



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

Quinga Sangucho, Joseph Stalin

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Izquierdo Romero, Andrés Ricardo, Ph. D.

12 de julio de 2023

1/6/23, 12:19

TRABAJO DE TITULACIÓN JOSEPH QUINGA

## Informe de originalidad

---

### NOMBRE DEL CURSO

REVISIÓN TESIS - JOSEPH QUINGA

### NOMBRE DEL ALUMNO

JOSEPH STALIN QUINGA SANGUCHO

### NOMBRE DEL ARCHIVO

JOSEPH STALIN QUINGA SANGUCHO - Trabajo de titulación

### SE HA CREADO EL INFORME

1 jun 2023

---

### Resumen

Fragmentos marcados	1	0,1 %
Fragmentos citados o entrecomillados	0	0 %

### Coincidencias de la Web

utm.edu.ec	1	0,1 %
------------	---	-------

---

1 fragmento

Fragmento del alumno **MARCADO**

...en la piscicultura. Los síntomas de *F. psychrophilum* son: natación superficial, exoftalmia bilateral, branquias pálidas, abultamiento abdominal y ano hemorrágico

### Mejor coincidencia en la Web

se observan letárgicos, oscuros, anoréxicos y con natación superficial, exoftalmia bilateral, branquias pálidas abultamiento abdominal, ano hemorrágico y protruyente.

Manual de -

UTM [https://utm.edu.ec/fcv/acuicultura/images/acuicultura/pdf\\_revistas/Manual\\_de\\_buenas\\_practicas\\_de\\_manejo\\_para\\_la\\_acuicultura\\_de\\_agua\\_dulce.pdf](https://utm.edu.ec/fcv/acuicultura/images/acuicultura/pdf_revistas/Manual_de_buenas_practicas_de_manejo_para_la_acuicultura_de_agua_dulce.pdf)

---



El trabajo fue realizado por:  
ANDRÉS RICARDO  
IZQUIERDO ROMERO



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de titulación: **“Evaluación físico-química y metataxonómica de una fuente hídrica natural en la localidad de Alchipichí, cantón Quito, para su potencial uso en la piscicultura.”** fue realizado por el señor **Quinga Sangucho Joseph Stalin**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Sangolquí, 1 de junio del 2023**



Firmado electrónicamente por:  
**ANDRÉS RICARDO  
IZQUIERDO ROMERO**

---

**Ing. Andrés Izquierdo, Ph. D**  
**C.C: 1714479505**



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Quinga Sangucho Joseph Stalin** con cédula de ciudadanía Nro. 1727449835 declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "Evaluación físico-química y metataxonómica de una fuente hídrica natural en la localidad de Alchipichí, cantón Quito, para su potencial uso en la piscicultura" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Sangolquí, 12 de julio de 2023**

---

**Quinga Sangucho Joseph Stalin**

C.C: 1727449835



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo, **Quinga Sangucho Joseph Stalin** con cédula de ciudadanía Nro. 1727449835, ID: L00056091 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "Evaluación físico-química y metataxonómica de una fuente hídrica natural en la localidad de Alchipichí, cantón Quito, para su potencial uso en la piscicultura" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 12 de julio de 2023**

---

**Quinga Sangucho Joseph Stalin**

C.C: 1727449835

## Dedicatoria

A mis padres José Quinga y Rosa Sangucho por su apoyo incondicional en mi trayecto estudiantil.

*Quinga Sangucho Joseph Stalin*

## Agradecimientos

Agradezco a mis padres por su guía y consejos.

A mis jóvenes amigos (Abi, Luis, Alejo, Panchito, Alanis) que conocí a lo largo de mi formación académica por sus incontables anécdotas que alegraron mi recorrido por la Universidad.

Gracias al Ing. Andrés Izquierdo, Ph. D. que me permitió usar el laboratorio de Microbiología Ambiental del CENCINAT de la Universidad de las Fuerzas Armadas para poder realizar mi trabajo de investigación permitiéndome aprender y tomar experiencia de mis errores en la ejecución de varios ensayos.

Gracias a la Ing. Olivia Atiaga, Ph. D. por permitirme utilizar el Espectrofotómetro de absorción atómica para realizar varios ensayos y con ello aprender mucho en cuanto al análisis de propiedades físicas y químicas del agua.

Al Ing. Francisco Flores, Ph. D. por sus consejos en la parte de análisis bioinformático el cual me permitió aprender nuevas habilidades que de seguro me serán de utilidad en mi vida profesional.

*Quinga Sangucho Joseph Stalin*

## Índice General

Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de tablas .....	12
Índice de figuras.....	13
Resumen .....	15
Abstract .....	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Formulación del Problema.....	17
Justificación del problema .....	17
Objetivos .....	18
Objetivo General del Proyecto.....	18
Objetivos Específicos .....	19
Hipótesis .....	19
Capítulo II: Marco referencial .....	20
Microorganismos de agua dulce.....	20
Microorganismos autótrofos. ....	21
Microorganismos heterótrofos .....	21
Microorganismos pelágicos .....	21
Microorganismos bentónicos.....	21
Métodos de Identificación Microbiológicos.....	21
Características morfológicas .....	22
Métodos de Identificación Moleculares .....	23
Extracción de ADN.....	23
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	23
Secuenciación Sanger.....	24
Secuenciación masiva Illumina .....	25



Análisis bioinformático .....	28
Metagenómica .....	29
Metataxonómica.....	30
Gen ARNr 16S .....	30
Bases de datos .....	31
Software de análisis de secuenciación .....	31
Flujo de trabajo en la metagenómica .....	32
Calidad de los datos .....	34
Parámetros fisicoquímicos del agua .....	35
Potencial de hidrógeno (pH).....	35
Temperatura.....	35
Oxígeno disuelto.....	36
Parámetros microbianos del agua.....	37
Grupo coliformes.....	37
Enterococos y estreptococos fecales.....	38
Normas de Calidad de Agua .....	38
Agua para la piscicultura .....	39
Enfermedades bacterianas presentes en la piscicultura .....	40
Capítulo III: Metodología.....	43
Lugar de estudio .....	43
Caracterización fisicoquímica.....	43
Fase de campo .....	43
Fase de laboratorio.....	44
Cuantificación de coliformes.....	45
Fase de campo .....	45
Fase de laboratorio.....	46
Aislamiento e identificación de bacterias .....	47

	10
Fase de campo .....	47
Fase de laboratorio .....	48
Análisis bioinformático .....	51
Metabarcoding .....	52
Fase de campo .....	52
Fase de laboratorio .....	52
Análisis bioinformático: Metabarcoding .....	53
Análisis estadístico .....	54
Valores fisicoquímicos .....	54
Número más probable .....	54
Diversidad bacteriana .....	55
Capítulo IV: Resultados .....	56
Parámetros fisicoquímicos .....	56
Inoculación en placas Petrifilm 3M .....	60
Método NMP .....	62
Aislamiento e identificación de bacterias .....	64
Metataxonómica .....	71
Reinos .....	72
Filos .....	73
Clases .....	74
Ordenes .....	75
Familias .....	76
Géneros .....	77
Diversidad bacteriana .....	80
Capítulo V: Discusión .....	84
Análisis físico-químico .....	84
Análisis de coliformes fecales .....	86

Análisis del aislamiento e identificación de bacterias .....	87
Análisis de la metataxonómica .....	88
Composición de la comunidad bacteriana .....	89
Capítulo VI: Conclusiones y recomendaciones.....	93
Conclusiones.....	93
Recomendaciones .....	94
Capítulo VII: Bibliografía.....	95
Apéndices .....	111

### Índice de tablas

<b>Tabla 1</b>	Características de los dominios presentes en el agua dulce .....	20
<b>Tabla 2</b>	Respuestas microbianas a los factores ambientales .....	36
<b>Tabla 3</b>	Criterios de calidad en aguas dulces frías o cálidas .....	39
<b>Tabla 4</b>	Bacterias causantes de enfermedades en peces .....	41
<b>Tabla 5</b>	Preparación del caldo de lauril-triptosa .....	47
<b>Tabla 6</b>	Cantidad de los elementos para la solución madre .....	50
<b>Tabla 7</b>	Cebadores para la PCR .....	50
<b>Tabla 8</b>	Programación para el Termociclador.....	51
<b>Tabla 9</b>	Fórmulas para intervalos de confianza.....	54
<b>Tabla 10</b>	Características fisicoquímicas en época seca y lluviosa .....	56
<b>Tabla 11</b>	Valores obtenidos por el Espectrómetro de absorción atómica.....	60
<b>Tabla 12</b>	Unidades formadoras de colonias .....	60
<b>Tabla 13</b>	Cuantificación de ADN y ratios de pureza.....	68
<b>Tabla 14</b>	Microorganismos próximos a la cepa A1.....	69
<b>Tabla 15</b>	Microorganismos próximos a la cepa S1.....	70
<b>Tabla 16</b>	Concentraciones de ADN obtenidos mediante kit Power Soil DNA isolation .....	72
<b>Tabla 17</b>	Reinos predominantes en sedimento y agua .....	73

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Proceso de la secuenciación Sanger.....	25
<b>Figura 2</b> Identificación de cobertura y profundidad en NGS.....	26
<b>Figura 3</b> Proceso de Secuenciación Illumina .....	27
<b>Figura 4</b> Construcción de un árbol filogenético a partir de una secuencia de datos.....	29
<b>Figura 5</b> Proceso de análisis metagenómico .....	30
<b>Figura 6</b> Estructura del gen ARNr 16S.....	31
<b>Figura 7</b> Flujo de trabajo general para el análisis del microbioma .....	33
<b>Figura 8</b> Efluente hídrico de estudio.....	43
<b>Figura 9</b> Recolección de datos in situ.....	44
<b>Figura 10</b> Espectrómetro de Absorción Atómica.....	45
<b>Figura 11</b> Siembra por el método de raya del cuadrante.....	48
<b>Figura 12</b> Equipo de filtración con membrana.....	49
<b>Figura 13</b> Valores en época seca.....	57
<b>Figura 14</b> Valores en época lluviosa .....	58
<b>Figura 15</b> Diagrama boxplot de parámetros.....	59
<b>Figura 16</b> Coliformes en placas Petrifilm 3M.....	61
<b>Figura 17</b> Tubos en dilución con 10mL de inóculo.....	62
<b>Figura 18</b> Tubos en dilución de 1mL de inóculo .....	63
<b>Figura 19</b> Tubos en dilución de 0.1 mL de inóculo .....	63
<b>Figura 20</b> Fase de confirmación .....	64
<b>Figura 21</b> Cultivo inicial de agua y sedimento.....	65
<b>Figura 22</b> Morfología 1 de cultivo de sedimento .....	65
<b>Figura 23</b> Morfología 2 de cultivo de sedimento .....	66
<b>Figura 24</b> Morfología 1 de cultivo de Agua.....	67
<b>Figura 25</b> Morfología 2 de cultivo de agua .....	67
<b>Figura 26</b> Amplificación del gen 16S de bacterias aisladas.....	68

<b>Figura 27</b> Cladograma de microorganismo homólogos a la cepa A1.....	70
<b>Figura 28</b> Cladograma de microorganismos homólogos a la cepa S1 .....	71
<b>Figura 29</b> Amplificación del gen 16S de extractos de suelo .....	71
<b>Figura 30</b> Filos presentes en sedimento y agua .....	73
<b>Figura 31</b> Clases principales en sedimento y agua .....	74
<b>Figura 32</b> Ordenes principales en sedimento y agua.....	75
<b>Figura 33</b> Familias principales en sedimento y agua.....	76
<b>Figura 34</b> Géneros principales en sedimento y agua.....	77
<b>Figura 35</b> Índice de Shannon.....	80
<b>Figura 36</b> Análisis multidimensional no paramétrico.....	81
<b>Figura 37</b> Composición microbiana a nivel de Familia.....	82
<b>Figura 38</b> Árbol taxonómico de calor.....	83

## Resumen

El creciente desarrollo de la población de Alchipichí-Puello en el área urbana y agricultura hacen necesario la búsqueda de nuevas fuentes de agua que abastezcan a esta población, este sector cuenta con varios efluentes que no han sido estudiados; con este trabajo de investigación se pretende generar datos sobre la calidad físico-química y microbiológica de un efluente hídrico para usar dicha agua en la piscicultura, esta actividad permitiría un crecimiento económico a parte del cultivo de plantas frutales. La presencia de microorganismos oportunistas que impiden el desarrollo de varios peces en conjunto con la presencia de metales pesados en el agua por causas naturales o por actividades del ser humano, hay la posibilidad de que generen estrés en los peces y por tanto su mal desarrollo e incluso su muerte. Para la recolección de datos se seleccionó la temporada de lluvia y sequía del sector y en cuanto al análisis microbiológico se implementaron técnicas dependientes de cultivo y metataxonómica con el fin de hallar la diversidad y abundancia de bacterias del sedimento y agua del lugar de estudio.

La presente investigación determinó la presencia de varios parámetros que no cumplen con la normativa del Acuerdo ministerial 097-A del ministerio del Medio Ambiente tales como: oxígeno disuelto ( temporada de lluvia: 1.73mg/L; temporada seca: 1.44mg/L ), arsénico (temporada de lluvia: 0.042 mg/L) y plomo (1.049 mg/L); se aislaron cuatro bacterias de las cuales solamente dos se identificaron a nivel de género y especie: *Bacillus swezeyi* y *Aeromonas media* de las cuales la segunda es un microorganismo índice de otras bacterias que son un riesgo para la piscicultura; en cuanto a diversidad bacteriana presente, se encontró que la mayoría pertenece a los filos Firmicutes (39.59%) y Bacteriodota (31.66%) y en nivel de género a *Prevotella* (13.06%) y *Microcoleus* (3.52%).

*Palabras clave:* Alchipichí, fuente hídrica, bacteria, físico-química, metataxonómica.

### Abstract

The growing development of the population of Alchipichí-Puélló in the urban area and agriculture make it necessary to search for new sources of water that supply this population, this sector has several effluents that have not been studied; with this research work it is intended to generate data on the physical-chemical and microbiological quality of a water effluent to use such water in fish farming, this activity would allow economic growth apart from the cultivation of fruit plants. The presence of opportunistic microorganisms that prevent the development of several fish together with the presence of heavy metals in the water due to natural causes or human activities, there is the possibility that they generate stress in the fish and therefore their poor development and even their death. For the data collection, the rainy and dry season of the sector was selected and as for the microbiological analysis, culture-dependent and metataxonomic techniques were implemented in order to find the diversity and abundance of bacteria in the sediment and water of the study site.

The present investigation determined the presence of several parameters that do not comply with the regulations of the Ministerial Agreement 097-A of the Ministry of the Environment such as: dissolved oxygen (rainy season: 1.73mg/L; dry season: 1.44 mg/L), arsenic (rainy season: 0.042 mg/L) and lead (1.049 mg/L); four bacteria were isolated of which only two were identified at the genus and species level: *Bacillus swezeyi* and *Aeromonas media* of which the second is a microorganism affects other bacteria that are a risk to fish farming; in terms of bacterial diversity present, it was found that the majority belongs to the phyla Firmicutes (39.59%) and Bacteriodota (31.66%) and at the genus level to *Prevotella* (13.06%) and *Microcoleus* (3.52%).

*Key words:* Alchipichí, water source, bacteria, physico-chemistry, metataxonomic.



## Capítulo I: Introducción

### Formulación del Problema

Debido al incremento de urbanización y áreas de cultivo en el sector de Puéllaro y sectores aledaños es necesario encontrar nuevas fuentes hídricas que tengan buenos parámetros para poder sostener una buena calidad de vida mediante su consumo y utilización tanto en la agricultura como en la piscicultura; esta localidad cuenta con varias fuentes de agua que no han tenido un estudio apropiado tanto en sus características físicas y químicas como en los aspectos microbiológicos y por lo tanto la gran mayoría de este recurso no es tratado para su respectivo uso; esta situación puede generar inconvenientes en la elaboración de diversos productos e inclusive en actividades recreacionales. A través del estudio de la presencia de cepas bacterias y parámetros físico-químicos del agua es posible obtener información que permita determinar la calidad del agua y en consecuencia se podrá elegir los posibles tratamiento respectivos para cumplir las normas de calidad de agua para el uso responsable y seguro en la localidad de Alchipichí perteneciente a Puéllaro, este trabajo contribuye con datos relevantes para futuros proyectos que favorezcan a la comunidad ubicada alrededor de la fuente hídrica en las coordenadas 0°01'35.2"N 78°24'08.8"W.

### Justificación del problema

En los procesos de desarrollo de la agricultura y la salud pública se comenzó a realizar estudios microbiológicos y físico-químicos para estimar la calidad del agua en distintas partes del mundo y con los resultados obtenidos se diseñaron tratamientos adecuados para su aprovechamiento (Daou et al., 2020). Varias investigaciones realizadas en cuerpos de agua permitieron la disminución del riesgo de enfermedades que afectan al ser humano indirectamente (Ferreira et al., 2022) por este motivo; actualmente se estudian en conjunto diversos factores tales como características microbiológicas y químicas que sean beneficiosas en la agricultura, piscicultura, uso recreativo y consumo humano (Liao et al., 2022).

La población de Alchipichí-Puello al no tener este tipo de estudios de sus recursos hídricos que según Hezacar (2019) este sector posee numerosas efluentes que son utilizados en distintas actividades agrícolas sin su respectivo tratamiento, aumentan las posibilidades de zoonosis, por ello se busca realizar la identificación de bacterias a fin de obtener datos para apoyar en la buena gestión de calidad de agua de uno de los efluentes hídricos ubicados en la localidad de Alchipichí; con los datos recolectados se puede evitar varios problemas producidos por bacterias patógenas presentes en el agua dado que en los alrededores del efluente hay mürcielos; en relación a enfermedades de plantas con importancia agrícola del sector (tomate de árbol, aguacate, mandarina, maíz) se podría evaluar los riesgos al utilizar el agua directamente del efluente y valorar los peligros para la inocuidad de los alimentos producidos.

Es indispensable realizar el estudio porque con ello se impulsará el desarrollo de estrategias adecuadas para cumplir los parámetros de calidad del agua que exigen las normativas nacionales; con ello se fomenta el crecimiento económico de la zona pudiendo generar otro tipo de actividades como la piscicultura que es muy deseada en la localidad de Alchipichí para fomentar la actividad turística. Teniendo datos sobre las bacterias presentes en el agua del efluente se podría evitar pérdidas económicas por muerte de alevines provocadas por bacterias perjudiciales para su desarrollo y a su vez se puede maximizar la producción de peces de agua dulce de clima templado-frío.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General del Proyecto**

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**

1. Estimar propiedades físico-químicas de la fuente hídrica tanto en época lluviosa como en seca.
2. Aislar e identificar bacterias mesófilas mediante métodos microbiológicos y moleculares.
3. 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.

## Capítulo II: Marco referencial

### Microorganismos de agua dulce

Los microorganismos predominantes en el agua dulce son los pertenecientes a los dominios Eukarya, Archeas y Bacterias, cada uno de estos se los puede distinguir por las características estructurales y bioquímicas; el dominio Bacteria es el que se encuentra mayormente presente en los lugares de agua dulce conteniendo al reino Eubacteria que incluye actinomicetos, algas verde-azules y bacterias (Sigee, 2005).

