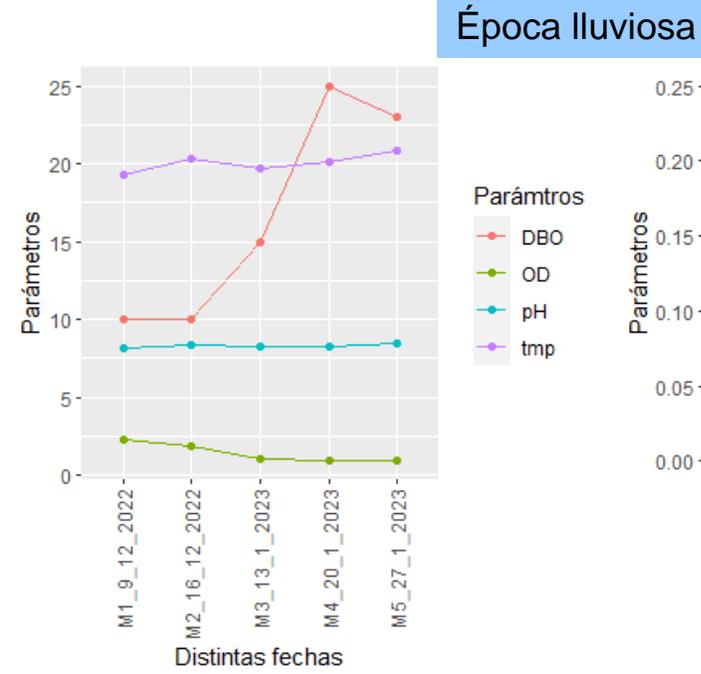
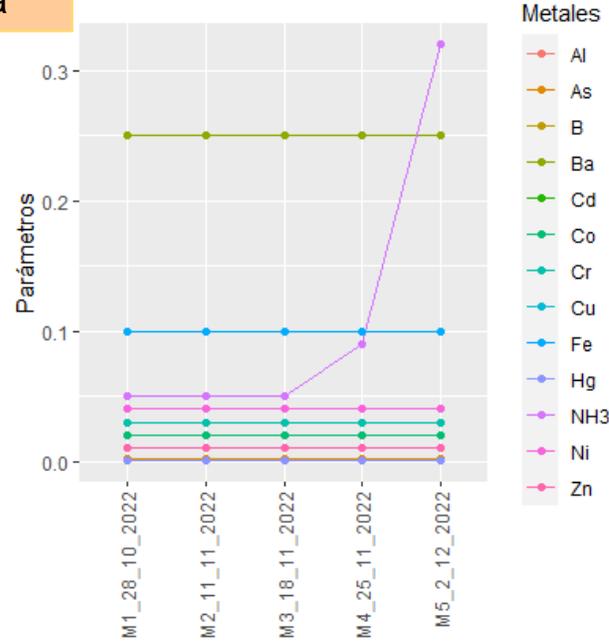
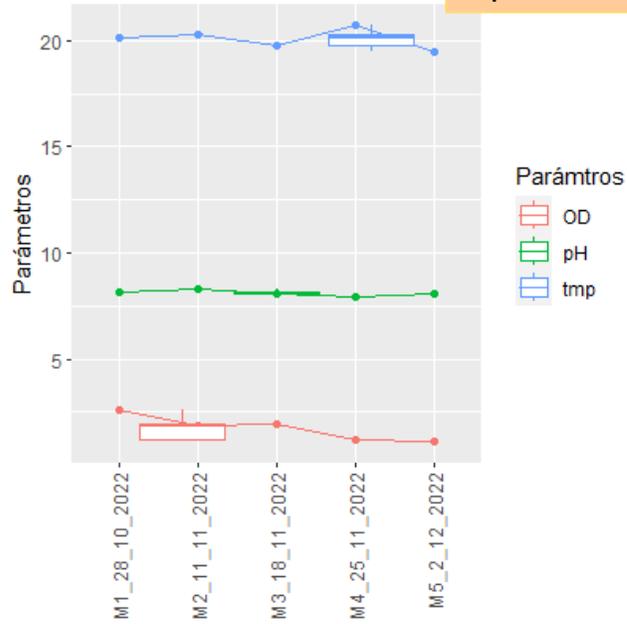


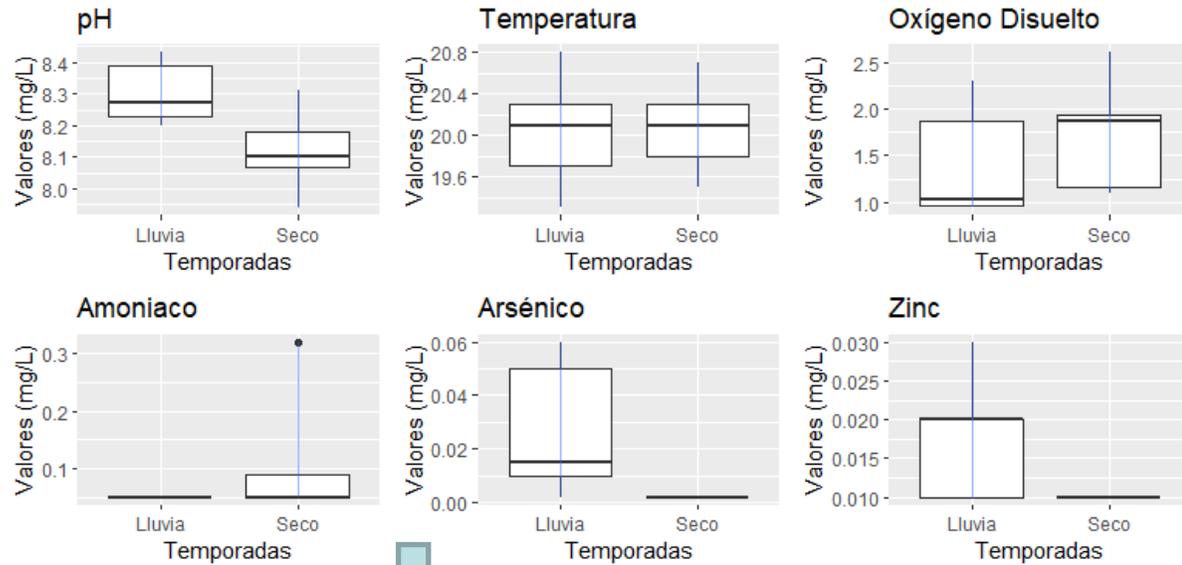
Parámetro	Unidad	Seca	Lluviosa	Normativa
		Media	Media	
Temperatura	°C	20.08 ± 0.57	20.04	-
pH	-	8.12 ± 0.17	8.30 ± 0.13	Cumple
OD	mg/L	1.73 ± 0.77	1.42 ± 0.77	No cumple
Amoniaco	mg/L	0.11 ± 0.1	< 0.05	Cumplen las normativas
Arsénico	mg/L	<0.002	0.027 ± 0.033	
Aluminio	mg/L	<0.04	<0.04	
Bario	mg/L	<0.25	<0.25	
Boro total	mg/L	<0.02	<0.02	
Cadmio	mg/L	<0.03	<0.03	
Cobre	mg/L	<0.01	<0.01	
Cromo	mg/L	<0.03	<0.03	
Cobalto	mg/L	<0.02	<0.02	
Mercurio	mg/L	<0.0002	<0.0002	
Níquel	mg/L	<0.04	<0.04	
Zinc	mg/L	<0.01	0.018 ± 0.01	
Hierro total	mg/L	<0.1	0.11 ± 0.04	