**Tabla 1**

*Características de los dominios presentes en el agua dulce*

Características	Dominios		
	Bacteria	Archea	Eukarya
Reino	Eubacteria	Archeabacteria	Fungi, Protista, Plantae, Animalia
Nivel de organización celular	Procariota	Procariota	Eucariote
Núcleo con membrana	Ausente	Ausente	Presente
Organelos con membrana	Ausente	Ausente	Presente
Ribosomas	70s	70s	80s
Pared celular de peptidoglicano	Presente	Ausente	Ausente
Lípidos de membrana	Ligado a ésteres No ramificado	Ligado a ésteres Ramificados	Ligado a ésteres No ramificado
ARNt iniciador	Formil-metionina	Metionina	Metionina
Operones	Si	Si	No
Plásmidos	Si	Si	Rara vez
RNA polimerasa	Uno	Algunos	Tres
Sensible al cloranfenicol y a la estreptomina	Si	No	No
Ribosomas sensibles a la toxina diftérica	No	Si	Si
Algunas son etanógenas	No	Si	No
Algunas fijan nitrógeno	Si	Si	No
Algunos realizan la fotosíntesis basada en la clorofilos	Si	No	Si

*Nota.* Adaptado de Sigee (2005)

Los microorganismos de agua dulce pueden dividirse según su estado trófico, es decir, su actividad alimentaria como autótrofos y heterótrofos; los organismos también se clasifican en

base al lugar en que pasan su mayor parte del tiempo en su estado de crecimiento como pelágicos (ubicados en la masa de agua principal) y bentónicos (localizados en los sedimentos).

### ***Microorganismos autótrofos.***

Forman sus compuestos a partir de la fijación de dióxido de carbono y obtienen sus nutrientes a partir de compuestos inorgánicos simples. En este puesto se encuentran bacterias fotosintéticas y microalgas, estos forman la biomasa en lugares de agua dulce (Benson, 2001; Sigeo, 2005).

### ***Microorganismos heterótrofos***

Obtienen su carbono a partir de compuestos orgánicos (polisacáridos, carbohidratos, aminoácidos, péptidos y proteínas), la gran mayoría de los microorganismos de agua dulce pertenecen a este grupo (Benson, 2001; Sigeo, 2005).

### ***Microorganismos pelágicos***

Estos son prácticamente plantónicos, por lo que suelen tener estructuras específicas para moverse o mantener su posición en el cuerpo de agua, en esta clasificación se hallan bacterias y microalgas (Sigeo, 2005).

### ***Microorganismos bentónicos***

Se caracterizan por ser capaces de descomponer materia orgánica sedimentada, debido a esta característica se suelen ubicar en el interior del sedimento, pero también se encuentran en la superficie (Sigeo, 2005).

## **Métodos de Identificación Microbiológicos**

Para la identificación adecuada de un microorganismo se debe comprender sus características morfológicas, criterios de cultivo y su fisiología mediante pruebas bioquímicas; a

más de ello también se puede realizar varias pruebas con el propósito de determinar los tipos de enzimas que produce y sus características de crecimiento (Benson, 2001).

### **Características morfológicas**

La tinción Gram ayuda a recolectar información sobre las características morfológicas (cocos bacilos, espirilos...) como la presencia de un glicocálix, endosporas o gránulos citoplasmáticos y con ello se establece características clave de la bacteria desconocida. Con un frotis fino, se puede saber la disposición de las células, en otras palabras, si las células se presentan solas, en parejas, en masas o en cadenas (Benson, 2001); para determinar la movilidad de microorganismos no patógenos, el método denominado gota colgante que se prepara a partir de un cultivo de caldo es la forma preferida y en caso de ser patógenos es preferible utilizar el medio SIM (Benson, 2001; Brown & Smith, 2015).

En el estudio de diferentes muestras de aguas ambientales se ha considerado la presencia de *E. coli* como un indicador de contaminación fecal por tanto es necesario conocer ciertas características de esta bacteria como: es perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* en la clase *Gamma-proteobacteria*, se clasifica como una bacteria Gram-negativa y tiene la forma de un bastón (2.0-6.0  $\mu\text{m}$  de longitud y 1.1-1.5  $\mu\text{m}$  de ancho) con sus extremos redondeados, no forma esporas y se mueve gracias a la presencia de flagelos periticos (Percival & Williams, 2014) ; tiene una capacidad de crecimiento rápido (replicación alrededor de 20 minutos) y para su detección se aplican métodos basados en la reacción de su enzima específica  $\beta$ -glucuronidasa tales como el agar mTEC modificado e incluso se han elaborado kits con fines comerciales para determinar de forma cuantitativa la presencia *E. coli* en muestras de agua (Jang et al., 2017).

## **Métodos de Identificación Moleculares**

### ***Extracción de ADN***

Generalmente para la extracción del ADN de una célula se procede primero con la lisis de sus membranas, seguida de la separación de los distintos elementos que no se requieren como las proteínas y carbohidratos, para la desintegración de la pared celular se utiliza enzimas (generalmente lisozima) y para la membrana se implementa detergentes, el más común es el dodecil sulfato de sodio (SDS); el ARN se elimina mediante la adición de ribonucleasa (RNasa) que ha sido tratada térmicamente para inactivar cualquier contaminante de la DNasa (Hofmann & Clokie, 2018); después se separa el ADN de los oligorribonucleótidos por su alto peso molecular y la solubilidad que tiene en los disolventes no polares (agua o alcohol); las proteínas son degradadas por la agregación de la proteinasa-K, se puede mencionar que la forma más común para eliminar las proteínas es la desnaturalización y la extracción en una fase orgánica mediante el uso de fenol y cloroformo (Das & Dash, 2015).

### ***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

La PCR se utiliza para amplificar un fragmento específico de ADN a partir de un ADN molde, este proceso requiere conocer las secuencias que flanquean el tramo de ADN que se quiere amplificar, dado que con esta información se puede sintetizar los cebadores oligonucleótidos (forward y reverse); estos se añaden a la reacción en exceso para que cada uno de los cebadores esté siempre disponible tras la etapa de desnaturalización (Nicholl, 2008).

La PCR consta de tres etapas que tienen tiempos y temperaturas específicas, denominados: desnaturalización, alineamiento y extensión; cada uno de estos pasos se repite entre 30 y 40 veces, y cada repetición se denomina ciclo (Hofmann & Clokie, 2018); según Sambrook & Russell (2001) esta técnica consta de siete elementos principales:

1. ADN polimerasa termoestable que cataliza la síntesis de una nueva cadena de ADN, la enzima de uso común es la Taq polimerasa cuya actividad específica es de alrededor de 80000 U/mg de proteína y comienza a disminuir su actividad cuando el producto amplificado de la reacción es de  $1.4 \times 10^{12}$  a  $7 \times 10^{12}$  moléculas.
2. Un par de oligonucleótidos sintéticos (primers) para la síntesis de ADN, se los debe diseñar de manera cuidadosa para obtener el producto deseado en alta concentración.
3. Deoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs), estos deben estar en una cantidad equimolar de dATP, dTTP y dGTP y su concentración debe estar entre 200 y 250  $\mu\text{M}$  y para evitar problemas de abastecimiento se deben almacenar a  $-20^\circ\text{C}$  en pequeñas alícuotas.
4. Cationes divalentes para que la actividad del ADN polimerasa, generalmente se utiliza  $\text{Mg}^{2+}$  debido a que se une a los dNTPs por este motivo la concentración molar del magnesio debe exceder la concentración de los trifosfatos.
5. Buffer para mantener el pH, ajustado a un pH entre 8.3 y 8.8 a temperatura ambiente.
6. Cationes monovalentes, una PCR estándar debe contener 50mM para una amplificación correcta de un segmento de ADN mayor a 500bp de largo.
7. DNA molde que debe tener la secuencia objetivo, se puede mejorar la zona de amplificación a través de la digestión de enzimas de restricción que no corten en la secuencia objetivo.

### ***Secuenciación Sanger***

Para la implementación de esta técnica se debe tener un ADN molde, ADN polimerasa, cebadores de secuenciación, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y dideoxinucleótidos trifosfatos (ddNTPs) marcados con fluorescencia; el proceso inicia con la separación de la doble cadena con el aumento de temperatura, posterior a esto el cebador y la ADN polimerasa se unen a la hebra de ADN plantilla en consecuencia se unen varios dNTPs a través de enlaces fosfodiéster para formar la nueva cadena y cuando un ddNTP se incorpora a la cadena

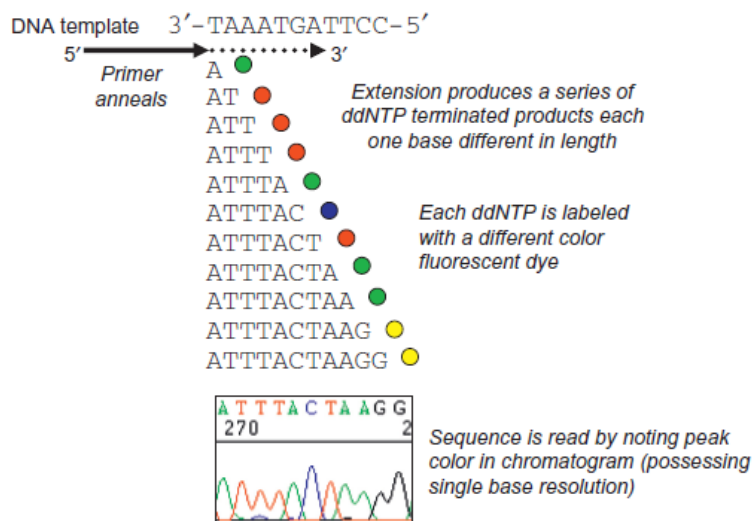


se detiene el progreso de la síntesis debido a que estos no presentan el grupo 3' hidroxilo que forma el enlace fosfodiéster (Carson et al., 2019; Hofmann & Clokie, 2018; Nicholl, 2008).

La adición de un ddNTP es aleatoria en la reacción de secuenciación por ende se obtiene copias parciales del ADN plantilla, cada uno de estos fragmentos inician en el extremo 5' con el cebador y termina donde se añade un ddNTP; la determinación de la secuencia se hace en función de las longitudes de onda que emiten estos fragmentos, se obtiene como resultado un electroferograma donde se muestran una serie de picos que reflejan la secuencia de ADN sintetizada (Carson et al., 2019).

## Figura 1

### Proceso de la secuenciación Sanger



Nota. Adaptado de Carson et al. (2019).

### Secuenciación masiva Illumina

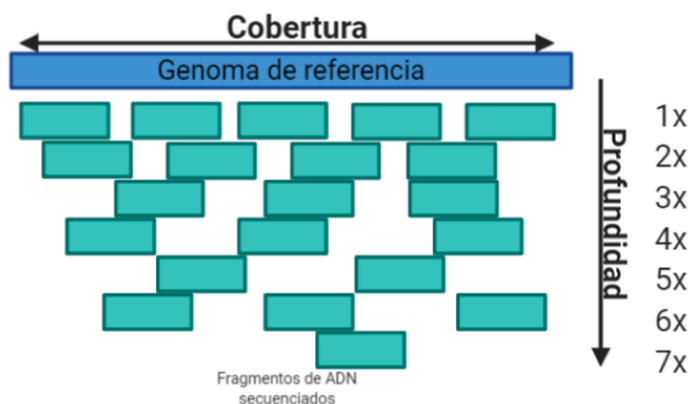
En la secuenciación de nueva generación (NGS) se diseñaron varias tecnologías para secuencias varios segmentos de ADN en paralelo y en forma masiva con una disminución significativa de tiempo y costos; según Rubio et al. (2020) es importante saber dos conceptos fundamentales en este tipo de procesos: la cobertura que representa el porcentaje de bases del genoma de referencia que se ponen a secuenciar una cantidad de veces definida, mientras que

la profundidad indica el número promedio de veces que cada base del genoma es secuenciada en los fragmentos de ADN (Figura 2).

La secuenciación Illumina se basa en la secuenciación por síntesis (SBS) dicho de otro modo, permite añadir nucleótidos a través de enzimas en conjunto con esquemas de detección que posibilita a los programas del secuenciador recopilar datos al mismo tiempo que se realiza la síntesis enzimática de un ADN molde (McCombie et al., 2019). Varias de las tecnologías pertenecientes a NGS siguen una metodología similar donde primero se segmenta el ADN en distintos fragmentos (bibliotecas de secuenciación), luego se marca el ADN con primers que indican el punto de partida de la replicación, a continuación se amplifica los fragmentos marcados por medio de reacciones en cadena de polimerasa, después se hace una lectura de los fragmentos de ADN y finalmente se reconstruye la secuencia completa con la ayuda de secuencias de referencia y se generan ficheros de información (McCombie et al., 2019; Rubio et al., 2020).

## Figura 2

*Identificación de cobertura y profundidad en NGS*



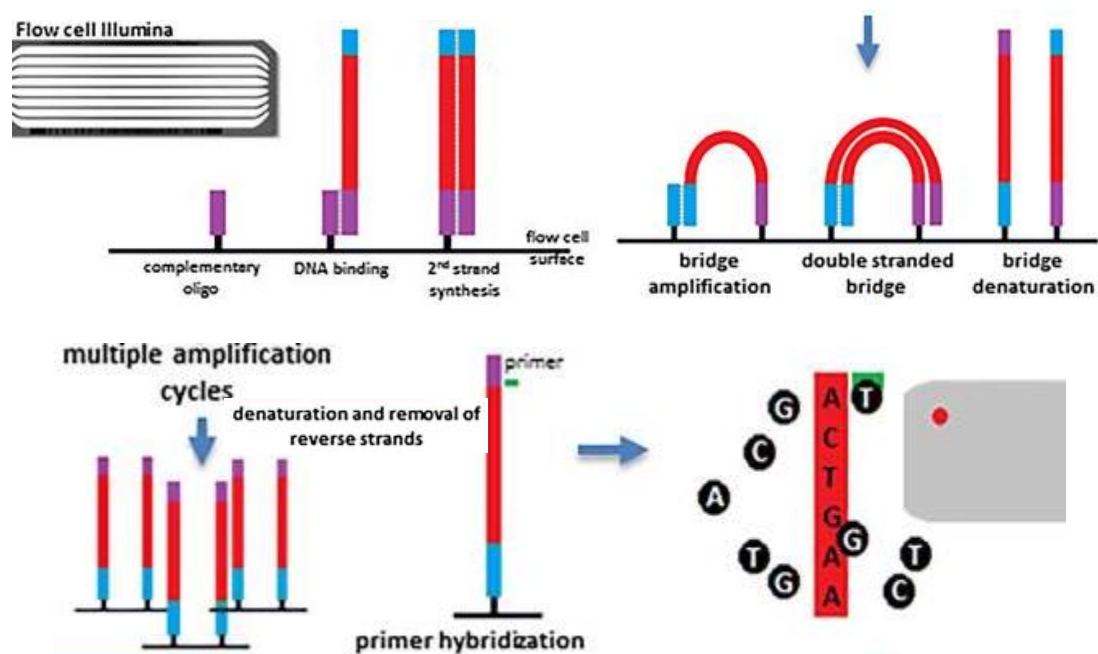
*Nota.* Adaptado de Rubio et al. (2020).

La reacción de secuenciación de Illumina se lleva a cabo en una celda de flujo la cual contiene canales microfluídicos llamados carriles que son el lugar donde se recopila las señales

de secuenciación a través de un escaneo; los carriles con millones de micro pozos están recubiertos por secuencias de oligonucleótidos complementarios a las secuencias de anclaje y cuando las bibliotecas de secuenciación se cargan en cada uno de los carriles, se unen a las secuencias de oligonucleótidos inmovilizándose en la superficie, en seguida cada plantilla se amplifica clonalmente por el proceso llamado amplificación de puente generando hasta mil copias iguales a la plantilla molde formando un clúster (X. Wang, 2016). Después de la amplificación clonal se quitan las hebras reversas, en ese momento se aplica nucleótidos modificados con fluorescencia, eso hace que cuando una base se una a la síntesis emita una señal para su identificación (Ballard et al., 2020; Rubio et al., 2020; X. Wang, 2016). Este proceso se puede observar en la Figura 3.

### Figura 3

#### *Proceso de Secuenciación Illumina*



*Nota.* Adaptado de Ballard et al. (2020).

El enfoque de lectura corta de Illumina, es decir, la generación de lecturas cortas de 150pb; hace posible la secuenciación del genoma completo de varios microorganismos a gran

escala ya que utiliza nucleótidos reversibles marcados con fluorescencia en plantillas de ADN amplificadas e inmovilizadas en la superficie de una celda de flujo de vidrio (Yoshinaga et al., 2018), la adición de un nucleótido bloquea la incorporación posterior de otros nucleótidos con esto se interrumpe la síntesis y se libera una señal fluorescente que es única para cada tipo de nucleótido; después de la toma de imágenes, el grupo de bloqueo se elimina y deja las hebras de ADN listas para la próxima incorporación de nucleótidos. Estos pasos continúan durante un número específico de rondas, lo que permite longitudes de lectura de 60 a 150 bases (Escalante et al., 2014).

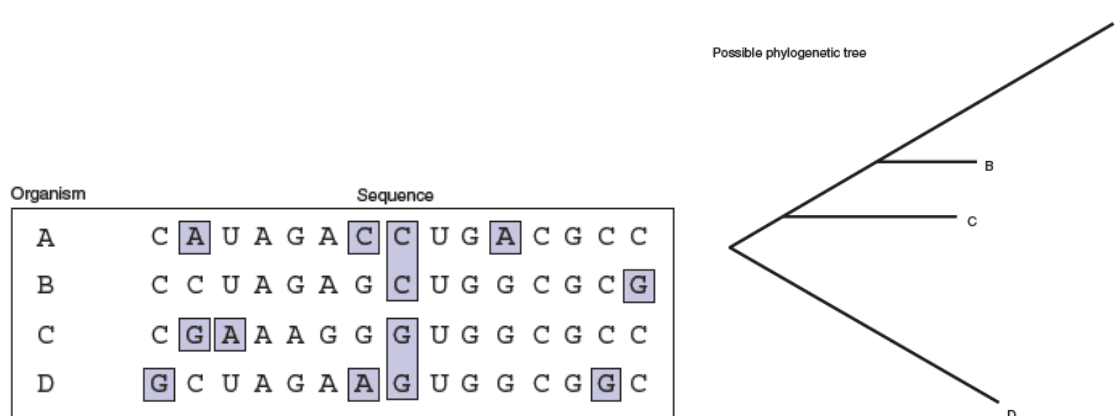
### ***Análisis bioinformático***

Actualmente gracias a la bioinformática los investigadores pueden analizar directamente los datos a escala del genoma para establecer con mayor confianza las relaciones entre las cepas bacterianas, así como obtener información detallada sobre las causas genéticas de diversidad de cepas (Carrizo et al., 2018; Pallen, 2016); para establecer dichas relaciones existen bases de datos (RDP, NCBI) que permiten hacer la comparación y varias herramientas que son de gran utilidad como BLAST y MEGA 7; en el caso de microorganismos se hace el análisis del gen 16S rRNA que evoluciona a un ritmo constante, por lo que también sirve como un reloj filogenético (Jünemann et al., 2017).

**Arboles filogenéticos.** Son una forma de representación matemática que intenta relacionar ancestros en común entre varios organismos para ello es indispensable cuantificar el grado de similitud entre microorganismos, esto se hace mediante un alineamiento de secuencias; se lo puede considerar también como una forma de representar el proceso de evolución de millones de años entre diversos organismos (A. D. Scott & Baum, 2016; Weyenberg & Yoshida, 2016).

## Figura 4

*Construcción de un árbol filogenético a partir de una secuencia de datos*

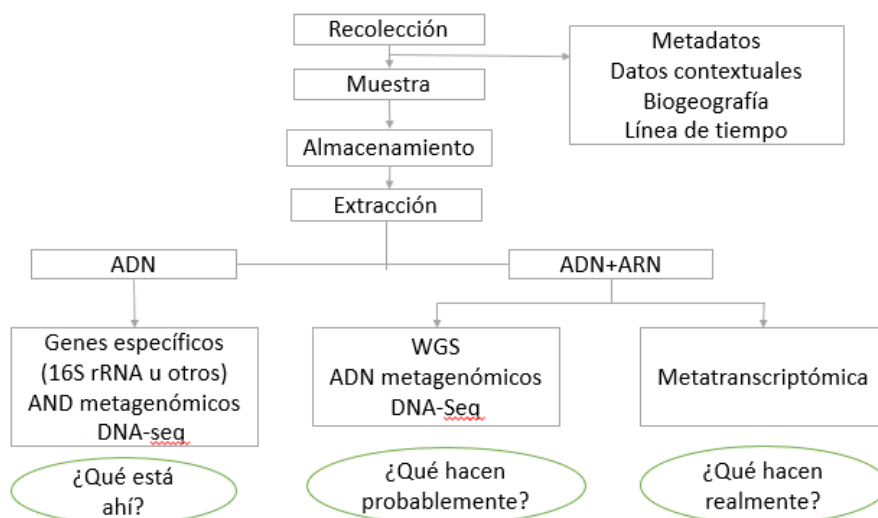


*Nota.* Adaptado de Dale & Park (2010)

## Metagenómica

Este procedimiento está basado en la información que se puede obtener a partir del ADN que se encuentre en una muestra, en otras palabras, datos taxonómicos y filogenéticos; según el tipo de microorganismo que se desee identificar (bacterias, virus, algas, hongos...) se debe adecuar los protocolos de extracción de ADN. Se usa ampliamente para tener referencias sobre la diversidad y abundancia relativa de microorganismos presentes en fuentes de agua (Hong et al., 2020).

La metagenómica está asociada a la secuenciación de nueva generación en todas sus implementaciones; estas nuevas tecnologías, van más allá del enfoque de secuenciación de ADN basado en Sanger, es la profundidad de la secuenciación de nucleótidos por muestra que permite extraer información de los microorganismos que se encuentran en abundancia o cuales son los más significativos (Izard & Rivera, 2015).

**Figura 5***Proceso de análisis metagenómico*

*Nota.* Adaptado de Izard & Rivera (2015)

**Metataxonómica**

También denominado como metabarcodificación (metabarcoding) que hace referencia al estudio de la composición poblacional, taxonomía y abundancia, dentro de estas técnicas se encuentra la metabarcodificación del ARNr 16S que utiliza un fragmento del gen ribosómico 16S para obtener un perfil de diversidad de la comunidad bacteriana en un entorno específico e incluso se ha implementado en el estudio de comunidades bacterianas en ríos (Romero et al., 2021).

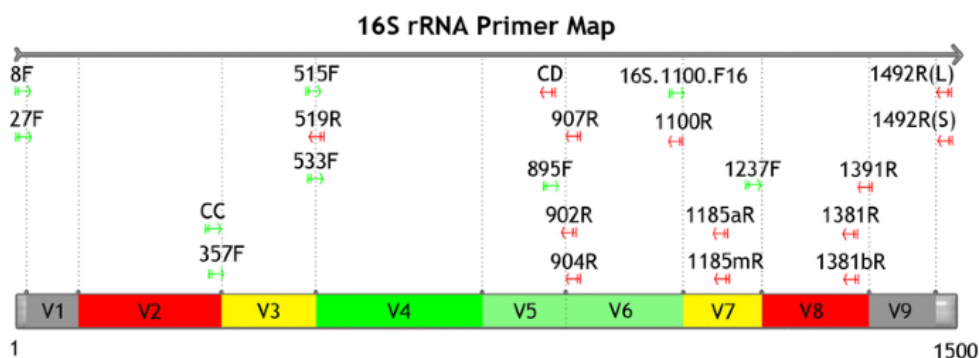
**Gen ARNr 16S**

La identificación de especies bacterianas se realiza mediante la amplificación del gen 16s ribosomal seguida de su comparación con una base de datos para determinar su similitud y homología, este gen es un componente de la subunidad pequeña 30S del ribosoma procariota que contiene 1,542 kb. Las ventajas que brinda en identificación bacterias incluye: la presencia del gen en todos los organismos que desempeñan la misma función, la secuencia del gen está suficientemente conservada y el tamaño de 1500 bp, que es relativamente fácil de secuenciar y

lo suficientemente grande como para contener bastante información con la finalidad de realizar la identificación y el análisis de la filogenia mediante una base de datos, este proceso inició con Carl Woese que cambió la definición del linaje principal en la evolución de los microorganismos (Das & Dash, 2015).

## Figura 6

### Estructura del gen ARNr 16S



*Nota.* Las regiones verdes son preferibles para el análisis filogenético de bacterias desconocidas. Adaptado de Yang et al. (2016)

### Bases de datos

En el estudio de procariotas con el gen 16S; se ha implementado en varias investigaciones los denominados SILVAngs para el análisis de datos utilizando los archivos fastq comprimidos a través de canales de software automáticos en línea basada en la base de datos SILVA rDNA en la configuración predeterminada. Cada lectura se alinea con el ARNr de SILVA SSU utilizando el alineador incremental SILVA (SINA v1.2.10). Para este proceso es indispensable descartar lecturas cortas y con más del 2% de homopolímeros (Mahmoud & Magdy, 2021).

### Software de análisis de secuenciación

El desarrollo de software para el análisis de datos de secuenciación de 16S rRNA crece continuamente y se han propuesto muchos métodos, Según los estudios de Straub et al. (2020) se pueden distinguir tres tipos principales de métodos:

1. Agrupación de lecturas de secuenciación para obtener unidades taxonómicas operativas (OTU),
2. Generación de variantes de secuencia de amplicón (ASV) utilizando lecturas con corrección de errores
3. Clasificación taxonómica directa de lecturas en bruto.

Varias herramientas juntan secuencias con una similitud aproximada o mayor al 97%, estas se denominan unidades taxonómicas operativas (OTUs); entre las más utilizadas se encuentran: “Quantitative Insights Into Microbial Ecology” (QIIME) y Mothur. Actualmente se han desarrollado nuevos y novedosos procesos de tratamiento de datos como el algoritmo de eliminación de ruido de amplificación divisiva (DADA2) o Deblur que son capaces de convertir y calcular variantes de secuencia de amplicón (ASVs) que permiten obtener información con mayor precisión y detalle (Bolyen et al., 2019; Mahmoud & Magdy, 2021; Straub et al., 2020).

Los ASVs indican secuencias de amplicón reales con una resolución de un solo nucleótido producidas a partir del gen 16S rRNA de cada especie presente en la muestra que se está analizando, esto puede ocasionar la representación de una especie con varios ASVs; la implementación de este método de agrupamiento y eliminación de interferencias en los datos obtenidos de una secuenciación masiva utilizados en programas bioinformáticos como DADA2, en conjunto con el cálculo de OTU puede generar información relevante para detectar cambios en la comunidad microbiana debido a que los enfoques de agrupación son complementarios (Djemiel et al., 2020).

### ***Flujo de trabajo en la metagenómica***

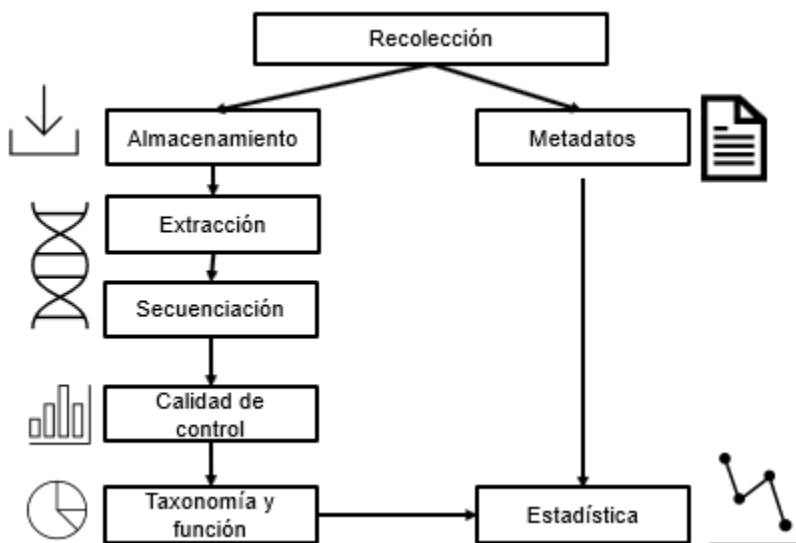
Existen varios tipos de análisis de datos metagenómicos, pero cada uno de estos contiene semejanzas en las líneas analíticas y experimentales, según Baxevanis et al. (2020) cada tipo de análisis presentan en común los siguientes aspectos:



- La recolección de la muestra debe seguir un protocolo estándar, se puede incluir la filtración por el tamaño, el hisopado, entre otros. Se debe tomar en cuenta las condiciones de almacenamiento a razón de evitar el deterioro del ADN.
- Selección de la técnica para la extracción de ADN depende del hábitat de origen de la muestra; en caso de que la muestra sea de suelo hay que considerar la presencia de ácidos húmicos que interfieren con las enzimas empleadas en la preparación y secuenciación de la muestra por tal motivo también se debe realizar la purificación del ADN con anterioridad.
- Elaboración de una biblioteca de secuencias, una colección de ADN preparado y derivado de los genomas que se van a ser secuenciados; este paso implica la amplificación del ADN mediante PCR, el cizallamiento del ADN, incorporación de adaptadores para agilizar la secuenciación y la adición de fragmentos distintivos de ADN cortos para múltiples muestras que se estén procesando al mismo tiempo.

**Figura 7**

*Flujo de trabajo general para el análisis del microbioma*



*Nota.* Adaptado de Baxevanis et al. (2020)

### **Calidad de los datos**

Debido a los diferentes tipos de error que se genera en distintas plataformas de secuenciación de ADN, es esencial determinar la calidad de los datos en los estudios metagenómicos en función de las métricas de calidad, esto se realiza como una primera fase y generalmente los resultados son presentados en formato FASTQ; el control de calidad mide un conjunto de estadísticos para estimar si los datos son adecuados para el análisis posterior, dicho de otra manera, las pruebas de control de calidad incluyen el recuento de la frecuencia relativa de nucleótidos en cada posición de un conjunto de lecturas con el fin de identificar las posibles desviaciones de las frecuencias esperadas (Smith & de Sena Brandine, 2019).

La puntuación Phred es una medida de calidad que se utiliza ampliamente, indica la probabilidad de que una base sea identificada de forma errónea, vale decir que se utiliza para identificar las posiciones de las bases con una calidad global baja con relación a la muestra analizada permitiendo hallar una posible degradación en la secuenciación (Baxevanis et al., 2020; Smith & de Sena Brandine, 2019).

La puntuación de calidad de una secuenciación de una base determinada (Q score), es la probabilidad estimada de que la llamada de base sea errónea, por lo tanto, la puntuación más alta indica una menor probabilidad de error (Mahmoud & Magdy, 2021). El contenido GC también es un parámetro que puede afectar la calidad de los datos de la secuenciación de nueva generación (Izard & Rivera, 2015).

Hay varios programas que se han vuelto de uso general para generar informes de control de calidad a partir de los archivos FASTQ (salida estándar en bruto de los secuenciadores), la herramienta FastQC desarrollada por el Instituto Babraham permite observar una serie de parámetros que permiten analizar la calidad de los datos de forma gráfica y mas no modificar los archivos en cuestión (Curry, 2020).

## **Parámetros fisicoquímicos del agua**

El hábitat de los microorganismos depende de varios factores como el pH, temperatura, la penetración de luz y el oxígeno disuelto (Tabla 2), siendo este último el más importante dado que las fuentes de agua pueden estar limitados por el oxígeno (Willey et al., 2020).

### ***Potencial de hidrógeno (pH)***

El pH de los sistemas de agua dulce es débilmente amortiguado por los minerales del suelo y por la eliminación del CO<sub>2</sub> que es realizada por los microorganismos fotoautótrofos (diatomeas) en conjunto con aquellas bacterias que se encargan de la fijación del CO<sub>2</sub> (Willey et al., 2020). Esta característica tiene un efecto directo sobre los tratamientos de coagulación y desinfección con productos que tienen cloro en su composición, este parámetro es relativamente estable en periodos cortos de tiempo y si cambia es posible que esté ocurriendo un proceso importante (OECD, 2003).

Los microorganismos pueden crecer en un amplio rango de pH, aunque hay límites de tolerancia para este proceso, cuando se genera un cambio fuerte de pH en el entorno daña la membrana plasmática o detiene la actividad enzimática haciendo que mueran los microbios; la mayoría de los microorganismos es afectado drásticamente si su pH interno decrece a valores menores de 5.0 a 5.5 (Karki et al., 2020; Willey et al., 2020).

### ***Temperatura***

Los microorganismos son muy susceptibles a la temperatura de su entorno considerando que no pueden regular su propia temperatura; este factor influye en el crecimiento porque las reacciones catalíticas producidas en el interior de los microbios son sensibles a esta, es decir, en el rango óptimo de temperatura su metabolismo se vuelve más activo y por ende su crecimiento es mayor, en cambio si la temperatura baja fuera del rango óptimo esto puede provocar el congelamiento de las membranas y en caso contrario si la

temperatura aumenta en exceso la bicapa lipídica se desintegra (Dey et al., 2020; Willey et al., 2020).

### **Oxígeno disuelto**

El oxígeno tiene un papel fundamental en el crecimiento de los microorganismos por los procesos que permiten la conservación de la energía específicamente en el movimiento de electrones a través de la cadena de transporte de electrones; esta cadena requiere un aceptor de electrones para su funcionamiento y para muchos microorganismos el oxígeno es el aceptor terminal más adecuado (Willey et al., 2020).

La ausencia de oxígeno puede provocar un entorno extremo y generar nichos anóxicos que están estrechamente relacionados con las zonas oxigenadas en todos los procesos biogeoquímicos que se dan en los cuerpos de agua. Sin embargo, el exceso de oxígeno también es un problema en la biota de agua dulce a causa de la proliferación de algas que producen una sobresaturación en las aguas superficiales (Sigeo, 2005).

**Tabla 2**

*Respuestas microbianas a los factores ambientales*

<b>Factor</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Definición</b>	<b>Género y especie representativos</b>
<b>pH</b>	Acidófilo	Crecimiento óptimo entre 0 y 5.5	<i>Sulfolobus, Picrophilus, Ferroplasma, Acontium</i>
	Neutrófilo	Crecimiento óptimo entre 5.5 y 8.0	<i>Escherichia, Euglena, Paramecium</i>
	Alcalófilo	Crecimiento óptimo entre 8.0 y 11.5	<i>Bacillus alcalophilus, Natronobacterium</i>
<b>Temperatura</b>	Psicrófilo	Crece a 0°C. una temperatura óptima de 15°C o menos	<i>Bacillus psicrophilus, Chlamydomonas nivalis</i>
	Psicrotolerante	Puede crecer a 0-7°C, óptimo entre 20-30°C y un máximo de 35°C	<i>Listeria monocytogenes, Pseudomonas fluorescens</i>

	<b>Clasificación</b>	<b>Definición</b>	<b>Género y especie representativos</b>
<b>Presencia de Oxígeno</b>	Mesófilo	Crecimiento óptimo entre 20 y 45°C	<i>Escherichia coli</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i>
	Termófilo	Puede crecer a 55°C o más alto, óptimo entre 55 y 65°C	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Thermus aquaticus</i>
	Hipertermófilo	Tiene un óptimo entre 85 y alrededor de 113°C	<i>Sulfolobus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Pyrodictium</i>
	Aerobio obligado	Completamente dependiente de una atmosfera con O <sub>2</sub>	<i>Micrococcus luteus</i> , protistas y fungi
	Anaerobio facultativo	No requiere O <sub>2</sub> para crecer, pero crece mejor en su presencia	<i>Escherichia</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Anaerobio aerotolerante	Crece en ausencia o presencia de O <sub>2</sub>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	Anaerobio obligado	No tolera el O <sub>2</sub>	<i>Clostridium</i> , <i>Bacteriodes</i> , <i>Methanothermobacter</i>
	Microaerófilo	Requiere O <sub>2</sub> entre un 2 y 10% para crecer y es dañado por O <sub>2</sub> atmosférico (20%)	<i>Campylobacter</i> , <i>Spirillum volutans</i> , <i>Treponema pallidum</i>

Nota. Adaptado de Willey et al. (2020)

## Parámetros microbianos del agua

### Grupo coliformes

Este conjunto está formado por bacterias con características específicas de crecimiento y bioquímicas que se utilizan para identificar contaminantes fecales en distintos cuerpos de agua; los coliformes totales generalmente se multiplican a 37°C, también se encuentran los coliformes termotolerantes respecto a bacterias que pueden crecer a una temperatura de 44,2°C como es el caso de *Escherichia coli* que es una especie específica de origen fecal (OECD, 2003). Este grupo reúnen varios géneros propios de la familia Enterobacteriácea tales

como: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* las cuales se caracterizan por la capacidad de fermentar lactosa, por tal motivo los métodos para su detección están basados en la identificación de los productos metabólicos finales de lactosa (Baird et al., 2017; OECD, 2003).

### ***Enterococos y estreptococos fecales***

La gran mayoría de las especies de *Enterococcus* son de origen fecal y pueden considerarse, en general, como índices específicos de contaminación fecal humana; los enterococos son detectables mediante métodos de cultivo sencillos y económicos que requieren instalaciones básicas de laboratorio de bacteriología, aunque hay un riesgo de salud porque algunas son patógenas (OECD, 2003).

### **Normas de Calidad de Agua**

El Estado ecuatoriano tiene una entidad del sector público denominado Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN) que fue creado el 28 de agosto de 1970 con el objetivo de crear normativas técnicas para establecer criterios de calidad y con ello acatar el reglamento propuesto por la Organización Mundial del Comercio en el sector de la salud y seguridad de las personas y el resguardo del medio ambiente (Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2019).

En el año del 2015 el Ministerio del Ambiente del Ecuador actualizó por última vez el Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente: Norma de calidad Ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua, donde se describen los criterios de calidad de las aguas para distintos usos (límites permisibles, disposiciones y prohibiciones) en conjunto con métodos y procedimientos para determinar parámetros físicos, químicos y biológicos que tengan un riesgo potencial en la contaminación del agua. Esta normativa tiene por objetivo proteger la calidad de los recursos hídricos para preservar y salvaguardar la seguridad de las personas y los ecosistemas en general.

El acuerdo ministerial 097-A emitido en el año 2015 por el gobierno ecuatoriano que dicta los criterios de calidad de aguas para la preservación de la vida acuática y silvestre en agua dulce, todavía está vigente y se utiliza en la actualidad para tener una referencia de control en actividades de reproducción, crecimiento, extracción y aprovechamiento de especies acuáticas en los casos de pesca y acuicultura (Ministerio del Ambiente, 2015). En la Tabla 3 se presentan algunos parámetros que se deben controlar en el agua que se utiliza para la piscicultura.

### ***Agua para la piscicultura***

Se refiere al agua que se utiliza para la crianza de peces con fines comerciales que debe cumplir con propiedades físicas, químicas y microbiológicas para que su consumo sea inocuo (INEN, 2020).

**Tabla 3**

*Criterios de calidad en aguas dulces frías o cálidas*

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Límite máximo permitido</b>
Oxígeno Disuelto	mg/L	no menor a 6
pH		6.5-9
NH <sub>3</sub>	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

Parámetro	Unidad	Límite máximo permitido
Hg	mg/L	0.0002
Ni	mg/L	0.025
Coliformes	NMP/100mL	20

*Nota.* Adaptado del Acuerdo ministerial 097-A Ministerio del Ambiente (2015)

### **Enfermedades bacterianas presentes en la piscicultura**

**Renibacteriosis.** Afección crónica producida por la bacteria *Rinabacterium salmoninarum*, tiene una distribución mundial y genera la enfermedad en varias especies de salmónidos en cultivo provocando pérdidas por la mortalidad directa, tratamiento y control e inmunosupresión a otras enfermedades. Se presentan signos de la enfermedad en un estado avanzado, los más comunes son: movimientos erráticos, anorexia, letargia y oscurecimiento de la piel (Vidal et al., 2017).