Nota. Resultados obtenidos de "Labolab", laboratorio acreditado por el SAE

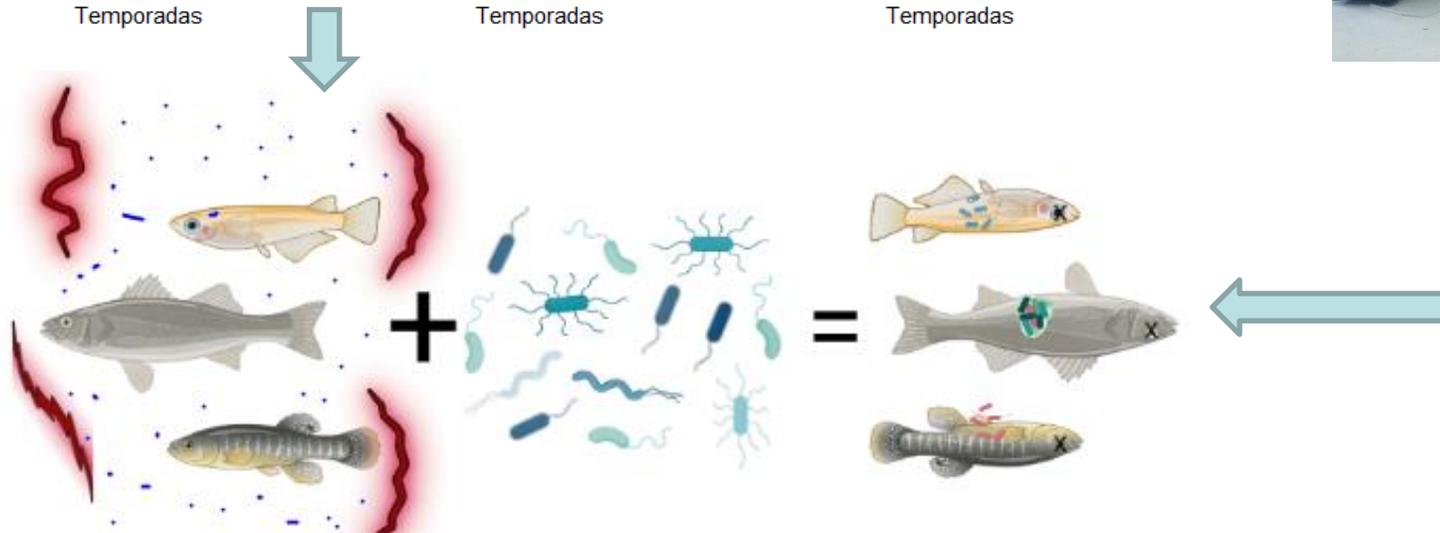


Época seca





Espectrómetro de absorción atómica (marca Perkin Elmer y modelo AANALYST 200)

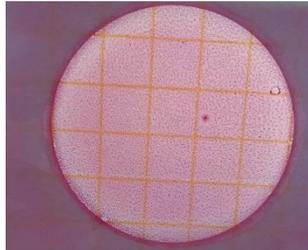


Parámetro	Concentración (mg/L)
Calcio	18.5
Plomo	1.079
Hierro	0.01
Zinc	< 0.001 *

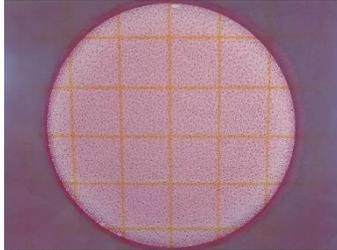
<https://app.biorender.com/illustrations>

Coliformes

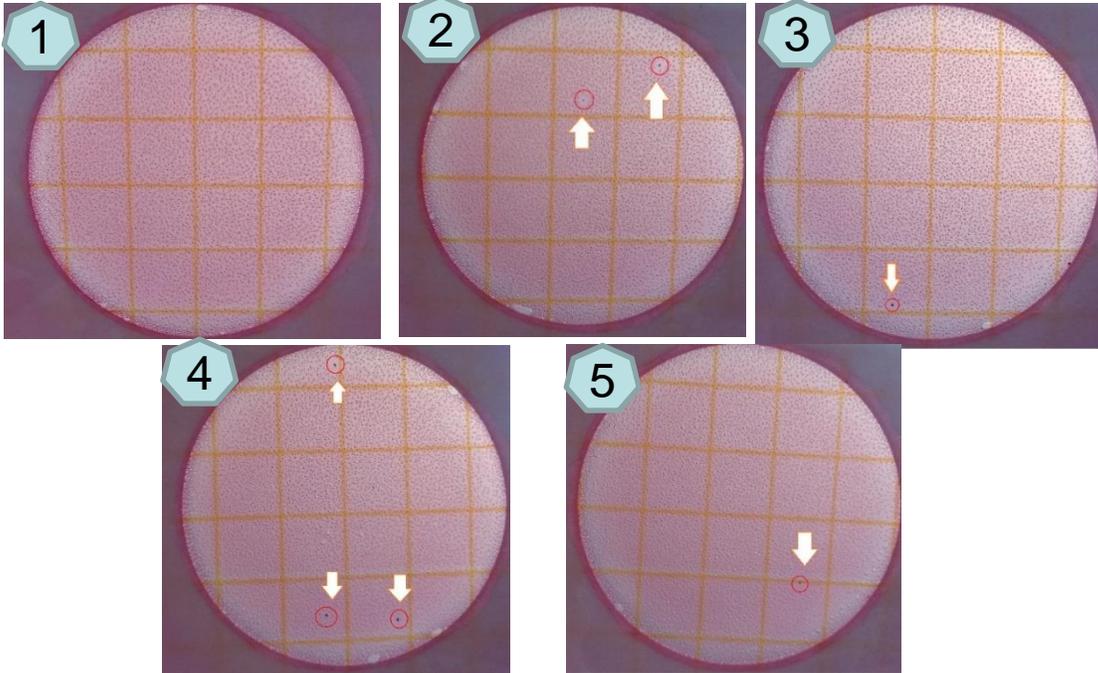
Placas Petrifilm 3M



Control Positivo. Muestra de fuente de patos



Control negativo. Muestra de agua embotellada

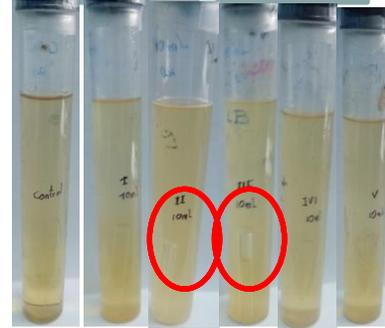


Variable	Cantidad	Media	DE	LI	LS
UFC/mL	5	1.40	1.14	0.32	2.49

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

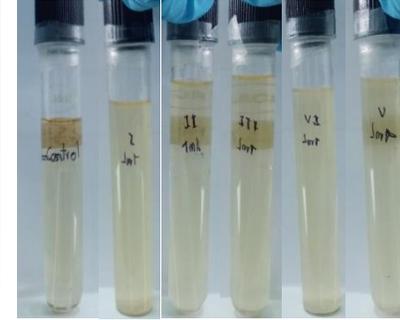
Número más probable

10 mL de inóculo



2

1 mL de inóculo



0

0,1 mL de inóculo



0

Confirmación



Combinación de positivos	NMP /100mL	Lim. Inferior	Lim. Superior
2-0-0	4,5	0,79	15



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Sedim. Morfología 1 (S1)



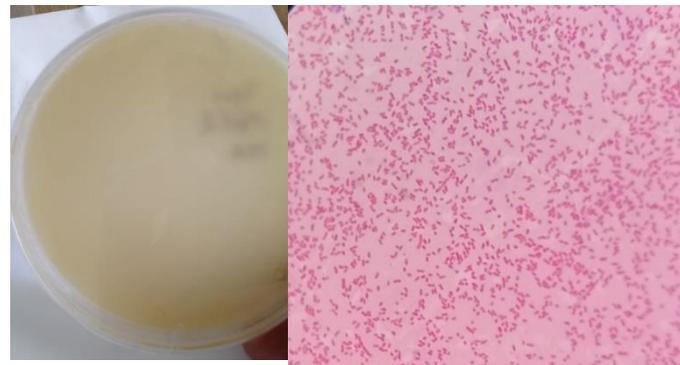
Sedim. Morfología 2 (S2)



Agua, Morfología 1 (A1)



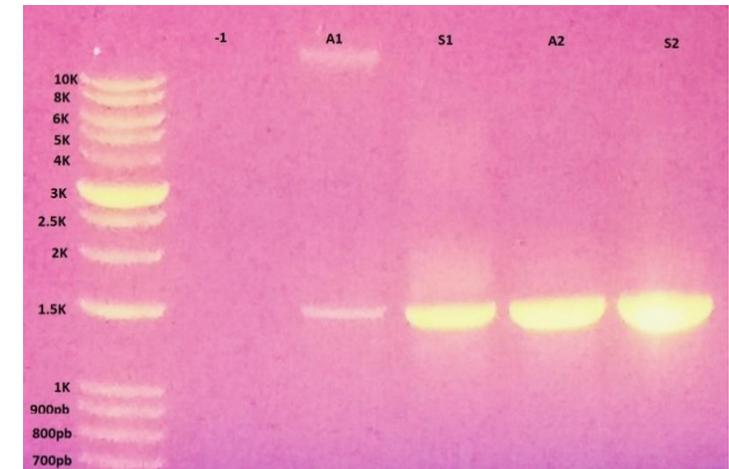
Agua, Morfología 2 (A2)



Cuantificación de ADN y ratios de pureza

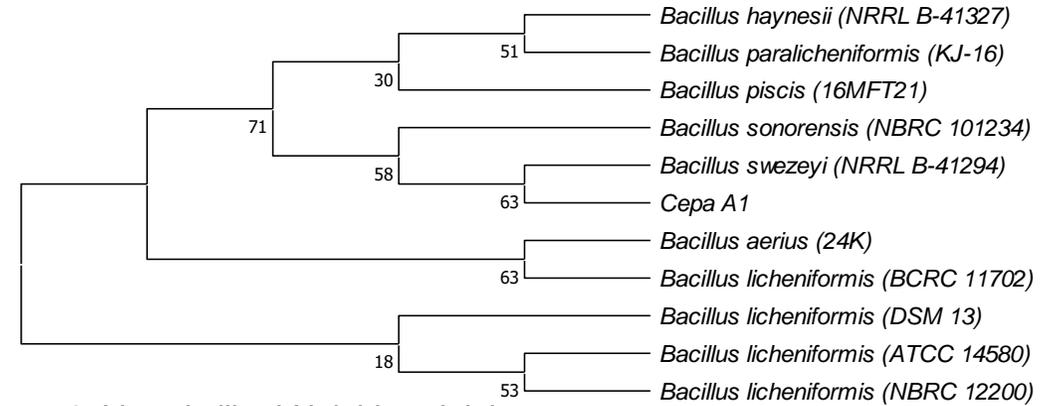
Morfología	Concentración [ng/μL]	260/280	260/230
S1	32.2	2.15	1.60
S2	41.5	2.11	0.92
A1	781.7	2.04	1.60
A2	122.9	2.06	.75

PCR



Microorganismos próximos a la cepa A1

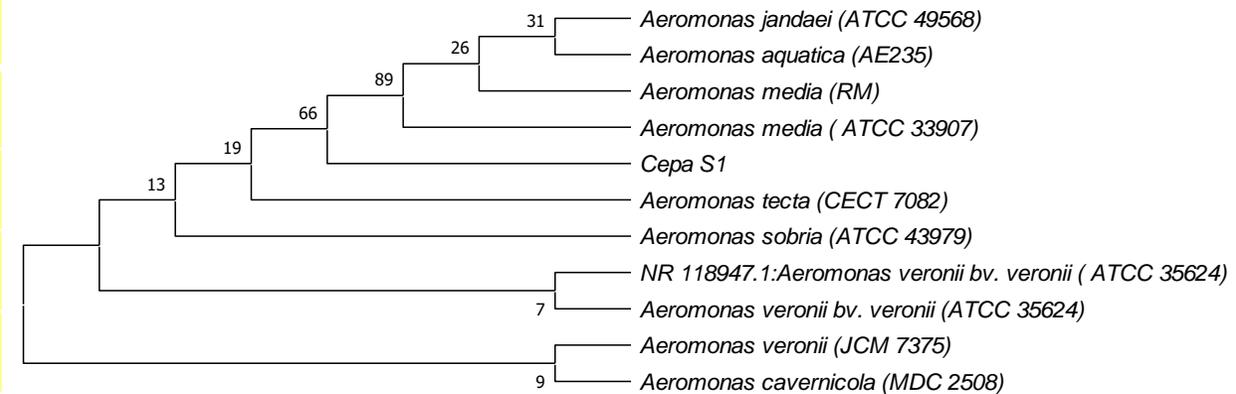
Descripción	Número de acceso	Cobertura de consulta	Porcentaje de Identidad
Bacillus licheniformis (BCRC 11702)	NR_116023.1	100%	99.91%
Bacillus licheniformis (ATCC 14580)	NR_074923.1	100%	99.82%
Bacillus licheniformis (NBRC 12200)	NR_113588.1	100%	99.73%
Bacillus sonorensis (NBRC 101234)	NR_113993.1	100%	99.73%
Bacillus swezeyi (NRRL B-41294)	NR_157608.1	100%	99.55%
Bacillus aerius (24K)	NR_042338.1	100%	99.27%



Tamura 3. Verosimilitud Neighbor-Joining

Microorganismos próximos a la cepa S1

Descripción	Número de acceso	Cobertura de consulta	Porcentaje de identidad
Aeromonas media (ATCC 33907)	NR_119041.1	100%	99.59%
Aeromonas aquatica (AE235)	NR_136829.1	100%	99.59%
Aeromonas tecta (CECT 7082)	NR_118043.1	100%	99.59%
Aeromonas media (RM)	NR_036911.2	100%	99.59%
Aeromonas veronii bv. veronii (ATCC 35624)	NR_119045.1	99%	99.59%

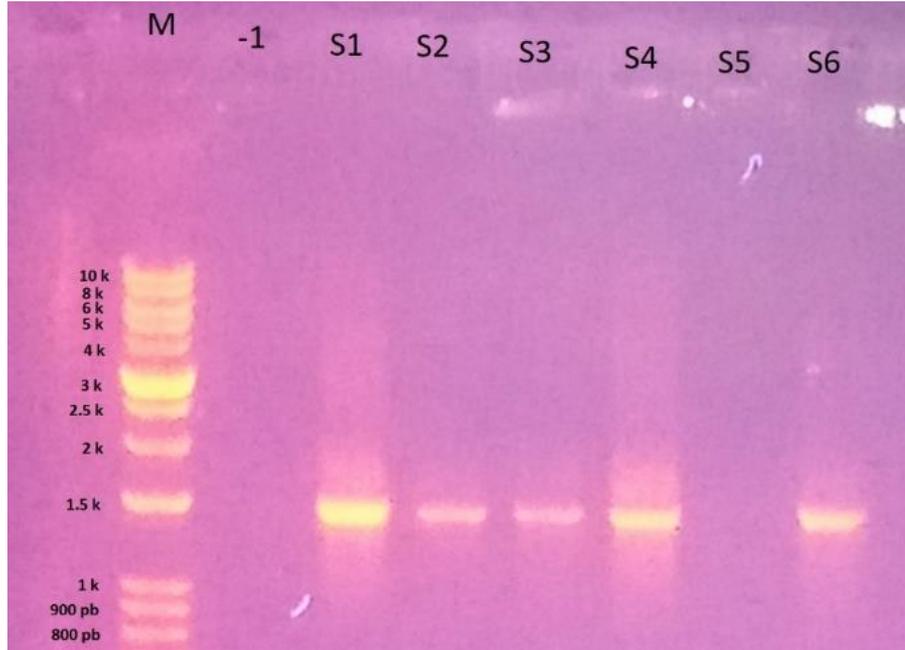


Tamura 3. Verosimilitud Neighbor-Joining



Metataxonómica

Amplificación del gen 16S de extractos de suelo



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentraciones de ADN obtenidos mediante kit Power Soil DNA isolation