**Flavobacteriosis.** Se origina por varias especies del género *Flavobacterium* dentro del cual las más comunes son *Flavobacterium psychrophilum* y *Flavobacterium columnare*; estas dos especies están distribuidas a nivel mundial afectando varios peces en la piscicultura. Los síntomas de *F. psychrophilum* son: natación superficial, exoftalmia bilateral, branquias pálidas, abultamiento abdominal y ano hemorrágico; en cuanto a *F. columnare* se caracteriza por las lesiones en la cabeza, cuerpo y dorso (Peřkala-Safiřska, 2018; Vidal et al., 2017).

**Francisellosis.** Se presenta por la presencia de bacterias del género *Francisella*, su distribución es muy amplia en varios países que practican la piscicultura, los peces que tienen esta enfermedad se observan oscuros, apáticos con natación superficial y pueden presentar hemorragias cutáneas junto con ulceraciones, también resalta la presencia de nódulos blanquecinos irregulares en riñón e hígado (Vidal et al., 2017).

**Estreptococosis.** Producida por especies de *Streptococcus*, afecta varios peces de agua dulce a nivel mundial, los principales patógenos de la Estreptococosis en aguas cálidas



son *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus iniae*, estas dos especies se las toma importancia en el cultivo de tilapias por su alta mortalidad y pérdidas económicas que pueden provocar. Los peces suelen tener anorexia, natación circular en decúbito lateral y una postura característica del cuerpo en forma de C, opacidad corneal, hemorragias y ruptura ocular (Vidal et al., 2017).

**Edwardsielosis.** Es una enfermedad piogranulomatosa ocasionado por el género *Edwardsiella*, las especies más comunes relacionadas a esta enfermedad son *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella piscicida*, *Edwardsiella aguillarum* y *Edwardsiella ictaluri*, están presentes a nivel mundial siendo reportadas por varios países como causantes de Edwardsielosis en cultivos de tilapia. Sus indicios son opacidad corneal, distensión abdominal, prolapso anal y exoftalmia (Vidal et al., 2017). La Tabla 4 indica otras amenazas que afectan a los peces.

**Tabla 4**

*Bacterias causantes de enfermedades en peces*

Patógeno	Enfermedad	Huésped
<i>Catenabacterium sp</i>	-	Salmonete ( <i>Mugil auratus</i> )
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo	Salmónidos
<i>Eubacterium tarantellae</i>	Meningitis eubacteriana	Salmonete rayado ( <i>Mugil cephalusi</i> )
<i>Carnobacterium piscícola</i>	Lactobacilosis, enfermedad	
<i>Lactobacillus spp.</i>	pseudorrenal	Salmónidos
<i>Streptococcus phocae</i>	Estreptococosis	
<i>Aerococcus viridans</i>	-	Tilapia
<i>Streptococcus faecalis</i>	-	Trucha arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )
<i>Weissella sp.</i>	Septicemia hemorrágica	
<i>Vagococcus salmoninarum</i>	Lactobacilosis, enfermedad pseudorrenal, peritonitis, septicemia	Salmón del Atlántico ( <i>Salmo salar</i> ), trucha marrón ( <i>Salmo trutta</i> )
<i>Enterococcus seriolicida</i>	Estreptococosis	Varias especies de peces

<b>Patógeno</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Huésped</b>
<i>Lactococcus piscium</i>	Lactobacilosis, enfermedad pseudorrenal	Trucha arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )
<i>Rhodococcus qingshengii</i>	Peritonitis	Salmónidos
<i>Chryseobacterium piscicola</i>	Ulceración cutánea y muscular	Salmón Atlántico, Trucha arco iris
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Síndrome del salmón coho, rickettsiosis salmonídea septicemia	Salmón

*Nota.* Adaptado de Austin & Austin (2012).

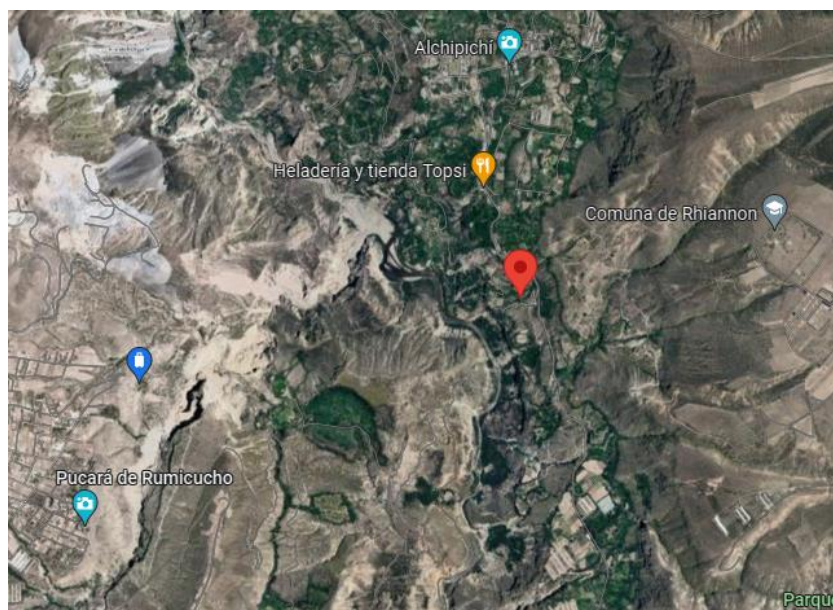
## Capítulo III: Metodología

### Lugar de estudio

La fuente hídrica natural se encuentra a una altura de 2084 metros, al norte de la ciudad de Quito-Ecuador, en la localidad de Alchipichí, vía Pisque-Puéllaro con coordenadas  $0^{\circ}01'35.2''N$   $78^{\circ}24'08.8''W$ . En el Apéndice 1 se puede observar la autorización por parte del dueño del terreno donde se encuentra el cuerpo de agua y del cual se recolectó las distintas muestras.

### Figura 8

#### *Efluente hídrico de estudio*



*Nota.* Adaptado de Google Maps (2022).

### Caracterización fisicoquímica

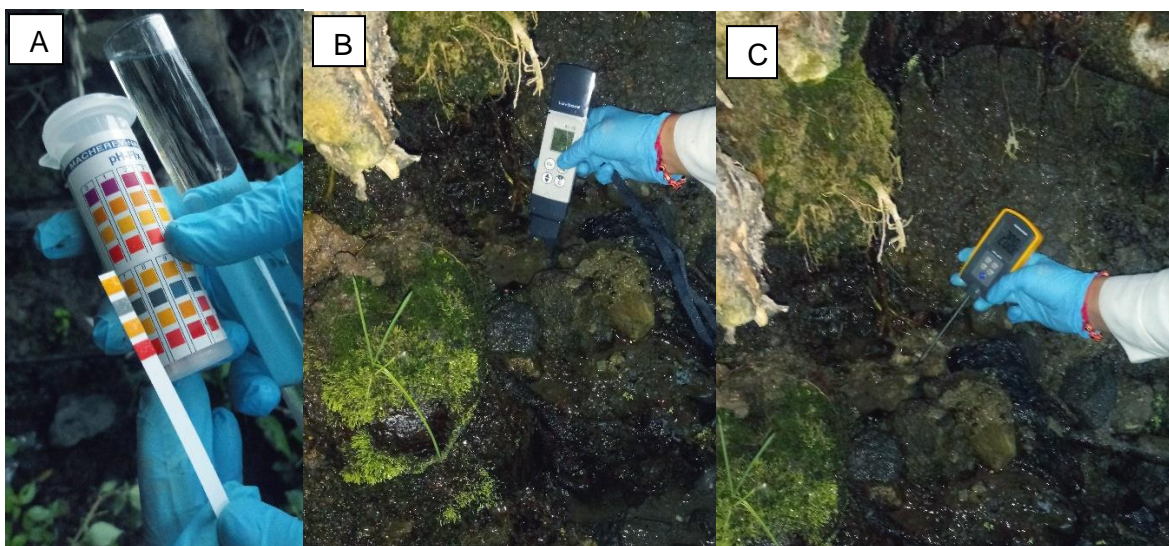
#### *Fase de campo*

Para la medición del pH se utilizó tiras indicadoras de pH, para ello la tira se colocó en un tubo de ensayo con la muestra de agua recolectada, luego se esperó 10 segundos para el cambio de colores y posteriormente se determinó el valor del pH; con la necesidad de obtener más exactitud se incorporó un pH-metro de bolsillo, marca Lovibond que permitió obtener

valores de hasta dos decimales, en el caso de la temperatura se utilizó un termómetro electrónico, marca Boeco Germany; este dio valores de la temperatura con un decimal.

## Figura 9

*Recolección de datos in situ*



*Nota.* A) Medición con cintas de pH, B) pH-metro electrónico y C) Termómetro digital

### **Fase de laboratorio**

Para el análisis de los parámetros presentados en la Tabla 3 se recolectó 2L de agua en botellas de plástico PET en un termo para evitar posibles reacciones fotoquímicas y mantener su temperatura ambiente, de forma inmediata se trasladó el recipiente a los laboratorios de Labolab Análisis de Alimentos Aguas y Afines, ubicado en Quito Francisco Andrade Marín E7-29 entre Diego de Almagro y Antonio Navarro. Este proceso se realizó diez veces en distintas fechas (temporada seca y lluviosa) después se sacó un promedio de sus valores en conjunto con sus intervalos de confianza y se estableció el cumplimiento de los límites permitidos por la normativa vigente.

Se realizó el análisis de algunos metales ( $\text{Ca}^{2+}$ , Pb, Fe, Zn) con el uso del espectrómetro de absorción atómica (marca Perkin Elmer y modelo AANALYST 200) del

laboratorio de Medio Ambiente de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, para ello se realizó diluciones de la solución stock de cada metal y se colocó en el espectrómetro con el propósito de calibrarlo y generar una recta de regresión que permitió hallar las concentraciones correspondientes de cada metal. Las diluciones se presentan en el Apéndice 3. Para colocar la muestra en el equipo primero se filtró (Millex-HPF HV, 0.45  $\mu\text{m}$ , PVDF, con filtro de borosilicato graduado, 25mm, no estéril) y se almacenó la muestra en refrigeración en balones aforados de 50 mL, este proceso se desarrolló una sola vez por cada elemento examinado.

### Figura 10

#### *Espectrómetro de Absorción Atómica*



*Nota.* Cuenta con un compresor en la parte exterior y con varios tanques de distintos gases, en este trabajo se utilizó el acetileno.

### Cuantificación de coliformes

#### *Fase de campo*

**Muestreo.** Para el análisis microbiológico de coliformes totales, se recalentó agua en un recipiente estéril de 100 mL, para mantenerlo a una temperatura cercana a 10°C se colocó geles congelados en un cooler que permitió conservar su integridad en el transporte al Laboratorio de Microbiología Ambiental del CENCINAT de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; este proceso se tomó del Standard Methods edición 23, sección 9060.A y

9060.B (Baird et al., 2017). Cuando las muestras llegaron al laboratorio, se colocaron en el refrigerador, se registró la hora y la temperatura; el análisis se realizó de forma inmediata.

### **Fase de laboratorio**

**Recuento de coliformes.** Se empleó placas de recuento rápido de coliformes/ *E. coli* 3M™ Petrifilm™ siguiendo el proceso descrito por el fabricante (Luca, 2019): las placas se almacenaron a temperatura de refrigeración (4°C) en el interior de una funda ziploc; al momento de su uso se dejó el paquete de las placas a temperatura ambiente durante unos 15 minutos, posterior a ello se esterilizó una zona plana con alcohol al 70% y se prendió un mechero bunsen para mantener el área estéril, después se colocaron tres placa Petrifilm con cuidado de no contaminarlas y se rotularon, luego se levantó el film superior de cada una y en seguida con una pipeta se colocó de forma perpendicular 1 mL de la muestra en el centro del film inferior seguidamente se bajó el film superior sin introducir burbujas de aire.

Como control positivo se inoculó 1mL de agua de la fuente de los patos de la Universidad de las Fuerzas Armadas y como control negativo se colocó 1 mL de agua embotellada Dasani. Enseguida se colocó el aplicador en el film superior sobre el inóculo y se presionó para repartir el inóculo sobre toda el área circular en cada una de las placas, finalmente al cabo de un minuto de que se solidificara el gel se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al finalizar este tiempo se sacaron de la incubadora y se contaron las colonias que se formaron en todas las placas.

**Determinación del número más probable.** Se realizó el conteo según la técnica descrita por Baird et al. (2017) presentada en la edición 23 del libro Standard methods (Apéndice4); primero se realizó la fase presuntiva con cinco tubos de ensayo con diluciones de 10 mL, 1 mL y 0.1mL, colocando la cantidad de medio e inóculo como se indica en la Tabla 5, se incubó a  $35 \pm 0.5$  °C por 24 horas en seguida se observó los tubos que tenían cambio de color y gas en las campanas Durham; a los tubos que dieron resultados positivos se les realizó

la fase de confirmación mediante la inoculación de dichos tubos a otros con cultivo compuesto de caldo de bilis con lactosa de color verde brillante y un inóculo. Posterior a la verificación se procedió a calcular el número más probable tomando en consideración la tabla de índices NMP con una con un valor de confianza del 95% presentado en el Apéndice4.

**Tabla 5**

*Preparación del caldo de lauril-triptosa*

<b>Inóculo (mL)</b>	<b>Cantidad de Medio en Tubo (mL)</b>	<b>Volumen de medio + Inóculo mL</b>	<b>Caldo de Lauril-triptosa g/L</b>
1	10 o más	11 o más	35.6
10	10	20	71.2
10	20	30	53.4
20	10	30	106.8
100	50	150	106.8
100	35	135	137.1
100	20	120	213.6

*Nota.* Adaptado de Standard methods: For the examination of water and waste water Edición 23, Baird et al. (2017)

**Aislamiento e identificación de bacterias**

***Fase de campo***

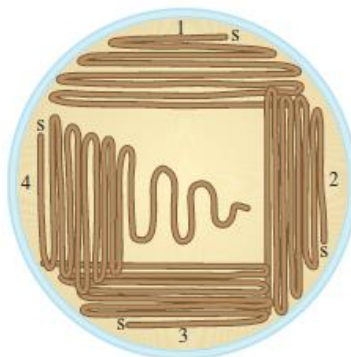
**Muestreo para aislamiento de bacterias.** El medio de cultivo usado para el muestro fue el caldo nutriente para microorganismos sin necesidades exigentes (Microbiologie Clinique, n.d.), el pH se lo ajustó aproximadamente a 7. La muestra de sedimento se recolectó con hisopos esterilizados en un tubo Falcón de 50 mL con 20 mL de caldo nutritivo (Moposita, 2017; Naranjo, 2017) y se recogió en un recipiente estéril 250 mL de agua, inmediatamente las muestras fueron coladas en un cooler con geles refrigerantes para su traslado al Laboratorio de Microbiología Ambiental del CENCINAT de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

### **Fase de laboratorio**

**Siembra bacteriana.** Para este procedimiento se utilizó el medio TSA (agar de soya y caseína) que es un medio no selectivo que ayuda al crecimiento de las bacterias Gramnegativas, de igual forma se usa para el transporte de cultivos de microorganismos que han sido extraídos de muestras de agua (Microbiologie Clinique, 2022). Con un isopo estéril se tomó un inóculo del caldo nutriente, a continuación, se esparció aplicando el método de rayado del cuadrante (Figura 11) en una caja Petri con TSA.

### **Figura 11**

*Siembra por el método de raya del cuadrante*



*Nota.* Adaptado de Brown & Smith (2015)

En cuanto a la muestra de agua, se filtró los 250 mL recolectados mediante una bomba de vacío con un filtro (S-Pack, 0.45  $\mu\text{m}$  con un diámetro de 47mm, blanco cuadriculado) (Figura 12), al cabo de este proceso se lo colocó con fórceps estériles en una caja Petri con TSA. Finalmente, todas las cajas Petri se etiquetaron e incubaron a 37°C por 24 horas (Naranjo, 2017).



## Figura 12

### Equipo de filtración con membrana



*Nota.* A) Antes de cada uso se autoclavó cada parte a 15 PSI por 15 minutos.

**Aislamiento de bacterias.** Al finalizar la incubación de los cultivos iniciales (agua y sedimento), se identificó las diferentes morfologías que se formaron en cada uno de los medios; posteriormente con un asa estéril se tomó varios inóculos de cada morfología y se sembraron en dísticas cajas Petri con medio TSA mediante el procedimiento de siembra por estrías con el fin de obtener cepas que se encuentren completamente separadas, a partir de ello se procedió a observar la morfología de los cultivos obtenidos haciendo uso de la tinción Gram, el proceso de detalla en el Apéndice5.

**Extracción de ADN de bacterias.** Se prepararon medios de cultivo líquido con caldo nutriente en tubos de ensayo (la misma cantidad de morfologías que se logró distinguir con la tinción Gram) y se inocularon con las bacterias aisladas en el paso anterior después se puso a incubar por 48 horas a 37°C para obtener medios saturados de bacterias, se trabajó en una zona estéril con un mechero Bunsen para evitar contaminaciones; después se almacenó los cultivos a una temperatura de 4°C hasta el momento de la extracción de ADN para esto se aplicó el método descrito por Weising et al. (2005) con varias modificaciones que se presentan en el Apéndice6.

**Reacción en cadena de polimerasa.** Se empleó la mezcla maestra Thermo Scientific Dream Taq Green PCR para la amplificación del gen ribosómico 16S por su efectividad en los productos de la PCR, al utilizarlo se evitó tener contaminación en el momento de la electroforesis e incluso gracias a sus colorantes facilitó este proceso y se logró amplificar con éxito el gen ribosomal (ThermoScientific, 2016). En la Tabla 6 se indica la cantidad utilizada en cada reacción con un volumen de 25  $\mu$ l. Los cebadores que se colocaron están descritos en la Tabla 7

**Tabla 6**

*Cantidad de los elementos para la solución madre*

<b>Componente</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Para 5 Rx (<math>\mu</math>L)</b>
Agua ultrapura	7	35
Cebador Forward 10 $\mu$ M	1.5	7.5
Cebador Reverse 10 $\mu$ M	1.5	7.5
Dream Taq Green PCR Master Mix	12.5	62.5
AND molde	2.5	-
Volumen total	25 $\mu$ L	

*Nota.* Para realizar la solución se colocó cada uno de los componentes como está enlistado

**Tabla 7**

*Cebadores para la PCR*

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>
Forward (27F)	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'
Reverse (1492R)	5' ACGGCTACCTTGTTACGA 3'

*Nota.* Adaptado de Das & Dash (2015).

Después de armar cada una de las soluciones en tubos eppendorf para PCR se los colocó en una cámara del termociclador marca Fisher Scientific con el programa descrito en la Tabla 8 a continuación:

**Tabla 8***Programación para el Termociclador*

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94.0	5 min	1
Desnaturalización	94.0	30 s	
Hibridación	57.0	45 s	30
Extensión	72.0	1.5 min	
Extensión final	72.0	7 min	1

*Nota.* Programa para un volumen de 25µL incluido el ADN molde.

Finalmente, al terminar el programa del termociclador, todos los productos de la PCR se sometieron a electroforesis con un gel de agarosa ultrapura al 1.2% para comprobar si la PCR dio resultado. Todos los productos fueron almacenados a una temperatura de -20°C para evitar su degradación.