Origen	Muestra	Concentración (ng/μL)
Agua	A1	0.01
	A2	0.05
	A3	0.06
Sedimento	S1	0.305
	S4	14
	S6	1.23

Se obtuvieron por medio del instrumento de medición QUBIT



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



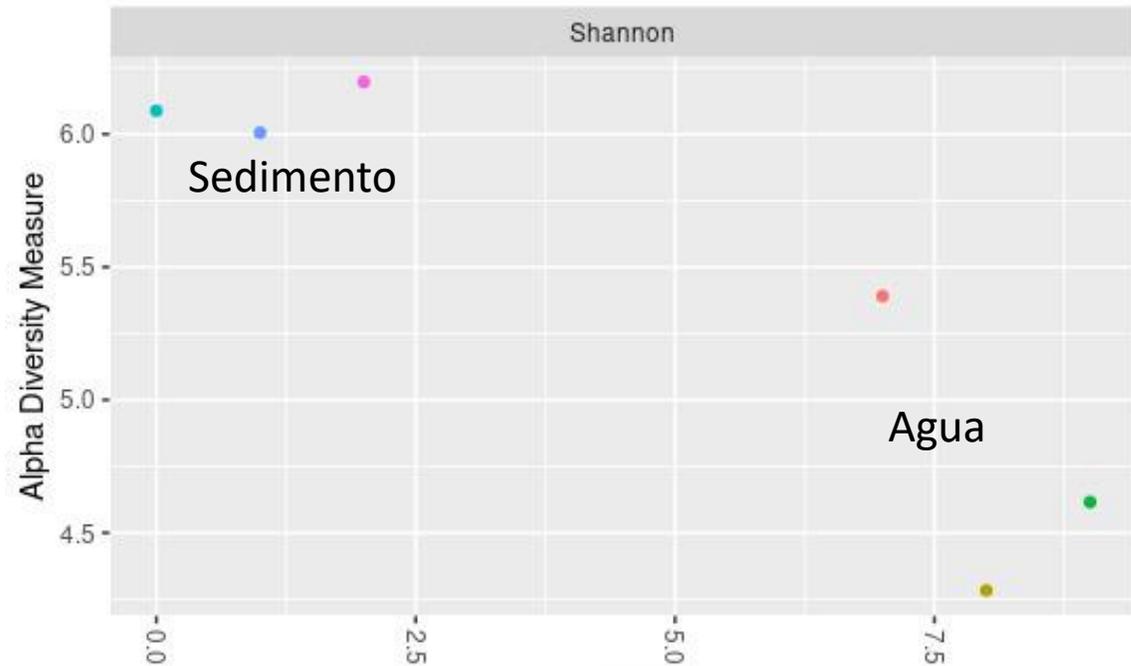
Filtración y
eliminación de
quimeras



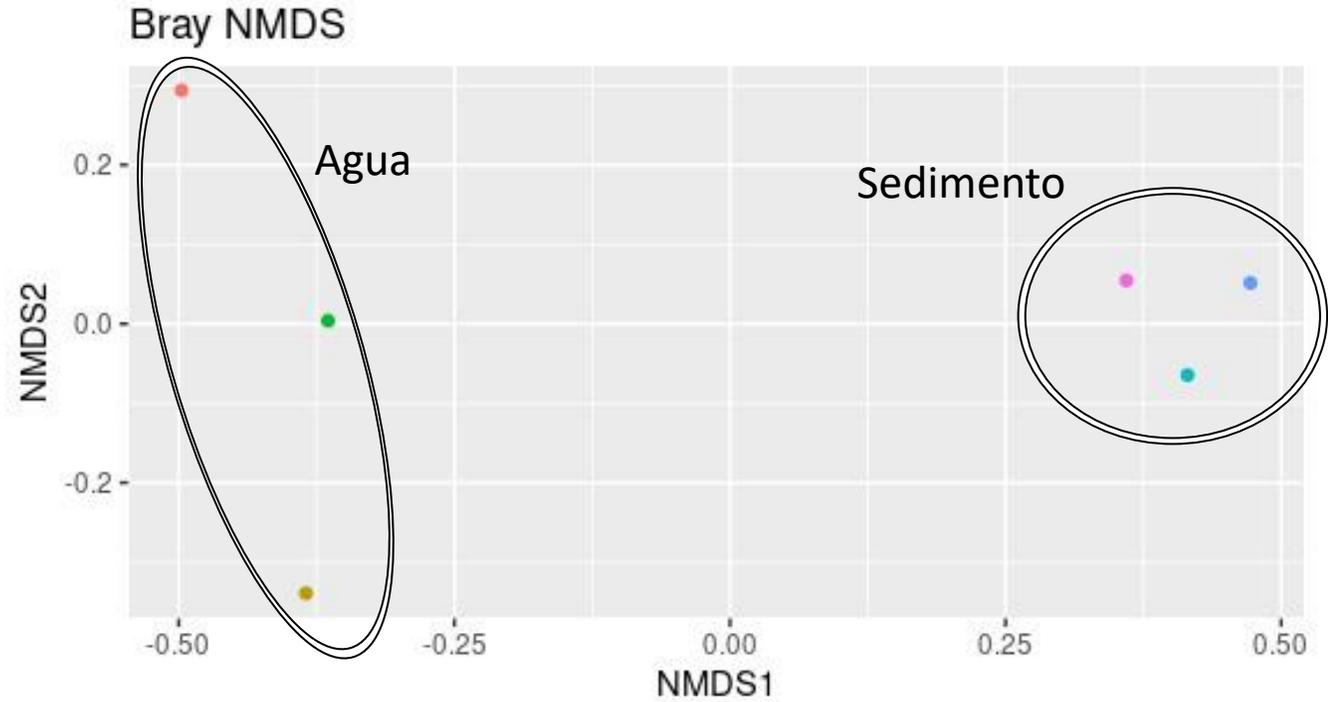
	Sedimento		Agua	
Reino	ASVs	Porcentaje	ASVs	Porcentaje
Bacteria	112 374	99,88%	213 707	99,4%
Eukaryota	71	0,06%	370	0,17%
Archaea	65	0,05%	928	0,43%
Total	112 510		215 005	



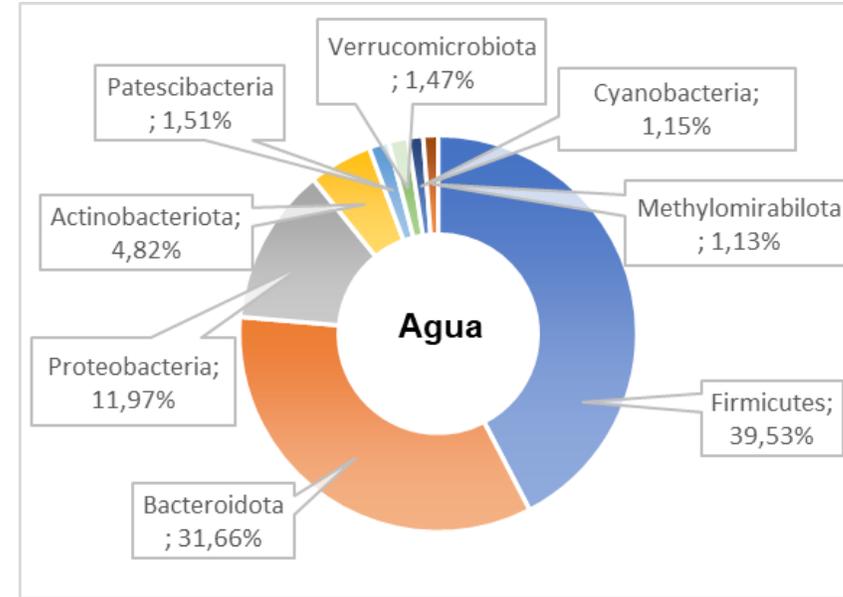
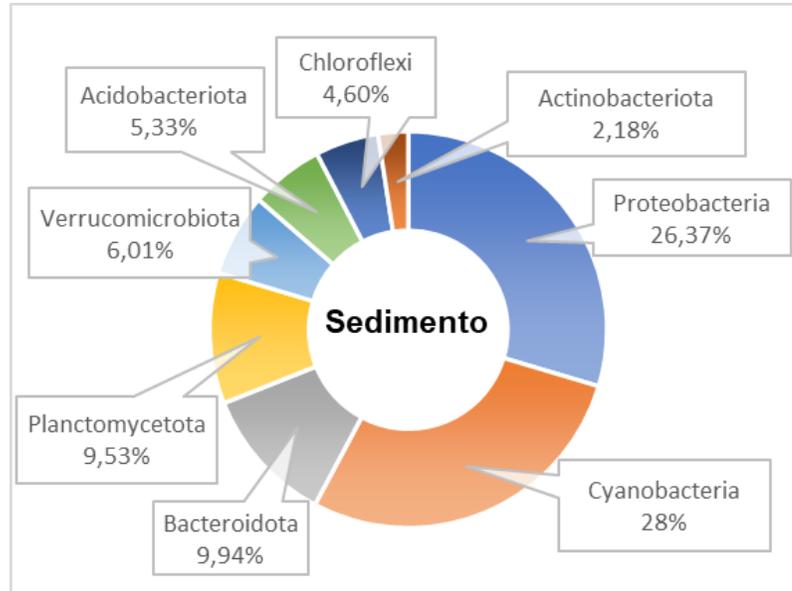
Índice de Shannon



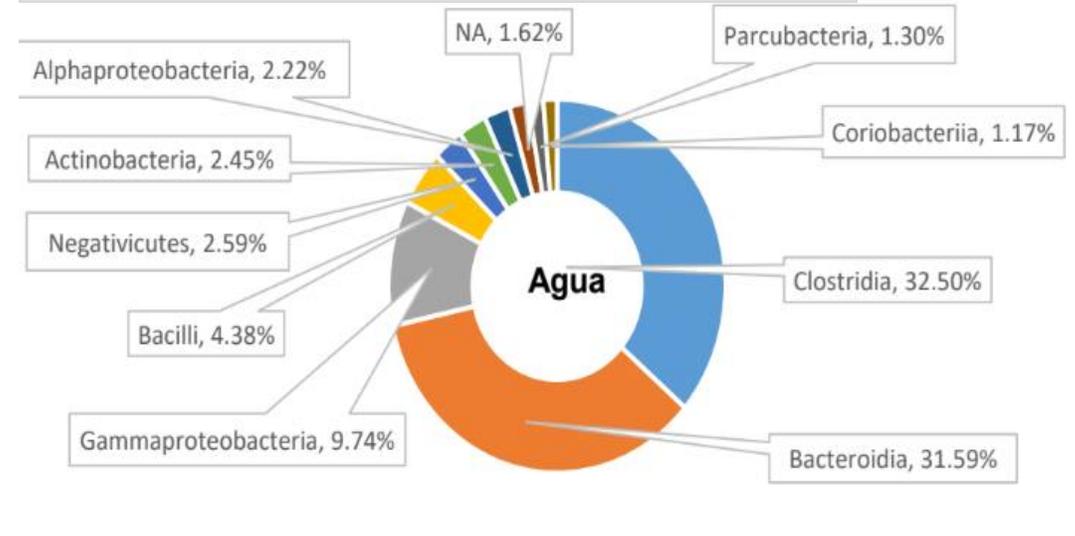
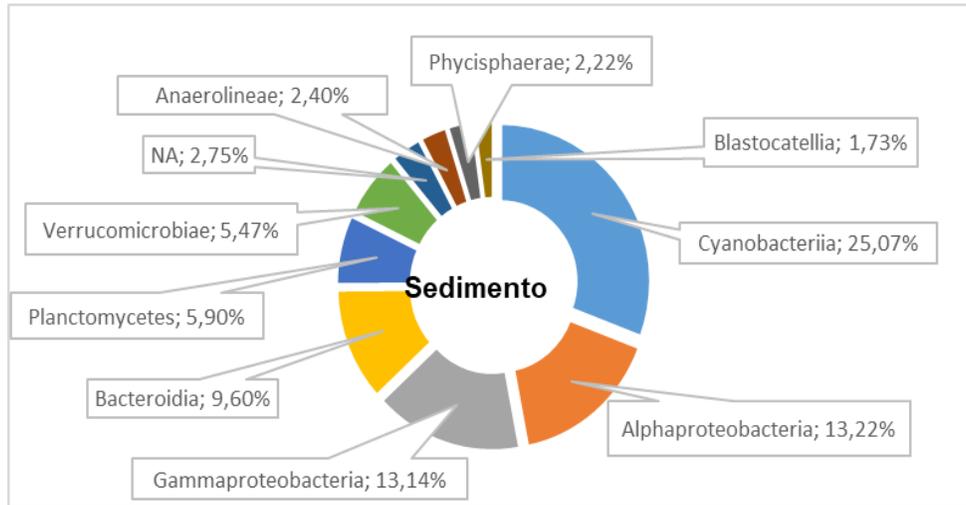
Análisis multidimensional no paramétrico



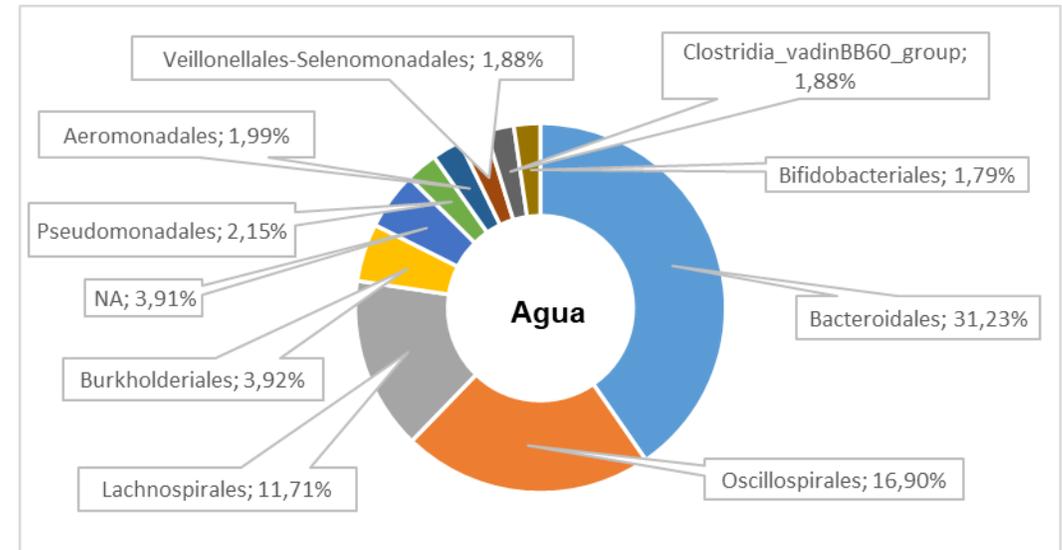
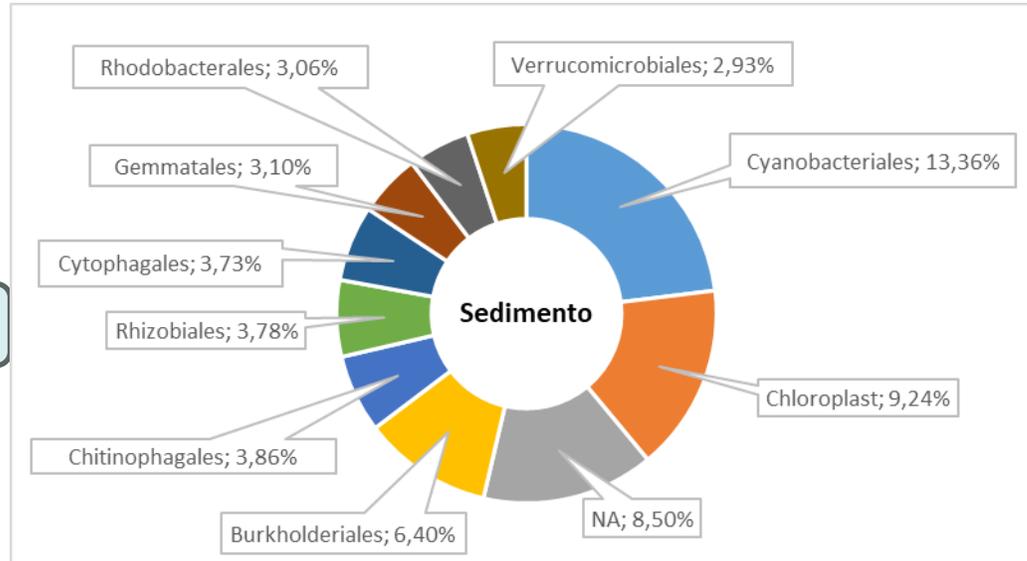
Filo