**Secuenciación Sanger.** Los productos obtenidos de la PCR fueron enviados a los laboratorios de Biosequence S.A.S para su purificación y secuenciación, el volumen que se envió por cada muestra fue de 20µL aproximadamente a una concentración de 90ng/5µL (Cadavid & Gómez, n.d.; Naranjo, 2017).

***Análisis bioinformático***

Las secuencias proporcionadas por Biosequence fueron optimizadas tomando en consideración las observaciones de Crossley et al. (2020) en cuanto a la calidad e interpretación de las secuencias. Las secuencias forward y reverse fueron ensambladas para formar contigs de cada una de las muestras mediante el uso del programa “Geneious Prime Trial” seguidamente se analizó la homología y similitud de las secuencias consenso con el uso de BLASTN perteneciente a la base de datos NCBI.

En la construcción de los árboles filogenéticos se usó el programa MEGA 11 con su herramienta “MUSCLE” para la alineación de secuencias. Con el fin de seleccionar el mejor

árbol filogenético que mejor indica la semejanza entre bacterias se realizó estadística inferencial con el complemento “MODELS” y se observó el modelo que tuvo el parámetro BIC (Criterio de información bayesiana) más bajo (Tamura 3-parameter), finalmente en la elaboración de la topología del árbol filogenético se implementó el método de máxima verosimilitud Neighbor-Joining con un bootstrap de 1000.

## **Metabarcoding**

### ***Fase de campo***

**Muestreo para secuenciación masiva.** Se recolectó 10 L de agua en botellas plásticas PET previamente esterilizadas y también se tomó una muestra de sedimento en recipiente estéril de 50mL, en su transporte se lo mantuvo a una temperatura menor a 10°C mediante geles congelados en un cooler apropiado hasta los laboratorios de microbiología ambiental del CENCINAT de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, este procedimiento fue realizado tres veces en distintas fechas.

### ***Fase de laboratorio***

**Extracción de ADN para secuenciación masiva.** En el caso del agua se trató 10L con el equipo de filtración con membrana (Figura 12), después se aplicó el kit Power Soil DNA Isolation modificado (Apéndice7); para el suelo, como se encontraba con un exceso de agua se lo sometió a centrifugación por 30 segundos a 10000xg e inmediatamente se procedió con el kit ya mencionado. Al finalizar los procedimientos de extracción se trasladó manteniendo la cadena de frío a los laboratorios de Biosequence S.A.S ubicado en la ciudad de Quito en la Avenida Checoslovaquia y Avenida Eloy Alfaro para su respectiva secuenciación en Illumina con la tecnología “Secuenciación NGS Metagenómica de Amplicón” con una profundidad de 20000 y un tipo de lectura de 2x250.

### **Análisis bioinformático: Metabarcoding**

Para los datos obtenidos por parte de Biosequence, se procedió a realizar los análisis en conjuntos separados; es decir, las muestras de agua y las muestras de sedimento por separado utilizando el “pipeline” DADA2 que es parte del programa bioinformático “Bioconductor” versión 3.17, en el programa estadístico R versión 4.2.2 en base a la metodología propuesta por Sánchez (2022) y Callahan et al. (2016) para el análisis de metabarcodificación del ARNr 16S y la formación de ASVs con sus respectivas adaptaciones a los datos de este trabajo de investigación.

**Control de calidad.** En esta etapa se realizó un mapa de calor tanto para las corridas de cebadores delanteros como reversos con el objetivo de ver la cantidad de bases que se deben separar para evitar la formación de quimeras al momento de formar los ASVs. Se recortó y filtró con la función “filterandTrim” con un máximo de error esperado de cinco por la cantidad muy pequeña de datos, después se realizó el aprendizaje de la tasa de errores con la función “learnErrors” tanto para los cebadores delanteros y reversos (proceso relevante para el paquete DADA2)

**Agrupación de ASVs.** Se implementó la función “dada” para cada muestra de datos, posteriormente se juntaron las secuencias delanteras y reversas con la función “mergePairs”, por la pequeña cantidad de datos que se generó y la calidad de las lecturas obtenidas se procedió el análisis solo con las lecturas “forward” e inmediatamente se construyó una tabla de frecuencias mediante “makeSequenceTable” a fin de encontrar las abundancias de cada uno de los ASVs.

**Anotación taxonómica.** Se realizó mediante la base de datos SILVA para procariontes, denominada “silva\_nr\_v138\_train\_set.fa.gz” obtenida de McLaren (2020), esta página proporciona diversos archivos fasta para el paquete DADA2.

## Análisis estadístico

### Valores fisicoquímicos

Se realizó el análisis de cinco muestras de la fuente hídrica en distintas fechas (temporada seca y lluviosa) a fin de estimar valores promedios de las variables: Oxígeno Disuelto, pH, NH<sub>3</sub>, Al, As, Ba, Be, B, Cd, Zn, Co, Cu, Cr, Fe, Hg y Ni, obtenidos mediante los métodos indicados en el Apéndice2.

Con los datos recolectados se formularon intervalos de confianza ( $\alpha=95\%$ ) con la distribución de probabilidad T Student (Tabla 9), con el fin de determinar si cumplen los límites de calidad de agua para su uso en la piscicultura se elaboró una comparación con los datos de la Tabla 3.

**Tabla 9**

*Fórmulas para intervalos de confianza*

Parámetro	Fórmula
Media aritmética	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$
Desviación estándar	$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$
Media del estadístico	$t = \frac{\bar{X} - \mu}{S/\sqrt{n}}$
Límite inferior	$\bar{X} - t_{\frac{\alpha}{2}} \frac{S}{\sqrt{n}}$
Límite Superior	$\bar{X} + t_{\frac{\alpha}{2}} \frac{S}{\sqrt{n}}$

Nota. Adaptado de Gutiérrez & de la Vaca (2012)

### Número más probable

El valor del NMP se tomó de la tabla presentada en el Apéndice4, al analizar los tubos que resultaron positivos con 10 mL, 1.0 mL y 0.1 mL de muestra de la fuente hídrica, se buscó la combinación de valores iguales en estas tablas, enseguida se tomó el valor correspondiente

a la combinación obtenida en los ensayos y se lo expresó como NMP/100 mL con sus respectivo límite superior e inferior.

### ***Diversidad bacteriana***

Se elaboró una estadística descriptiva; debido a que el presente estudio tiene por objetivo recabar información sobre un lugar específico; para ello se manejó gráficas de barras generadas a través del programa Rstudio versión 4.2.2 con el propósito de representar lo abundancia relativa de los ASVs (obtenidos después del tratamiento con el paquete DADA2) pertenecientes a cada jerarquía taxonómica (Reino, Filo, Clase, Orden, Familia y Género) tanto en muestras de agua como en sedimento del sitio de estudio.

## Capítulo IV: Resultados

### Parámetros fisicoquímicos

Las cinco muestras correspondientes a la época seca se tomaron en distintas fechas comprendidas entre el mes de noviembre de 2022 e inicios de diciembre de 2022, mientras que las mediciones de la época de lluvia se las realizó entre el mes de diciembre de 2022 y todo el mes de enero de 2023. La Tabla 10 indica los valores obtenidos en este proceso:

**Tabla 10**

*Características fisicoquímicas en época seca y lluviosa*

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	
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	Cumplen las normativas
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.

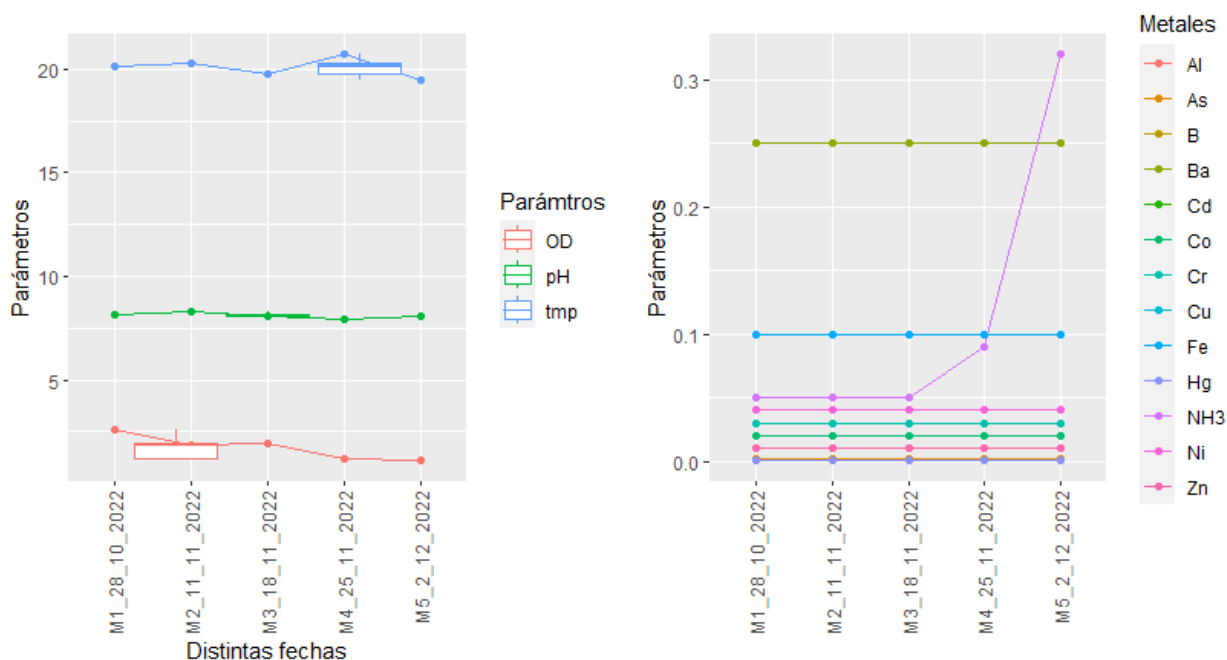
En la mayoría de los metales analizados (As, Al, Ba, B, Cd, Cu, Cr, Co, Hg, Ni, Zn, Fe) no se realizaron intervalos de confianza debido a que los resultados en todas las mediciones se



encontraron muy por debajo de los límites presentados en el Acuerdo ministerial 097-A del año 2015; el único parámetro que no lo cumple es el oxígeno disuelto (OD) con un promedio de 1.73 mg/L cuyo valor adecuado para mantener la vida acuática debería ser mayor a 6 mg/L. En la concentración de amoníaco (0.11 mg/L) es necesario considerar los valores del pH y temperatura en el agua, en este caso al tener una temperatura promedio de 20.08 °C y un pH de 8.12 el valor permitido para el amoníaco es de 0.499 mg/L, por lo tanto la concentración de amoníaco está dentro de los límites (Ministerio del Ambiente, 2015, p. 90), la última medición de este compuesto resultó elevada (0.32 mg/L) en comparación con las mediciones anteriores, provocando el aumento del promedio como se puede ver en la Figura 13 a continuación:

**Figura 13**

*Valores en época seca*



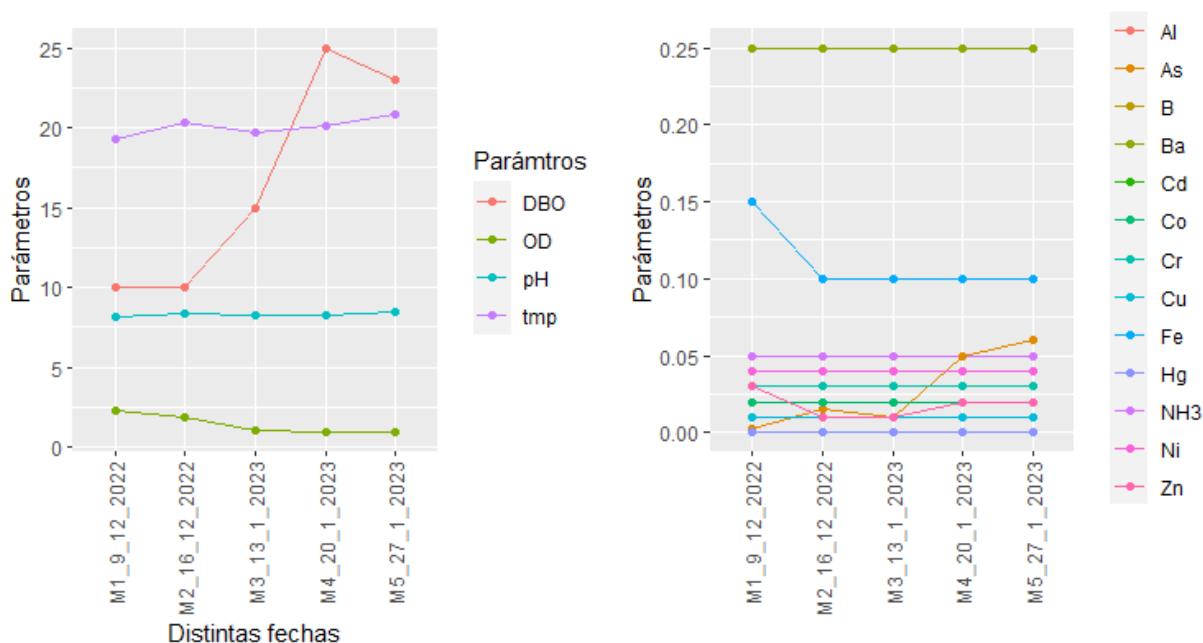
*Nota.* Se indican las cinco mediciones realizadas en cada fecha.

Los valores de los metales: As, Al, Ba, B, Cd, Cu, Cr, Co, Hg, Ni, Zn y Fe total; no tuvieron cambios, es decir, se encontraban en concentraciones muy pequeñas que no se lograron detectar mediante los métodos aplicados (Apéndice2) para cada uno de ellos. El

oxígeno disuelto (OD), pH y temperatura en el transcurso del tiempo no cambiaron de forma drástica, aunque el oxígeno tuvo una tendencia a disminuir en toda la temporada seca.

**Figura 14**

*Valores en época lluviosa*



En vista de que en la temporada seca la concentración del oxígeno disuelto (OD) tendió a bajar se decidió medir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en la época de lluvia; resultó que a medida que el OD disminuía por el contrario la DBO tendió a subir teniendo un valor máximo de 25 mg/L. A diferencia de la época seca en la época lluviosa, se encontró niveles de arsénico (As) significativos, incluso sus concentraciones comenzaron a aumentar llegando a tener una concentración máxima de 0.06 mg/L, este valor supera el valor permitido por la normativa (0.05 mg/L).

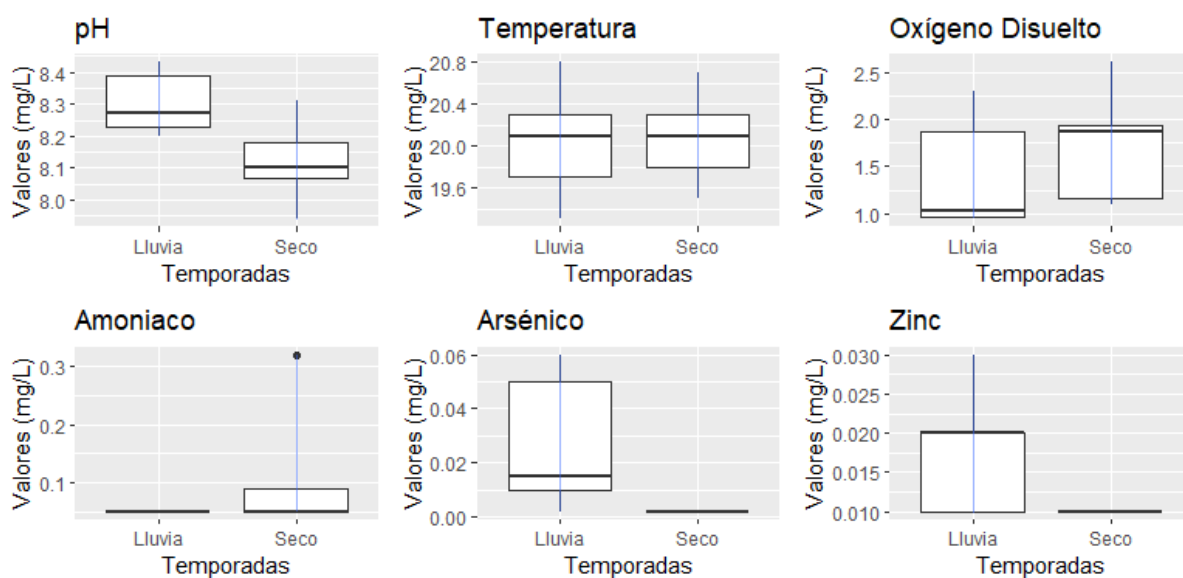
En época de lluvia también hubo ínfimas concentraciones de los metales Al, Ba, B, Cd, Cu, Cr, Co, Hg, Ni, Zn a diferencia del Fe total que tomó un valor de 0.15mg/L en su primera medición, después no se encontró una cantidad que se pudiera encontrar en el resto de las

fechas analizadas. Los valores del pH y temperatura no sufrieron cambios significativos en comparación de la época seca.

Para conocer si existe verdaderamente una diferencia entre el tiempo de lluvia y sequía en los parámetros de: pH, Temperatura, Oxígeno Disuelto, Arsénico y Zinc, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis (Apéndice2) y se determinó únicamente que el Arsénico es significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) en cada temporada. La Figura 15 indica con mayor claridad las diferencias.

**Figura 15**

*Diagrama boxplot de parámetros*



El espectrómetro de absorción atómica genera de una sola muestra automáticamente tres mediciones de absorbancia y las convierte en medidas de concentración, inmediatamente presenta un promedio de aquellas mediciones (Tabla 11). La muestra tomada para el análisis en este equipo fue en época de lluvia. El valor que no se pudo estimar fue el de Zinc por las cantidades muy pequeñas presentes en la muestra.

**Tabla 11**

*Valores obtenidos por el espectrómetro de absorción atómica*

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

*Nota.* (\*) Menor que el límite de detección del equipo

Se descubrió la presencia de plomo (1.079 mg/L) en el efluente, este valor supera por mucho el límite permitido (0.001 mg/L) por lo tanto no cumple con la normativa para su uso en la piscicultura. Al estimar la concentración de Calcio se halló que su concentración es muy alta en comparación al resto de compuestos analizados en este equipo de medición.