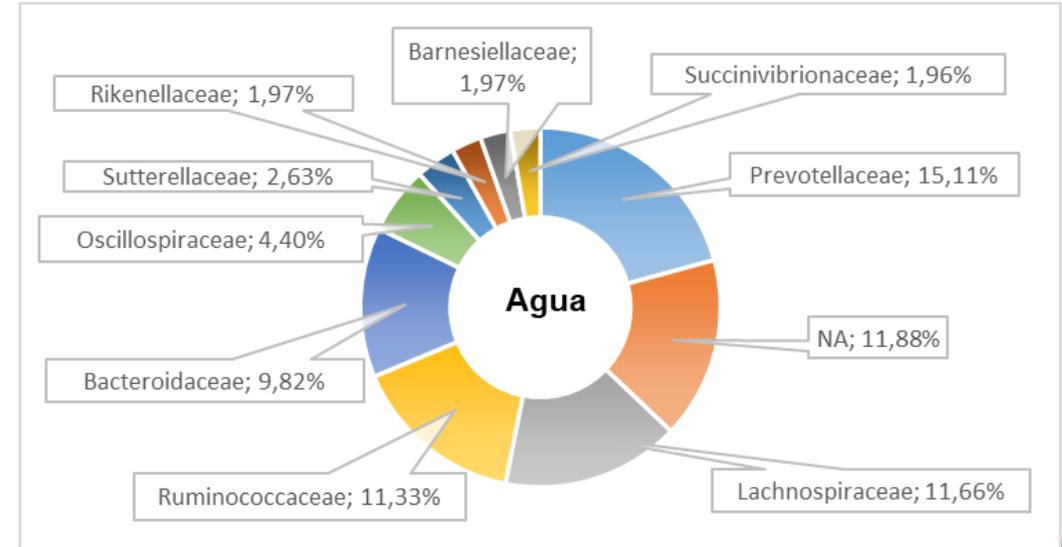
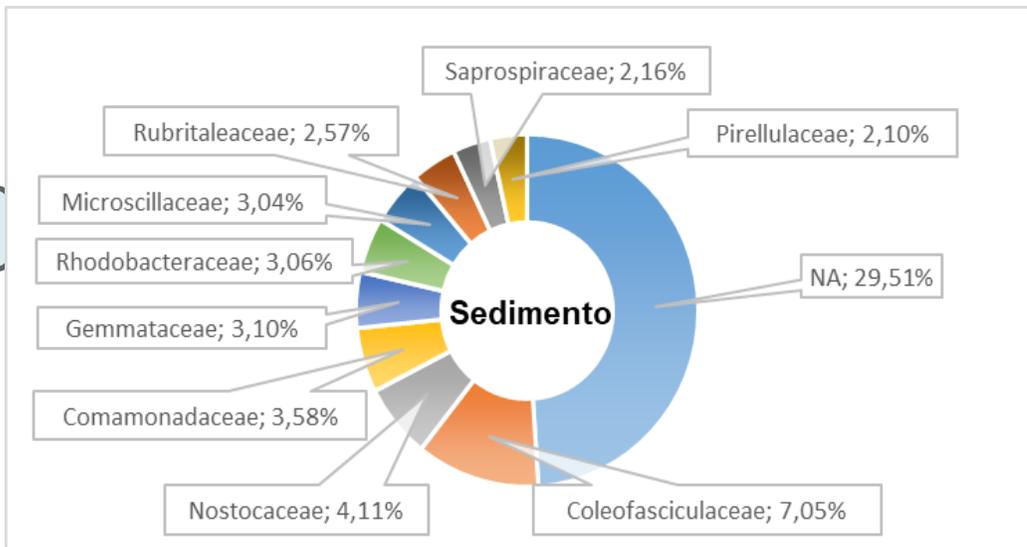
Clase



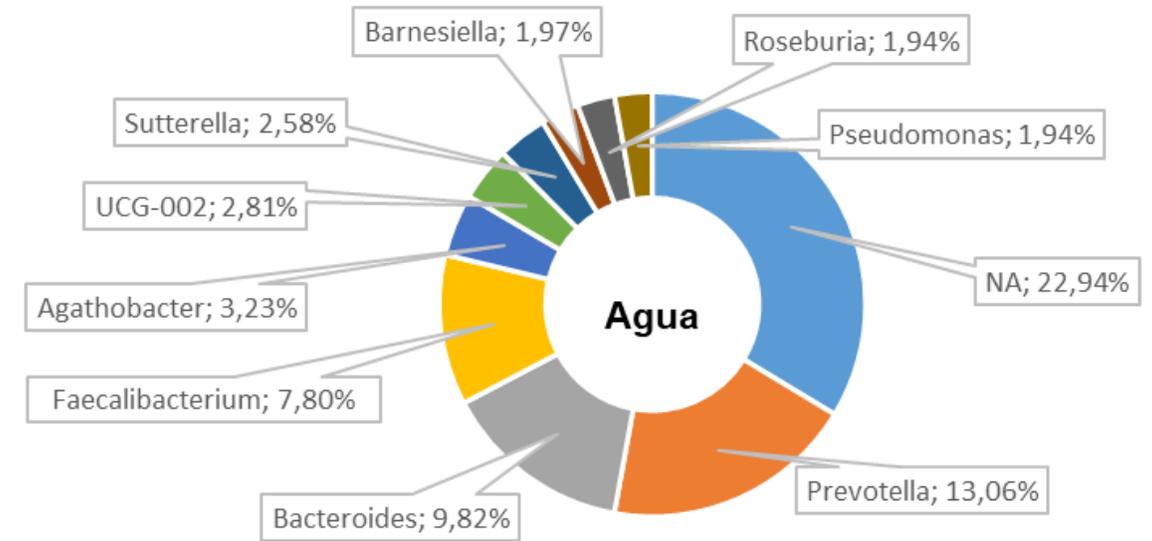
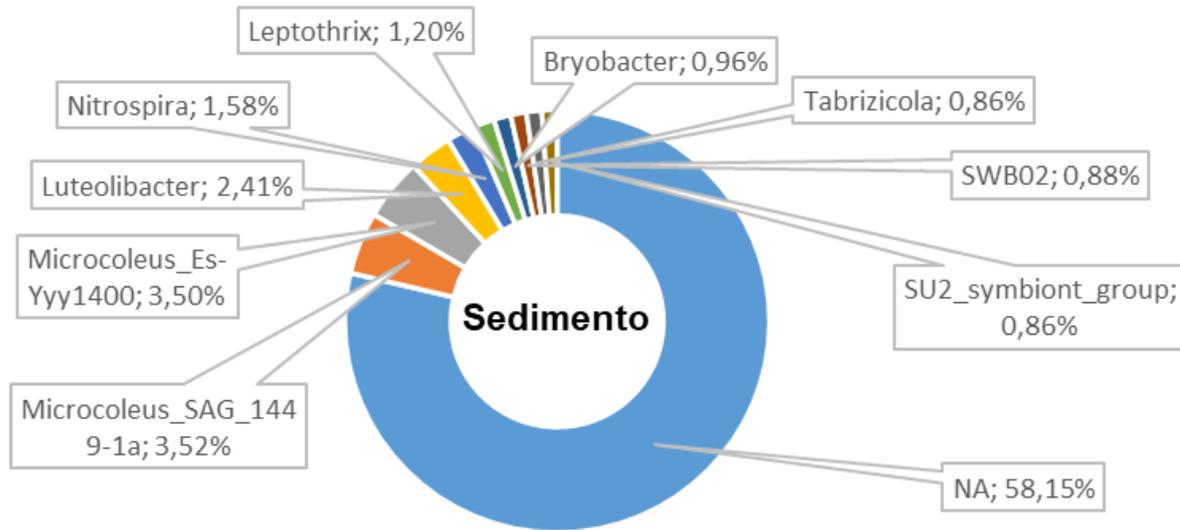
Orden