### **Inoculación en placas Petrifilm 3M**

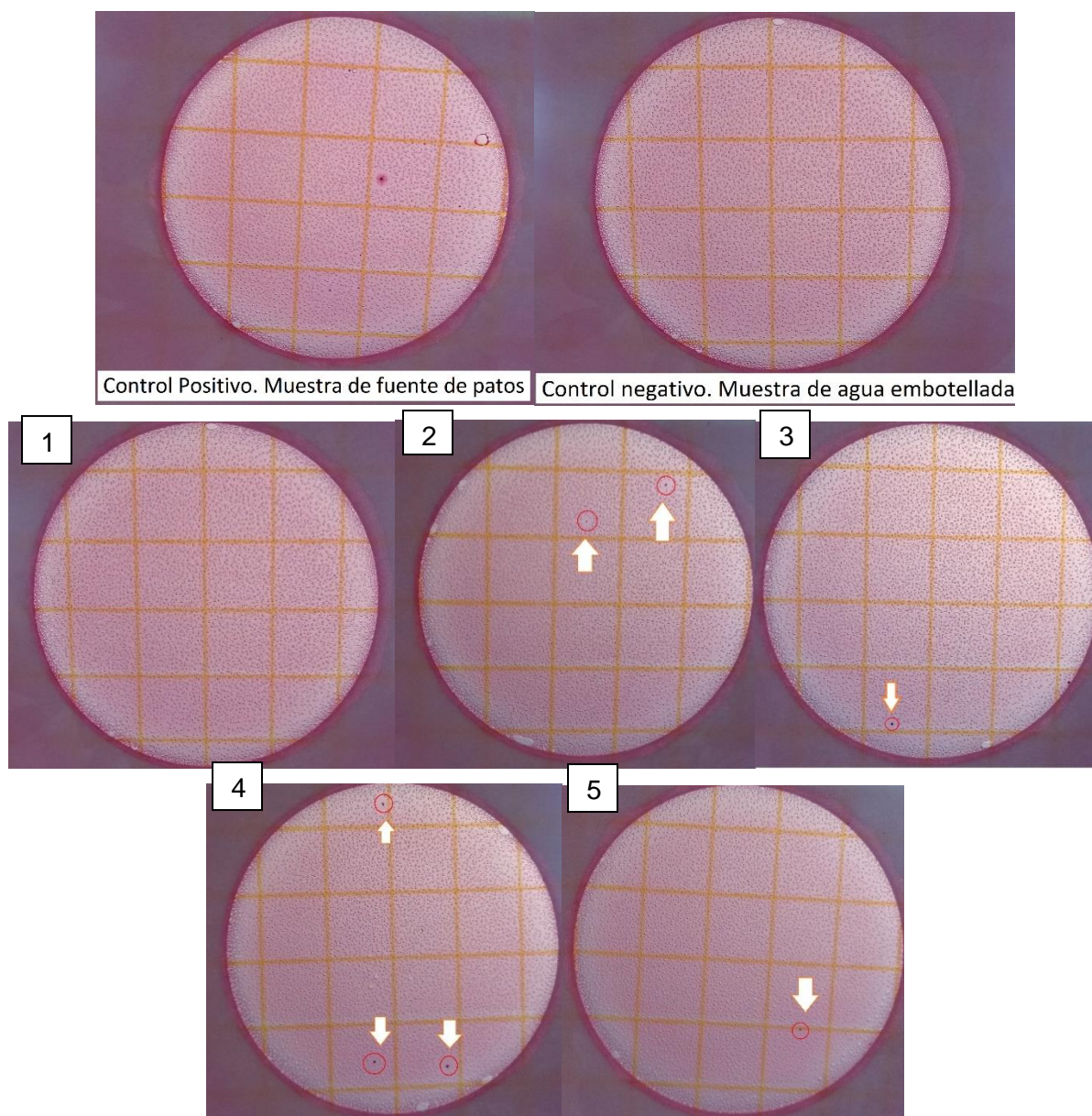
Las inoculaciones en estas placas se realizaron cinco veces para poder determinar un valor promedio y determinar intervalos de confianza (Tabla 12). Las colonias que se contaron fueron aquellas que tuvieron color rojo y presencia de gas como se indica en la Figura 16.

**Tabla 12**

*Unidades formadoras de colonias*

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

*Nota.* Se realizó una prueba t Student bilateral con un valor de confianza del 90%. DE: Desviación estándar, LI: límite inferior, LS: Límite superior

**Figura 16***Coliformes en placas Petrifilm 3M*

*Nota.* Al finalizar las 24 horas no se obtuvo crecimiento de coliformes fecales en una placa (1) por otra parte el resto de las placas tuvo por lo menos una UFC/mL.

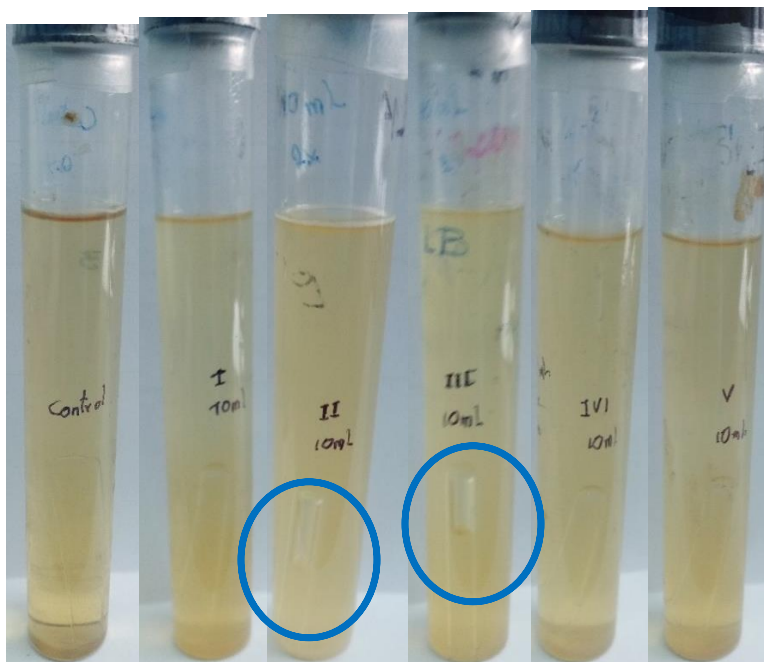
## Método NMP

En la fase presuntiva únicamente salieron positivos dos tubos de las diluciones de 10 mL de muestra (Figura 17), el resto de tubos tanto de 1 mL y 0.1 mL no tuvieron ningún resultado positivo (Figura 18 y 19), los tubos que se consideraron positivos fueron aquellos que tuvieron un cambio de color del medio de cultivo y la presencia de gas en las campanas Durham (Figura 20); en cuanto a la combinación para obtener el NMP/100mL fue de 2-0-0 obteniendo un resultado de 4.5NMP/100mL con un límite inferior de 0.79 y un límite superior de 15 (tabla de Apéndice4).

Los resultados se aclararon aún más en la fase de confirmación con el medio que contenía caldo de bilis verde brillante, dado que se evidenció la presencia de cambio de color y la presencia de gas en las campanas de Durham, como se puede ver en la Figura 20.

### Figura 17

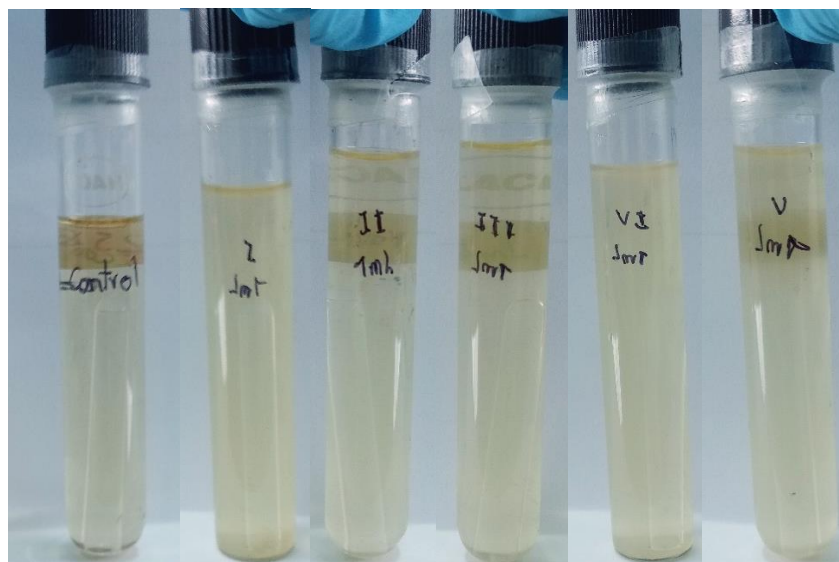
*Tubos en dilución con 10mL de inóculo*



*Nota.* Los únicos resultados positivos fueron los tubos II y III. Se puede apreciar el gas en las campanas de Durham.

**Figura 18**

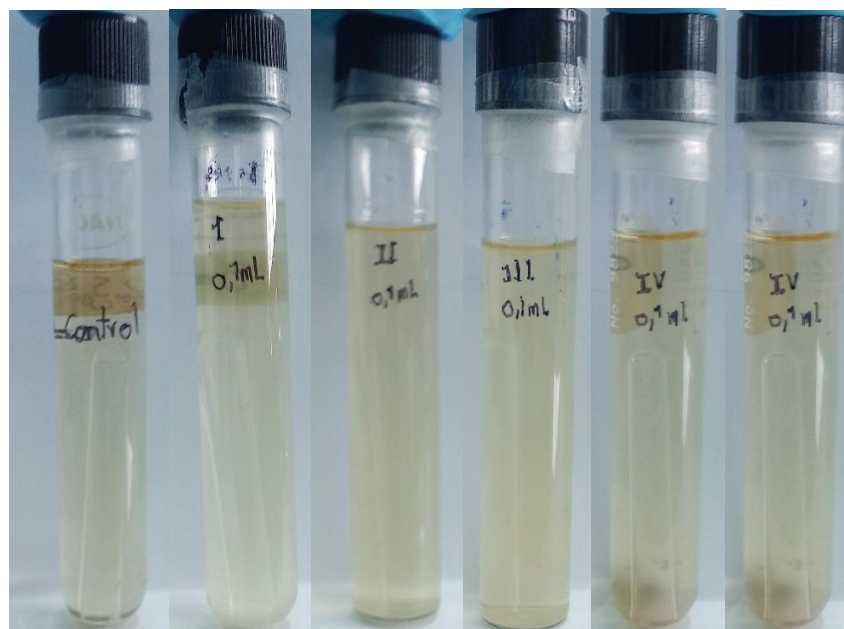
*Tubos en dilución de 1mL de inóculo*



*Nota.* Solo hubo un cambio en la coloración, ninguno tuvo gas en las campanas de Durham.

**Figura 19**

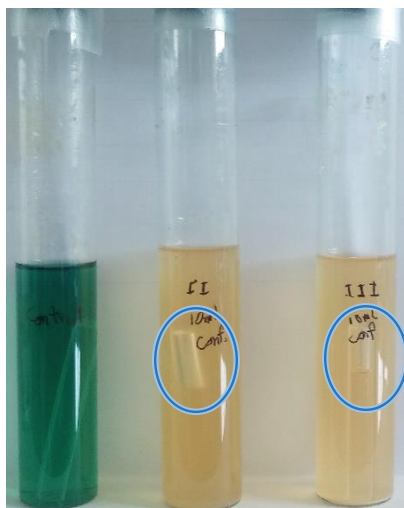
*Tubos en dilución de 0.1 mL de inóculo*



*Nota.* La tonalidad del medio cambió un poco pero no lo suficiente para indicar la presencia de coliformes fecales.

## Figura 20

### *Fase de confirmación*



*Nota.* Se puede asegurar la presencia de coliformes fecales en los tubos II y III

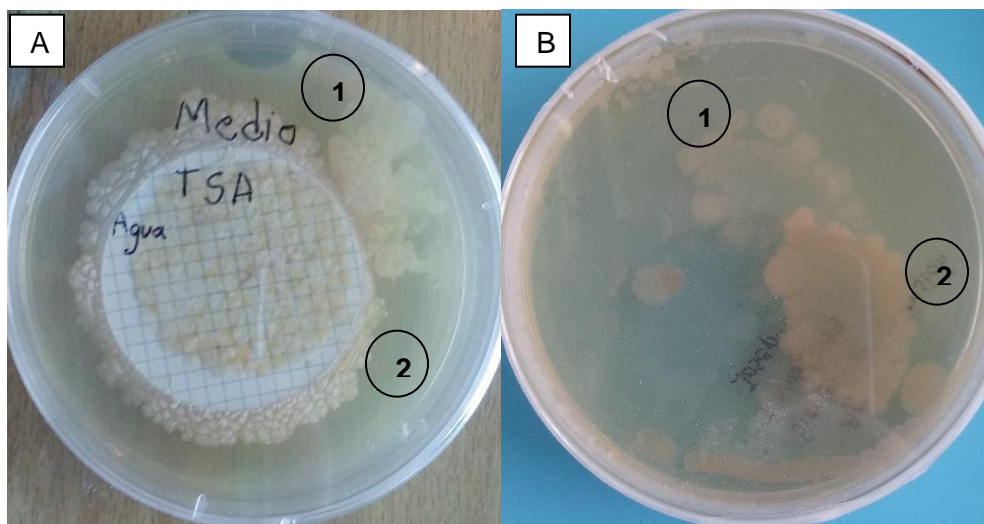
### **Aislamiento e identificación de bacterias**

A partir de los cultivos iniciales de suelo y sedimento indicados en la Figura 21 se logró distinguir cuatro morfologías (dos del cultivo de agua y dos en el cultivo de sedimento), a partir de los cuales se aisló en medio TSA para su posterior observación. La primera morfología de agua tuvo forma irregular, bordes lobulados y una elevación plana; la segunda se caracterizó por tener una elevación umbilicada alrededor del filtro, a más de ello presentaba bordes ondulados y una forma fusiforme. En el cultivo de sedimento se observó una morfología con elevación plana de color blanco lechoso con bordes ondulados y formas irregulares; la segunda se identificó por su color café claro, forma irregular, bordes lobulados y por su elevación planoconvexa.



## Figura 21

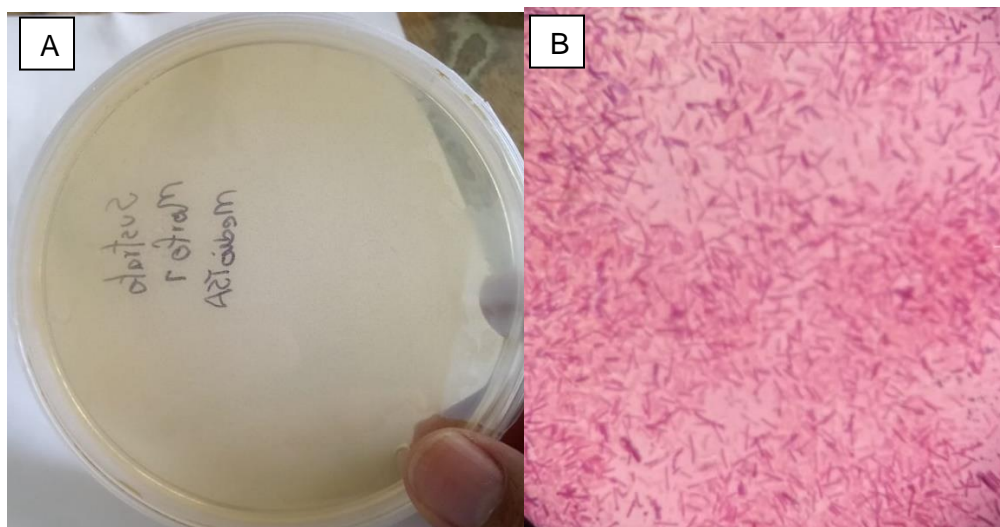
*Cultivo inicial de agua y sedimento*



En la Figura 22 se indica el crecimiento masivo que se obtuvo al aislar la morfología uno en toda la caja Petri, se observó su color blanquecino y su elevación plana; posteriormente se realizó la tinción Gram y resultó ser un bacilo gramnegativo con una forma muy alargada.

## Figura 22

*Morfología 1 de cultivo de sedimento*

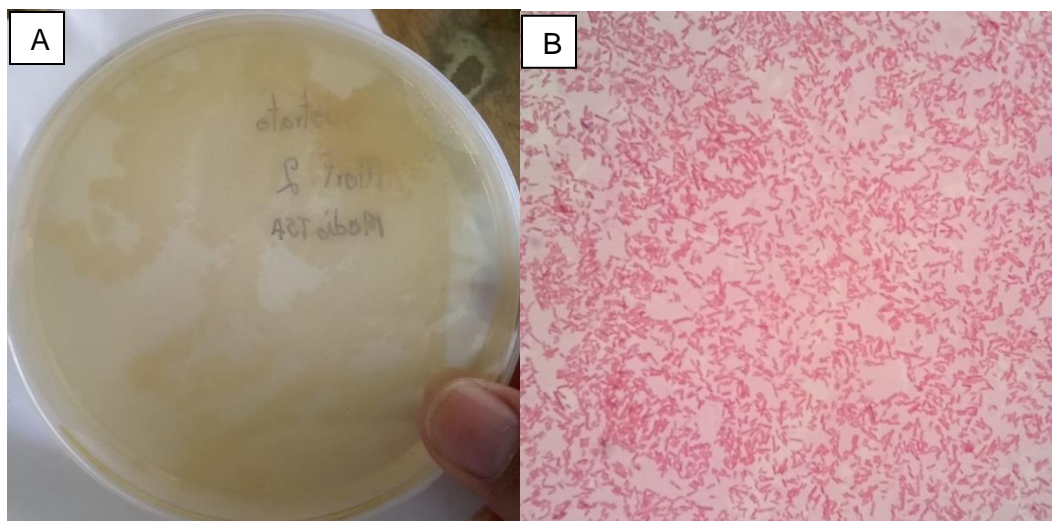


*Nota.* A) Crecimiento masivo de cepa S1 en medio TSA; B) Tinción Gram de cepa S1 de cultivo puro con objetivo 100X.

La segunda morfología también tuvo crecimiento masivo, aunque no cubrió toda la caja (Figura 23), mantuvo sus bordes ondulados y su color café claro. En el microscopio se observaron bacilos gramnegativos de dimensiones muy pequeñas en comparación con la cepa S1.

### Figura 23

*Morfología 2 de cultivo de sedimento*

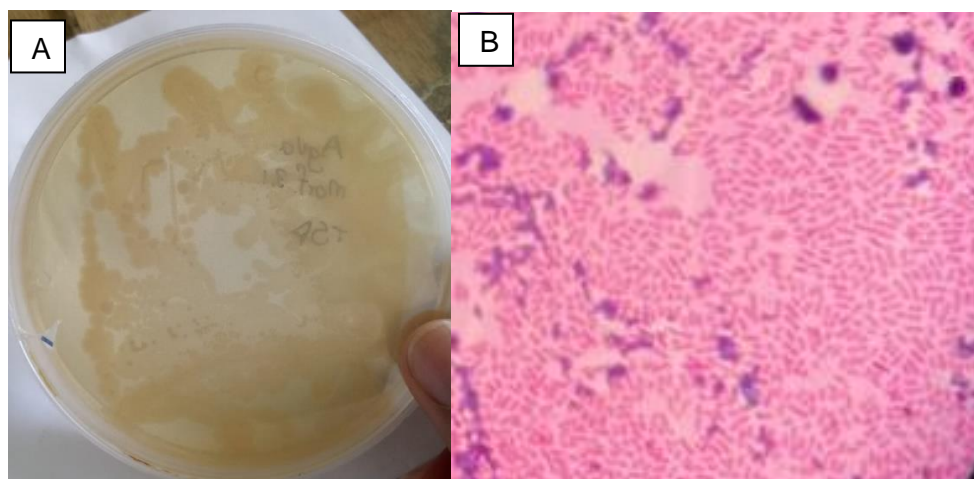


*Nota.* A) Crecimiento masivo de cepa S2 en medio TSA; B) Tinción Gram de cepa S2 de cultivo puro con objetivo 100X.

El crecimiento de la cepa A1 en el medio TSA resultó con su creciente masivo con bordes lobulados, elevación plana y color blanquecino; después de la tinción Gram se lo identificó como bacilo gramnegativo (Figura 24).

**Figura 24**

*Morfología 1 de cultivo de Agua*

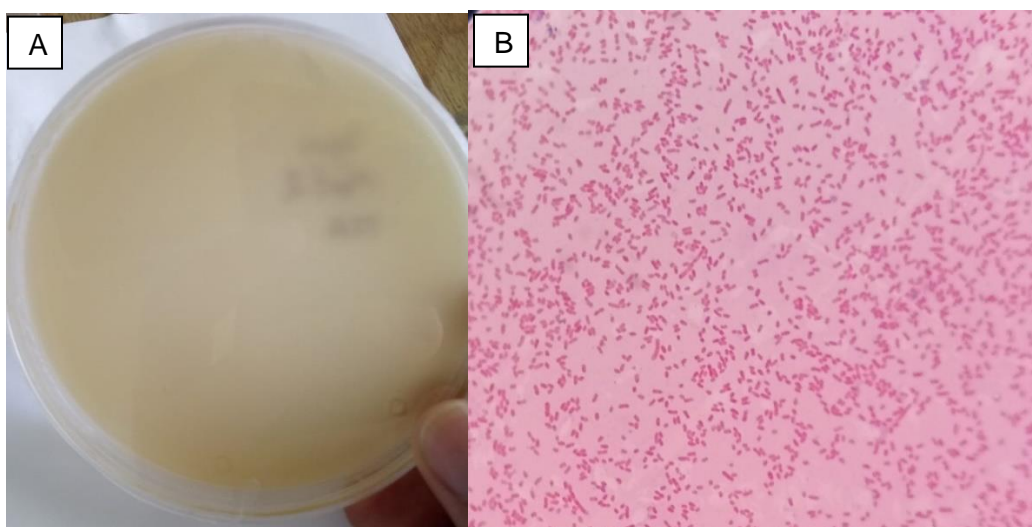


*Nota.* A) Crecimiento masivo de cepa A1; B) Tinción Gram de cepa A1 de cultivo puro con objetivo 100X

En el cultivo de la cepa A2 se observó que cubrió por completo la caja Petri (Figura 25), su color fue blanco junto con el medio TSA tuvo un aspecto se sequedad, posterior a la tinción Gram, también resultó ser un bacilo gramnegativo

**Figura 25**

*Morfología 2 de cultivo de agua*



*Nota.* A) Crecimiento masivo de cepa A2 B) Tinción Gram de cepa A2 de cultivo puro con objetivo 100X

Para la secuenciación Sanger se realizó la extracción de ADN de los medios líquidos de cada una de las morfologías descritas anteriormente, posterior a ellos se realizó la cuantificación obtenida en el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Marca: Thermo Fisher Scientific) del Laboratorio de Inmunología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. La Tabla 13 indica los valores obtenidos por cada extracción.

**Tabla 13**

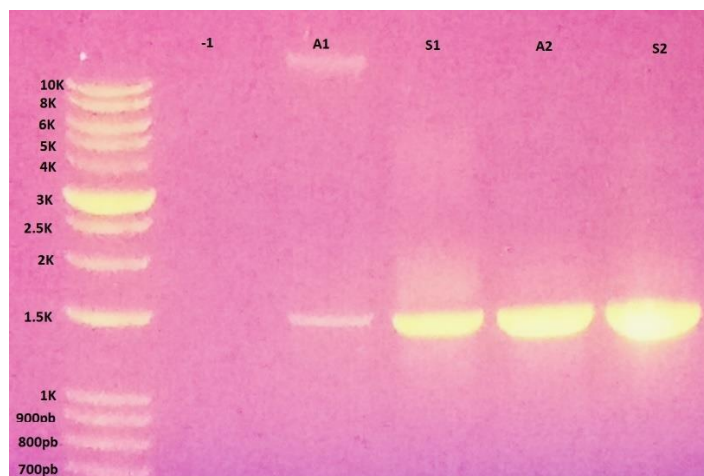
*Cuantificación de ADN y ratios de pureza*

<b>Morfología</b>	<b>Concentración [ng/μL]</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
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

Al finalizar este proceso se efectuó una PCR a fin de observar la presencia del gen ribosomal 16S consiguiendo los resultados presentados en la siguiente figura:

**Figura 26**

*Amplificación del gen 16S de bacterias aisladas*



*Nota.* M: marcador molecular 1kb “Opti-DNA Marker”, A1: cepa uno aislada de agua, S1: cepa uno aislada de sedimento, A2: cepa dos aislada de agua, S2 cepa dos aislada de agua

Los productos de amplificación de la PCR fueron enviados a Biosequence manteniendo la cadena de frío para su secuenciación Sanger; de este proceso se obtuvo ocho cromatogramas y después de su análisis en el software Geneious Prime Trial se logró formar únicamente dos contigs de las cepas A1 y S1. En el análisis de similitud y homología en la base de datos BLASTN de cada uno de los contigs, se obtuvo los posibles microorganismos (Tabla 14 y 15) a los cuales pertenece cada una de estas; con el fin de encontrar la relación más cercana de las secuencias consenso, también se realizó un árbol de cladograma para cada una de las cepas aisladas (Figura 27 y 28).

**Tabla 14**

*Microorganismos próximos a la cepa A1*

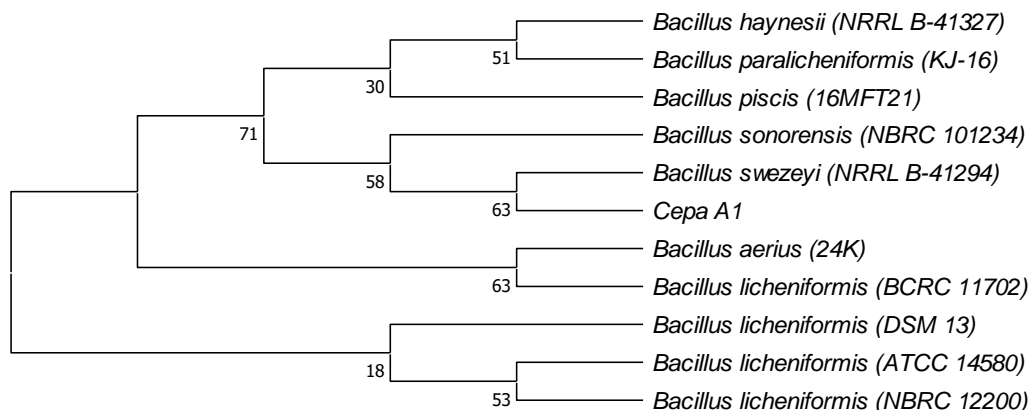
Descripción	Número de acceso	Cobertura de consulta	Porcentaje de Identidad
<i>Bacillus haynessii</i> (NRRL B-41327)	NR_157609.1	100%	99.91%
<i>Bacillus paralicheniformis</i> (KJ-16)	NR_137421.1	100%	99.91%
<i>Bacillus piscis</i> (16MFT21)	NR_165685.1	100%	99.91%
<i>Bacillus licheniformis</i> (DSM 13)	NR_118996.1	100%	99.91%
<i>Bacillus licheniformis</i> (BCRC 11702)	NR_116023.1	100%	99.91%
<i>Bacillus licheniformis</i> (ATCC 14580)	NR_074923.1	100%	99.82%
<i>Bacillus licheniformis</i> (NBRC 12200)	NR_113588.1	100%	99.73%
<i>Bacillus sonorensis</i> (NBRC 101234)	NR_113993.1	100%	99.73%
<i>Bacillus wezeyi</i> (NRRL B-41294)	NR_157608.1	100%	99.55%
<i>Bacillus aerius</i> (24K)	NR_042338.1	100%	99.27%

*Nota.* Se tomaron las diez mejores puntuaciones de las opciones presentadas en BLASTN

La Figura 27 indica que la cepa A1 tiene mayor relación con *Bacillus wezeyi* cepa NRRL B-41294, al pertenecer estos microorganismos a un mismo clado se puede mencionar que tienen un ancestro en común. En cambio, la cepa que menor relación tiene con la cepa A1 es *Bacillus licheniformis* y sus distintas cepas dado que se encuentran en un clado distinto.

**Figura 27**

Cladograma de microorganismo homólogos a la cepa A1

**Tabla 15**

Microorganismos próximos a la cepa S1

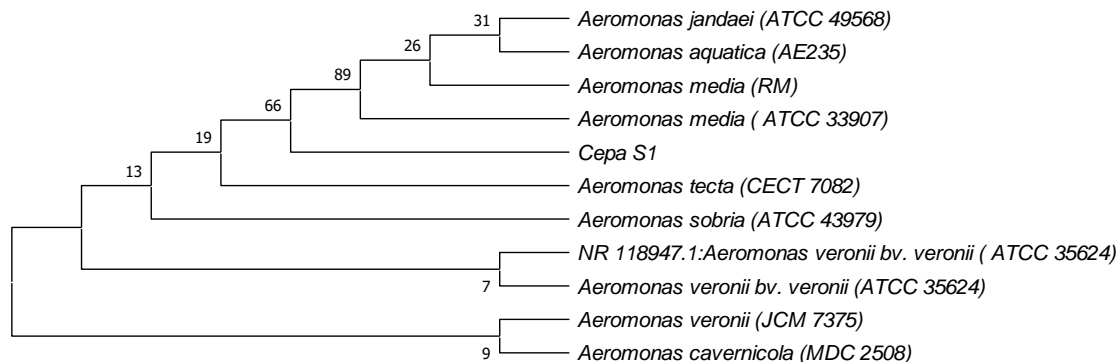
Descripción	Número de acceso	Cobertura de consulta	Porcentaje de identidad
<i>Aeromonas media</i> (ATCC 33907)	NR_119041.1	100%	99.59%
<i>Aeromonas aquatica</i> (AE235)	NR_136829.1	100%	99.59%
<i>Aeromonas tecta</i> (CECT 7082)	NR_118043.1	100%	99.59%
<i>Aeromonas media</i> (RM)	NR_036911.2	100%	99.59%
<i>Aeromonas veronii</i> <i>bv.</i> <i>veronii</i> (ATCC 35624)	NR_119045.1	99%	99.59%
<i>Aeromonas cavernicola</i> (MDC 2508)	NR_132718.1	99%	99.59%
<i>Aeromonas veronii</i> (JCM 7375)	NR_112838.1	99%	99.59%
<i>Aeromonas veronii</i> <i>bv.</i> <i>veronii</i> (ATCC 35624)	NR_118947.1	99%	99.59%
<i>Aeromonas sobria</i> (ATCC 43979)	NR_119044.1	100%	99.48%
<i>Aeromonas jandaei</i> (ATCC 49568)	NR_119040.1	99%	99.59%

Nota. Fueron seleccionadas las mejores puntuaciones indicadas en BLASTN

En la Figura 28 se puede apreciar la cercanía de la cepa S1 con la bacteria *Aeromonas media* cepa ATCC 33907 y las cepas que tiene menor características en común son *Aeromonas veronii* y *Aeromonas cavernicola*.

## Figura 28

Cladograma de microorganismos homólogos a la cepa S1

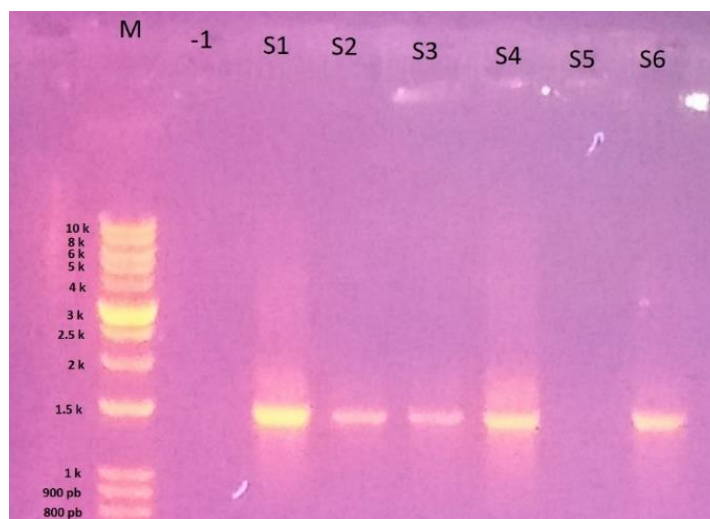


## Metataxonómica

Para mandar a secuenciar a Biosequence posterior a la extracción se realizó una PCR con los cebadores 27F y 1492R para verificar la presencia de ADN de bacterias después se elaboró una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, en el caso del suelo se realizaron seis extracciones de las cuales se seleccionó solamente las tres mejores, tomando en cuenta la intensidad del amplicón presente en el gel de agarosa como se puede observar en la siguiente figura:

## Figura 29

Amplificación del gen 16S de extractos de suelo



Se puede observar que de las 6 extracciones solamente en cinco hay presencia de ADN bacteriano. Las muestras que se mandaron a secuenciar fueron las correspondientes a S1, S4 y S6. M: marcador molecular 1kb “Opti-DNA Marker”.

En cuanto a las extracciones de agua se mandó inmediatamente a secuenciar cuidando la cadena de frío para evitar la degradación del ADN; Biosequence se encargó de medir las concentraciones de las extracciones realizadas. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

**Tabla 16**

*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

*Nota.* Datos proporcionados por Biosequence en el control de calidad. Los resultados fueron aceptados para la secuenciación metagenómica de amplicón 16S por Illumina. Las concentraciones se obtuvieron por medio del instrumento de medición QUBIT.

### **Reinos**

La Tabla 17 indica que en el sedimento de la fuente de agua se logró identificar 112 510 ASVs que en su mayoría (99.88%) fueron bacterias de los cuales 2001 ASVs son distintos y en el agua se encontraron 215 005 ASVs que casi en su totalidad son bacterias en donde 1075 ASVs son únicos.



Tabla 17

*Reinos predominantes en sedimento y agua*

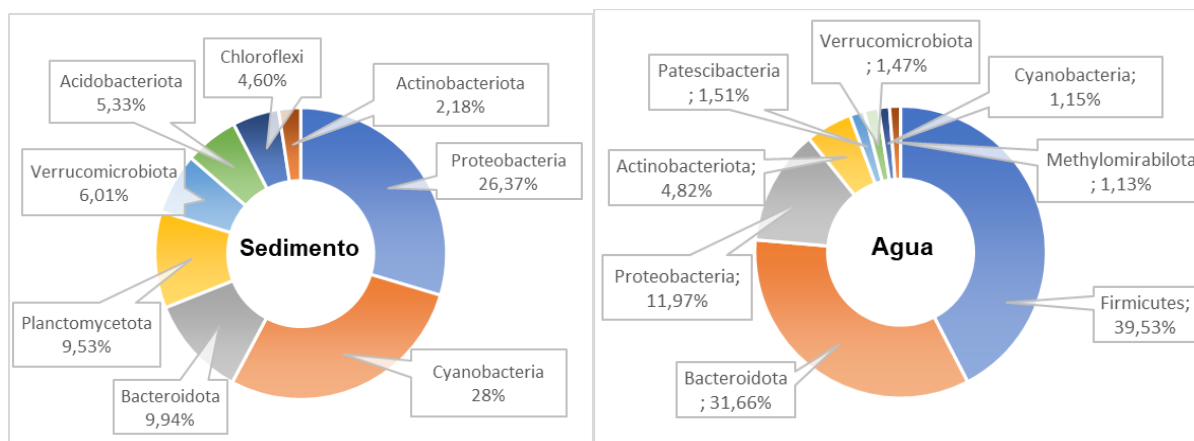
Kingdom	Sedimento		Agua	
	ASVs	Porcentaje	ASVs	Porcentaje
Bacteria	112 374	99,879	213 707	99,4
Eukaryota	71	0,063	370	0,17
Archaea	65	0,058	928	0,43
Total	112 510		215 005	

*Nota.* Los datos indicados son la suma de las tres muestras analizadas de agua y de sedimento. Biosequence amplificó la región v3-v4 del gen ribosomal 16S con los cebadores 341F (5'CCTACGGGNGGCWGCAG3') y 805R (5'GACTACHVGGGTATCTAATCC3') mediante la tecnología Illumina "Miseq".

**Filos**

El tratamiento de datos reveló que las filos con mayor presencia en el sedimento fueron Proteobacteria (26.37%) seguido del filo Cyanobacteria (25.10%), Bacteroidota (9.94) y Planctomycetota (9.53%); en cambio en el agua prevalecen principalmente los filos Firmicutes (39.53%), Bacteroidota (31.66%), Proteobacteria (11.97%) y por último se encuentra Actinobacteriota con 4.82%, en la Figura 30 se puede apreciar los diez filos que destacan en ambos ambientes.

Figura 30

*Filos presentes en sedimento y agua*

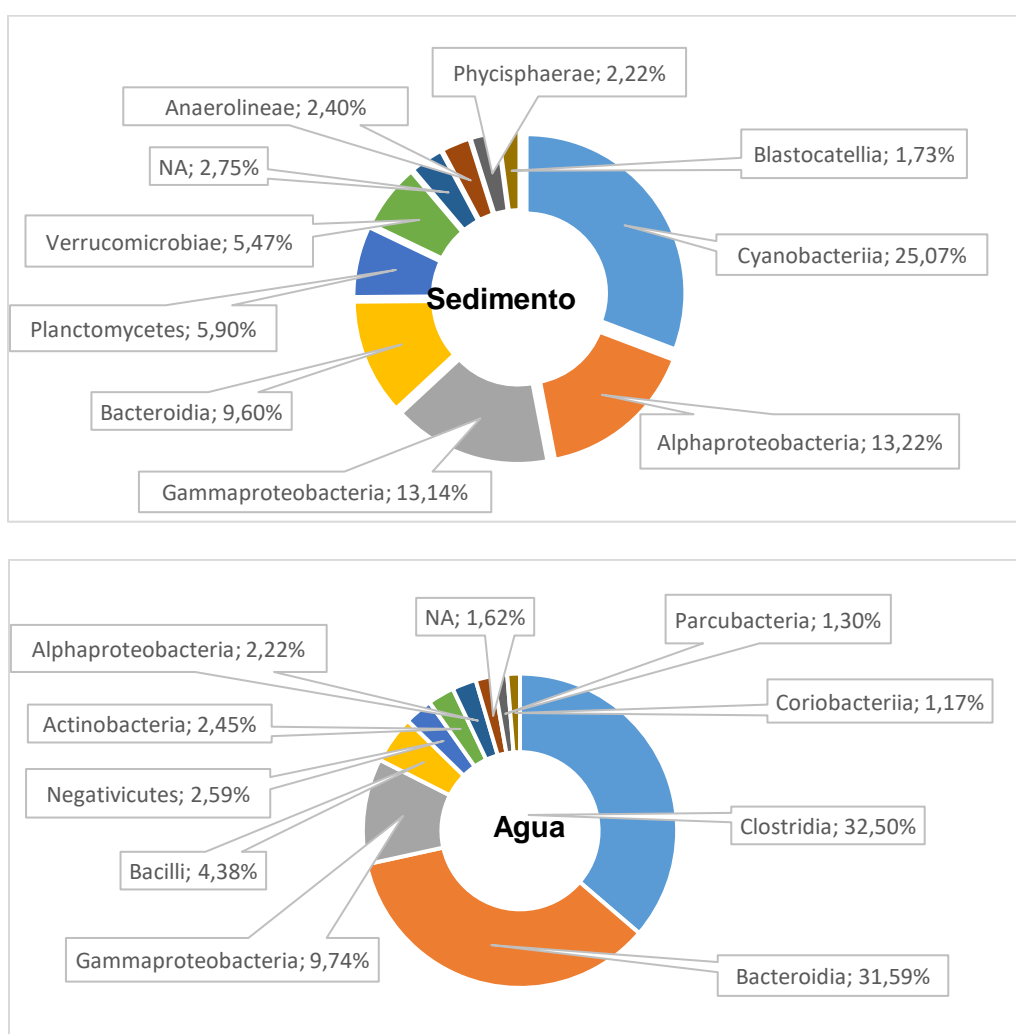
*Nota.* Se omitieron aquellos que tuvieron un porcentaje menor al 2% de abundancia relativa

## Clases

En el sedimento, la clase con mayor cantidad fue Cianobacteria con un 25.07% seguido de Alphaproteobacteria (13.22%) y Gammaproteobacteria (13.14%) del total de los ASVs analizados; en el agua se encontró la abundancia más alta repartida en tres clases principales: Nanoarchaeia (46.08%), Iainarchaeia (17.6%) y Methanobacteria (10.89%) (Figura 31).