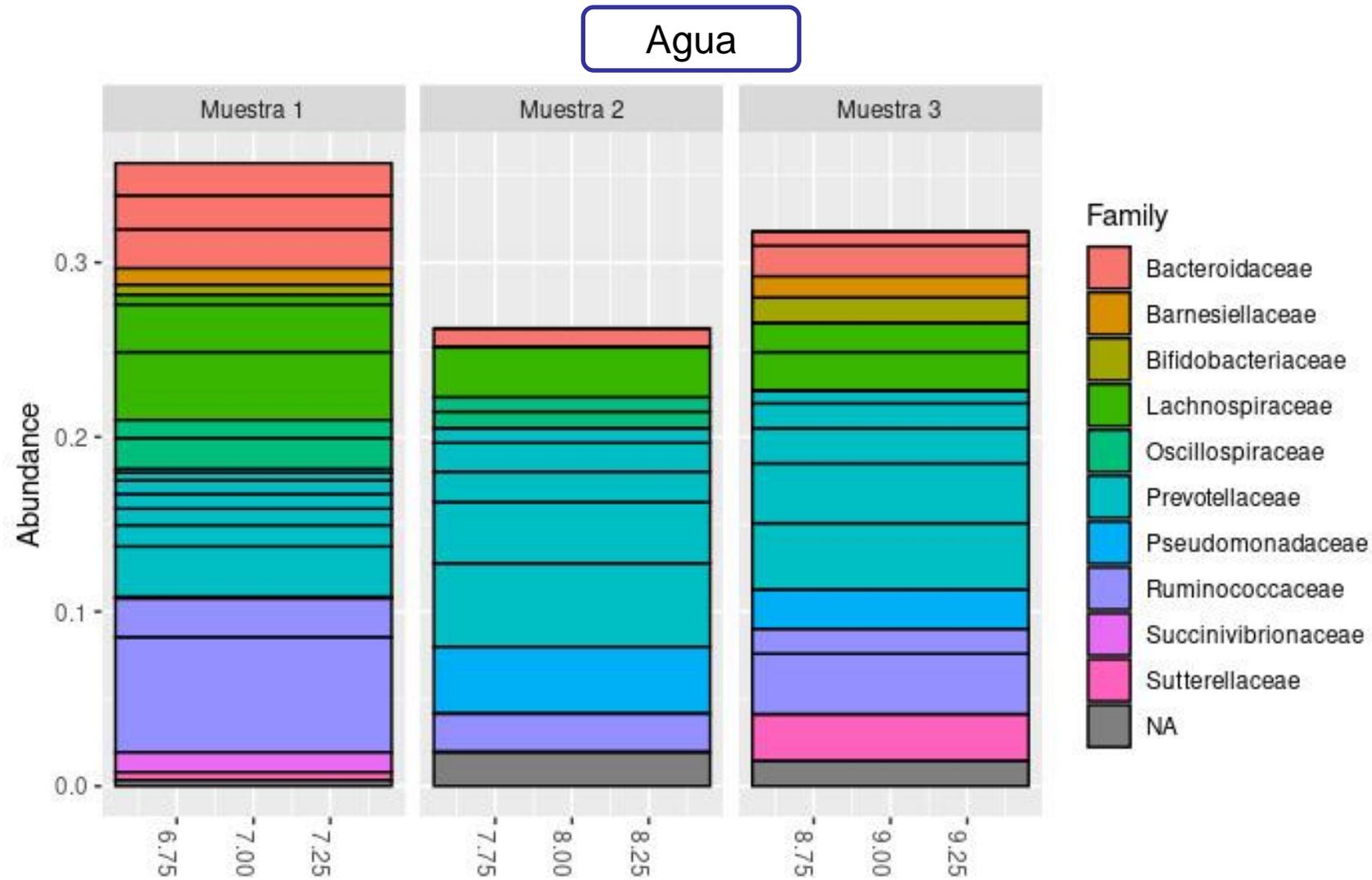


Familia

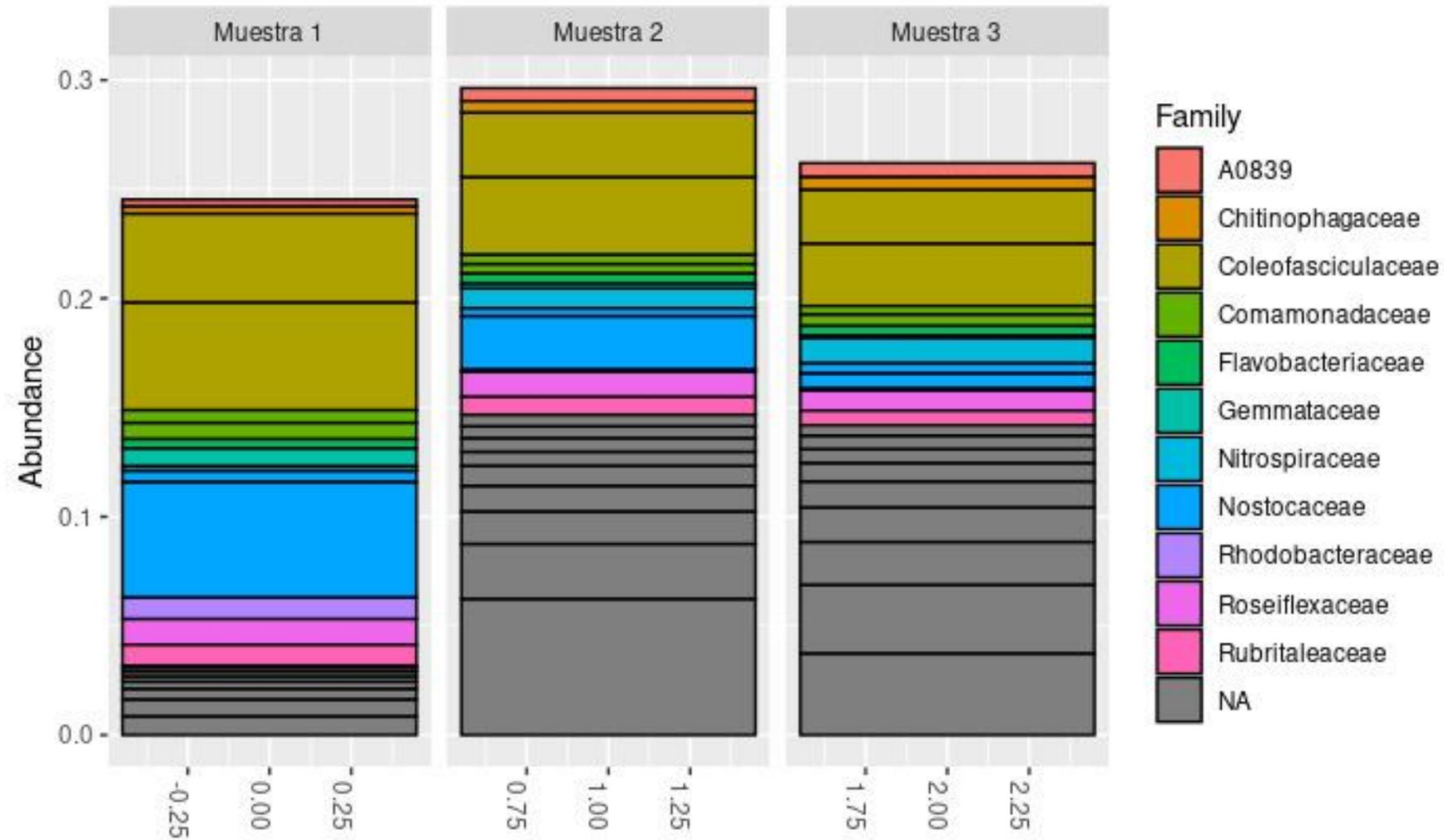


Género

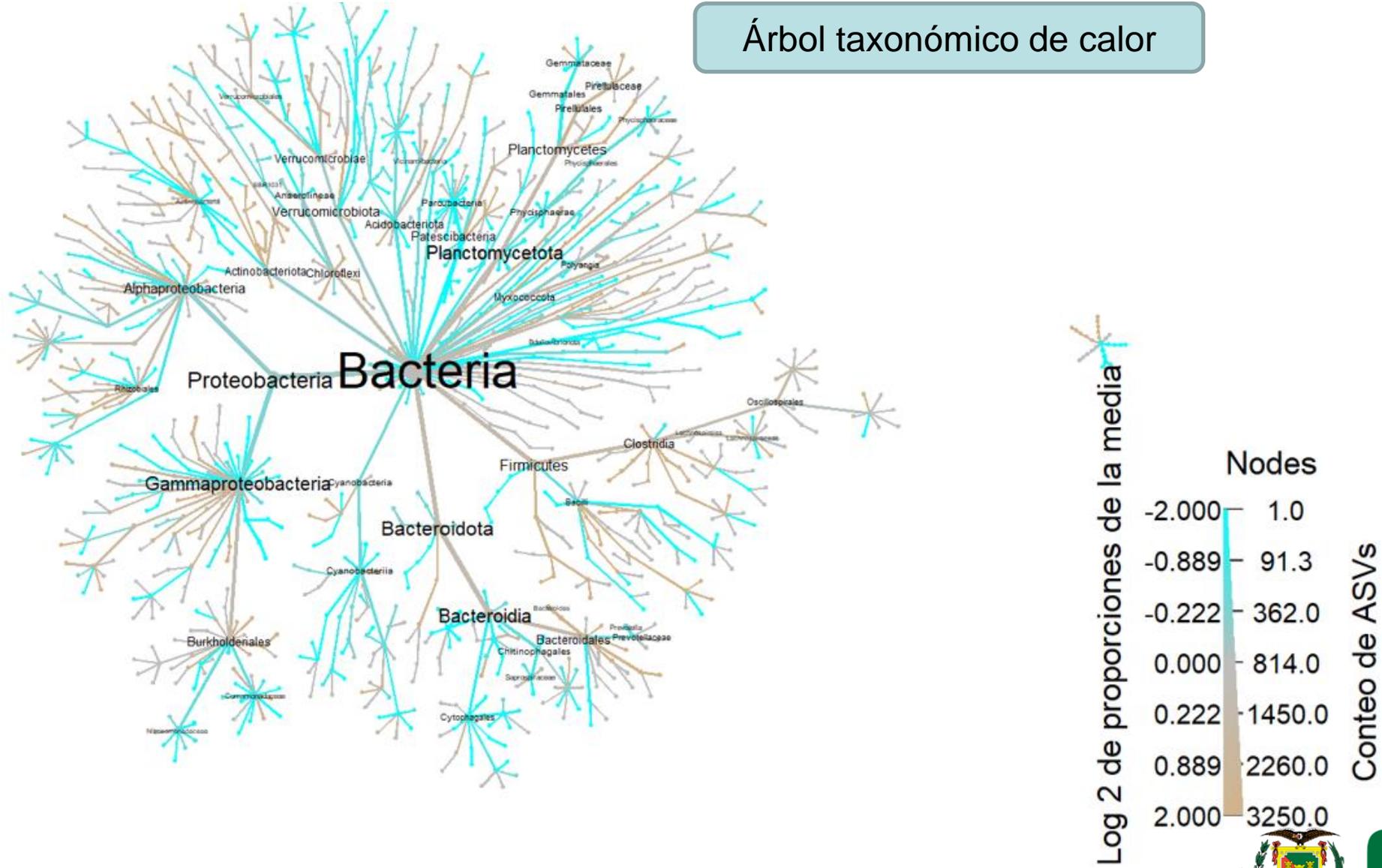




Sedimento



Árbol taxonómico de calor



- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos e Hipótesis**
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 **Resultados y Discusión**
- 5 **Conclusiones**
- 6 **Recomendaciones**
- 7 **Agradecimientos**



La mayoría de las características físico-químicas estimadas cumplen con la normativa del Acuerdo Ministerial 097-A del año 2015, a excepción del oxígeno disuelto (temporada seca: 1.73 mg/L; temporada de lluvia: 1.44 mg/L), arsénico (temporada de lluvia: 0.042 mg/L) y plomo (1.049 mg/L), compuestos que pueden generar complicaciones en el crecimiento de los peces.

Se aislaron cuatro bacterias de las cuales se logró identificar mediante secuenciación Sanger y análisis bioinformático dos bacterias: *Bacillus swezeyi* y *Aeromonas media*.

La bacteria *Bacillus swezeyi* según bibliografía no representa ningún riesgo para la piscicultura, sin embargo, la bacteria *Aeromonas media* es un microorganismo índice que bacterias oportunistas que pueden causar daños en la piscicultura.

La comunidad bacteriana encontrada en el agua corresponde principalmente a los filos Firmicutes (39.59%) y Bacteroidota (31.66%) destacándose por contener microorganismos nocivos para el crecimiento normal de los peces.



La comunidad bacteriana en el sedimento corresponde en mayor cantidad a los filos Proteobacteria (26.37%) y Cyanobacteria (28%).

Los microorganismos identificados a nivel de género con mayor abundancia en agua fue *Prevotella* (13.06%) y en sedimento fue *Microcoleus* (3.52%).

La metataxonómica es una herramienta versátil que permitió identificar bacterias indicadoras de contaminación en la fuente de agua, logrando identificar su posible origen.

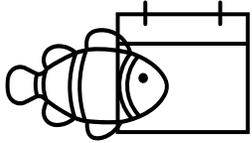


- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos e Hipótesis**
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 **Resultados y Discusión**
- 5 **Conclusiones**
- 6 **Recomendaciones**
- 7 **Agradecimientos**

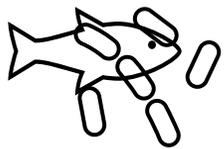




Es necesario realizar un estudio con mayor duración y con otros metales pesados presentes en aguas subterráneas ya que es posible encontrar concentraciones que estén fuera de la norma y por ende afectar a la vida de varios peces utilizados en la piscicultura.



Los parámetros físico-químicos y microbiológicos deben ser monitoreados constantemente en el agua que se usa para la piscicultura para evitar repercusiones a corta y a largo plazo.



Es indispensable realizar un tratamiento para eliminar los contaminantes y microorganismos oportunistas del agua para su posterior aplicación en las actividades de piscicultura.



- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos e Hipótesis**
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 **Resultados y Discusión**
- 5 **Conclusiones**
- 6 **Recomendaciones**
- 7 **Agradecimientos**





Ing. Andrés Izquierdo, PhD. Ing. Francisco Flores, PhD. Ing. Olivia Atiaga, PhD.
Director del proyecto **Docente** **Docente**

Laboratorio de Microbiología Ambiental de CENCINAT de la
 Universidad de las Fuerzas Armadas –” ESPE”

Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad de las
 Fuerzas Armadas –” ESPE”

Familia y Amigos