**Figura 31**

*Clases principales en sedimento y agua*



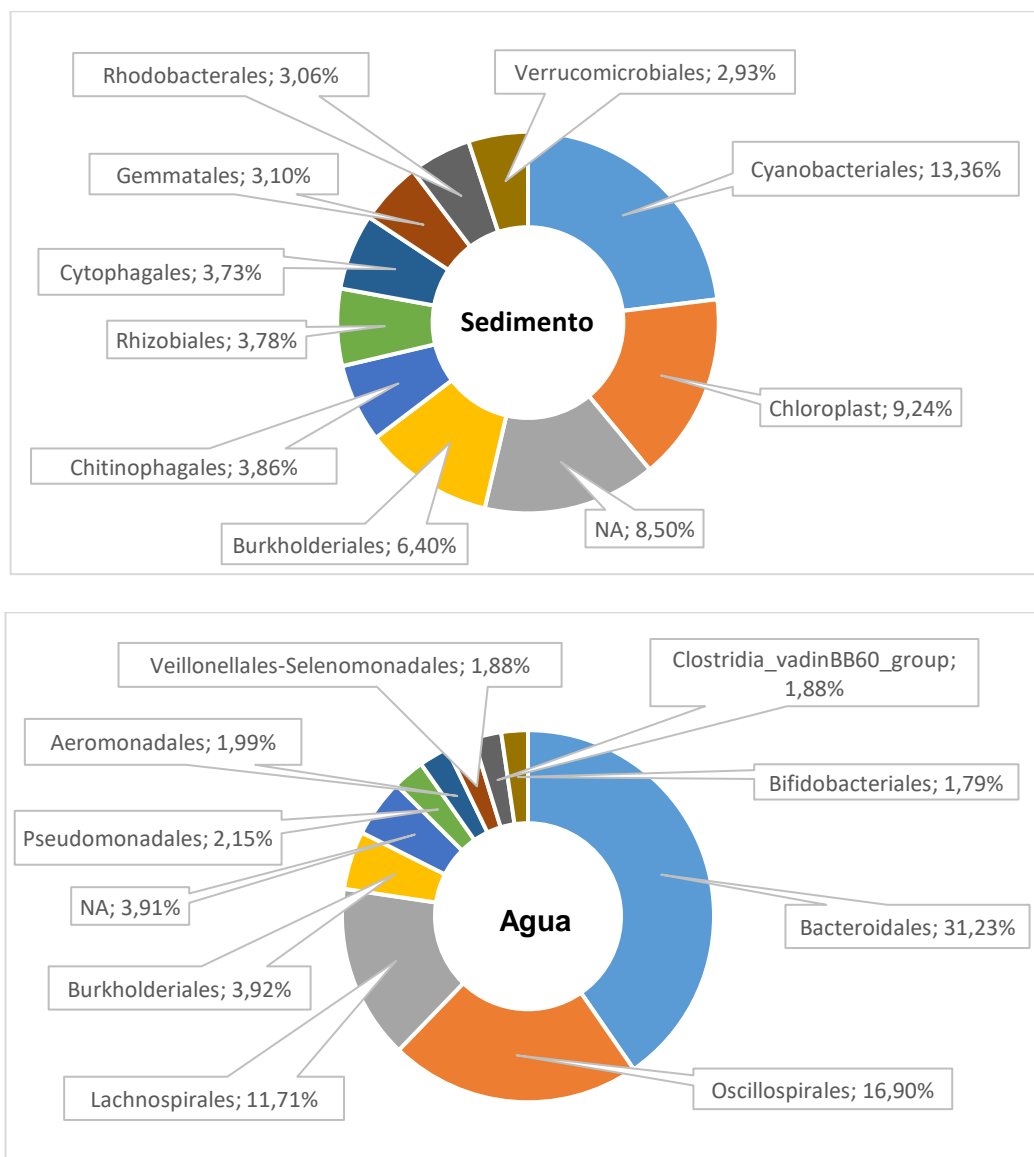
Nota. NA: Clases no identificadas

## Ordenes

La abundancia de Cyanobacteriales, Chloroplast y Burkholderiales en el sedimento son dominantes en relación con los demás, por el contrario, las ordenes que tienen mayor presencia en el agua son: Bacteroidales, Oscillospirales y Lachnospirales (Figura 32).

**Figura 32**

*Ordenes principales en sedimento y agua*



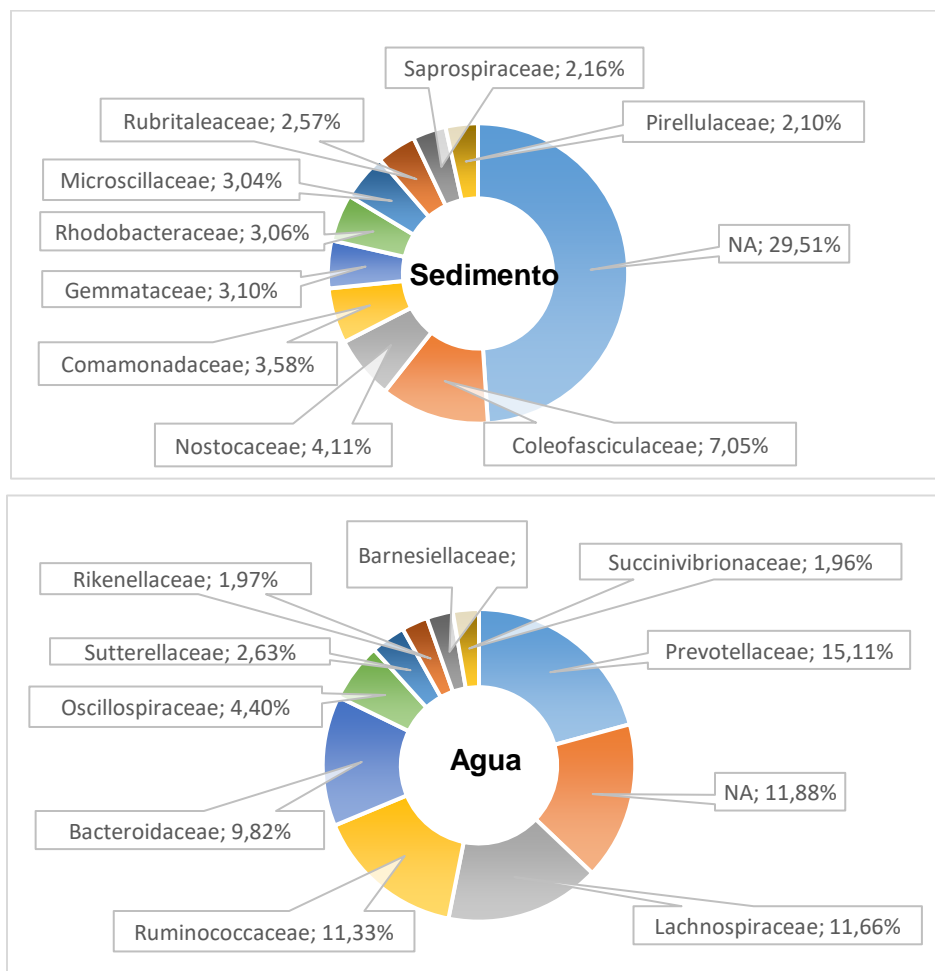
*Nota.* NA: Ordenes no identificadas

## Familias

En la Figura 33 se observa que en esta jerarquía taxonómica no se logró clasificar alrededor del 29.51% de los ASVs identificados en sedimento, aunque la familia que predomina con un 7.05% es Coleofasciculaceae. En el agua solamente el 11.88% de las lecturas no se pudo clasificar, en este caso tienen mayor abundancia la familia Prevotellaceae con un 15.88% seguida de Lachnospiraceae (11.66%), Ruminococcaceae (11.33%) y Bacteroidaceae con un 9.82%.

**Figura 33**

*Familias principales en sedimento y agua*



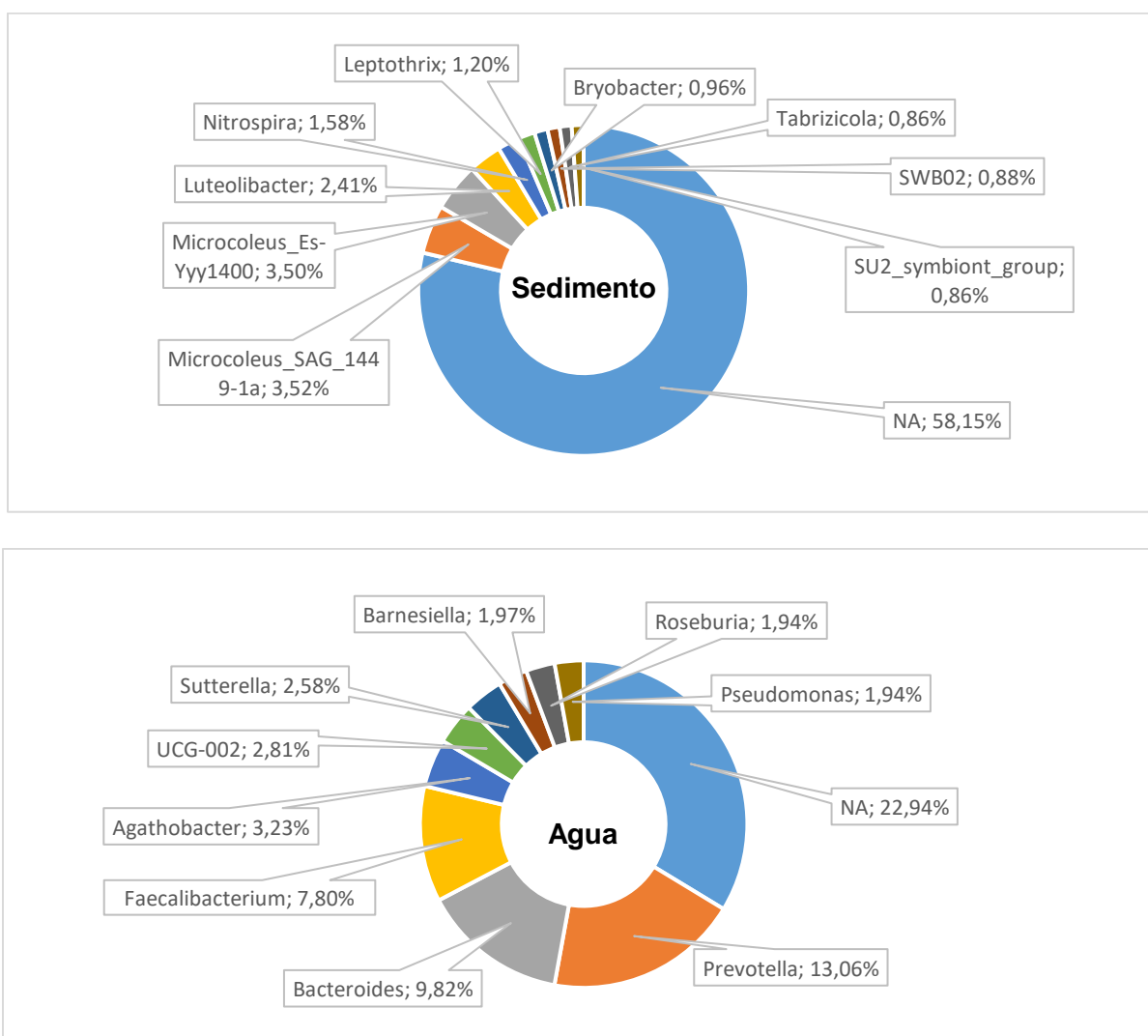
*Nota.* NA: Familias no identificadas

## Géneros

En el nivel de género no se logró clasificar el 58.15% y 22.94% de los ASVs de sedimento y agua respectivamente, los datos que se lograron identificar en los dos ambientes se indican en la Figura 34. Las Tablas 18 y 19 se indican los géneros que tuvieron una abundancia relativa mayor al 0.2%.

**Figura 34**

*Géneros principales en sedimento y agua*



*Nota.* Se representó únicamente los 10 mejores porcentajes

**Tabla 18**

Resultados analizados de la secuenciación metagenómica de amplicón 16S de muestras de agua

Género	ASVs	Porcentaje	Género	ASVs	Porcentaje	Género	ASVs	Porcentaje
NA	48381	22,64	<i>Dialister</i>	1633	0,76	<i>Anaerostipes</i>	671	0,31
<i>Prevotella</i>	28085	13,14	<i>Catenibacterium</i>	1612	0,75	<i>Rikenellaceae_RC9_gut_group</i>	662	0,31
<i>Bacteroides</i>	21124	9,88	<i>Phascolarctobacterium</i>	1516	0,71	<i>Holdemanella</i>	617	0,29
<i>Faecalibacterium</i>	16771	7,85	<i>wb1-A12</i>	1404	0,66	<i>Treponema</i>	604	0,28
<i>Agathobacter</i>	6934	3,24	<i>Subdoligranulum</i>	1197	0,56	<i>Fusicatenibacter</i>	565	0,26
<i>UCG-002</i>	6041	2,83	<i>Alloprevotella</i>	1186	0,55	<i>Paraprevotella</i>	539	0,25
<i>Sutterella</i>	5544	2,59	<i>Nitrospira</i>	1164	0,54	<i>Pantoea</i>	534	0,25
<i>Barnesiella</i>	4234	1,98	<i>Streptococcus</i>	1122	0,53	<i>Coprococcus</i>	516	0,24
<i>Roseburia</i>	4180	1,96	<i>Slackia</i>	1081	0,51	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	515	0,24
<i>Pseudomonas</i>	4178	1,96	<i>Negativibacillus</i>	1029	0,48	<i>Lactobacillus</i>	501	0,23
<i>Bifidobacterium</i>	3838	1,80	<i>Aquabacterium</i>	933	0,44	<i>Escherichia/Shigella</i>	485	0,23
<i>Alistipes</i>	3582	1,68	<i>Monoglobus</i>	931	0,44	<i>Rhodopirellula</i>	472	0,22
<i>Succinivibrio</i>	3315	1,55	<i>Anaeroplasma</i>	875	0,41	<i>Erysipelotrichaceae_UCG-003</i>	462	0,22
<i>Ruminococcus</i>	3261	1,53	<i>Collinsella</i>	847	0,40	<i>NK4A214_group</i>	459	0,21
<i>Blautia</i>	2784	1,30	<i>Sh765B-TzT-35</i>	804	0,38	<i>Odoribacter</i>	442	0,21
<i>Megasphaera</i>	2019	0,94	<i>Gaiella</i>	803	0,38	<i>Acinetobacter</i>	441	0,21
<i>UCG-005</i>	1826	0,85	<i>Lachnospira</i>	803	0,38	<i>Lactococcus</i>	435	0,20
<i>Parabacteroides</i>	1779	0,83	<i>Elusimicrobium</i>	766	0,36			
<i>Akkermansia</i>	1670	0,78	<i>Christensenellaceae R_group</i>	739	0,35			

*Nota.* ASVs bacterianos totales en muestras de sedimento = 213 707. Se omitieron los géneros que tuvieron un porcentaje menor al 0.2%.

Tabla 19

Resultados analizados de muestras de sedimento

Género	ASVs	Porcentaje	Género	ASVs	Porcentaje	Género	ASVs	Porcentaje
NA	65292	58,10	<i>OLB12</i>	622	0,55	<i>Chalicogloea</i>	319	0,28
<i>Microcoleus SAG 1449-1a</i>	3960	3,52	<i>Ellin6067</i>	585	0,52	<i>CCALA_975</i>		
<i>Microcoleus Es-Yyy1400</i>	3936	3,50	<i>JGI_0001001-H03</i>	519	0,46	<i>Calothrix</i>	305	0,27
<i>Luteolibacter</i>	2709	2,41	<i>Haliangium</i>	495	0,44	<i>PCC-6303</i>		
<i>Nitrospira</i>	1778	1,58	<i>Rubrimonas</i>	486	0,43	<i>Pir4_lineage</i>	304	0,27
<i>Leptothrix</i>	1348	1,20	<i>MND1</i>	483	0,43	<i>Chthoniobacter</i>	291	0,26
<i>Bryobacter</i>	1079	0,96	<i>SM1A02</i>	479	0,43	<i>Oscillochloris</i>	288	0,26
<i>SWB02</i>	992	0,88	<i>Illumatobacter</i>	463	0,41	<i>AKYG587</i>	287	0,26
<i>Tabrizicola</i>	967	0,86	<i>Nodosilinea</i>	463	0,41	<i>Novosphingobium</i>	272	0,24
<i>SU2_symbiont group</i>	965	0,86	<i>PCC-7104</i>			<i>Nostoc_PCC-73102</i>	267	0,24
<i>Amphiplicatus</i>	886	0,79	<i>Azohydromonas</i>	442	0,39	<i>Rubrivivax</i>	266	0,24
<i>Rhodobacter</i>	861	0,77	<i>Acidibacter</i>	406	0,36	<i>Hyphomonas</i>	260	0,23
<i>Fimbrigiobus</i>	821	0,73	<i>Sphingopyxis</i>	400	0,36	<i>Polycyclovorans</i>	255	0,23
<i>Pseudomonas</i>	765	0,68	<i>Gemmatimonas</i>	384	0,34	<i>Haliscomenobacter</i>	251	0,22
<i>Rivibacter</i>	740	0,66	<i>966-1</i>	349	0,31	<i>Blastopirellula</i>	249	0,22
<i>Hyphomicrobium</i>	732	0,65	<i>Pedomicrobium</i>	345	0,31	<i>IS-44</i>	243	0,22
<i>Gemmata</i>	714	0,64	<i>YB-42</i>	345	0,31	<i>Paludibaculum</i>	240	0,21
<i>Pirellula</i>	669	0,60	<i>Lacunisphaera</i>	342	0,30	<i>Ahniella</i>	238	0,21
			<i>Flavobacterium</i>	327	0,29	<i>Candidatus</i>	229	0,20
			<i>Leptolyngbya.ANT.L52.2</i>	325	0,29	<i>Chloroploca</i>		
						<i>JdFR-76</i>	226	0,20

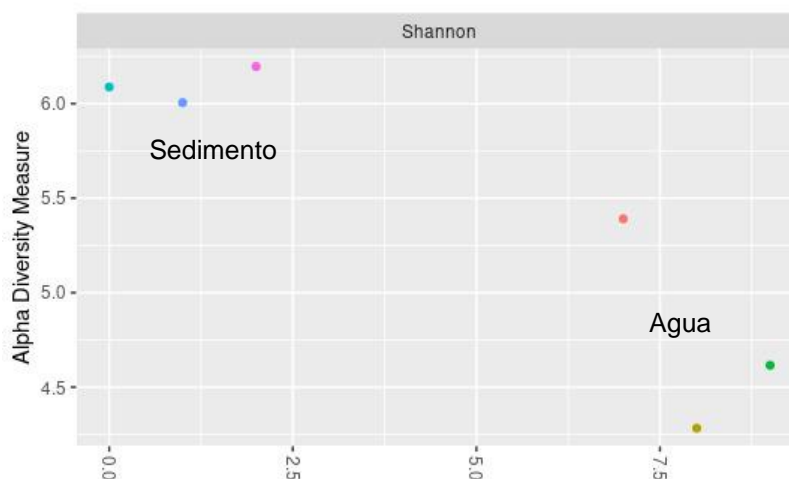
Nota. ASVs totales en muestras de agua= 112 374. Se omitieron los porcentajes menores al 0.2%.

## Diversidad bacteriana

Para determinar la diversidad entre las muestras recolectadas, se empleó el índice de Shannon para indicar que las muestras de sedimento tienen una diversidad levemente mayor a las de agua (Figura 35). También se efectuó un análisis multidimensional no paramétrico (NMDS) en base a la distancia Bray-Curtis que determina la disimilitud entre grupos, se encontró que el agua y el sedimento contienen comunidades bacterianas ligeramente distintas (Figura 36).

**Figura 35**

*Índice de Shannon*



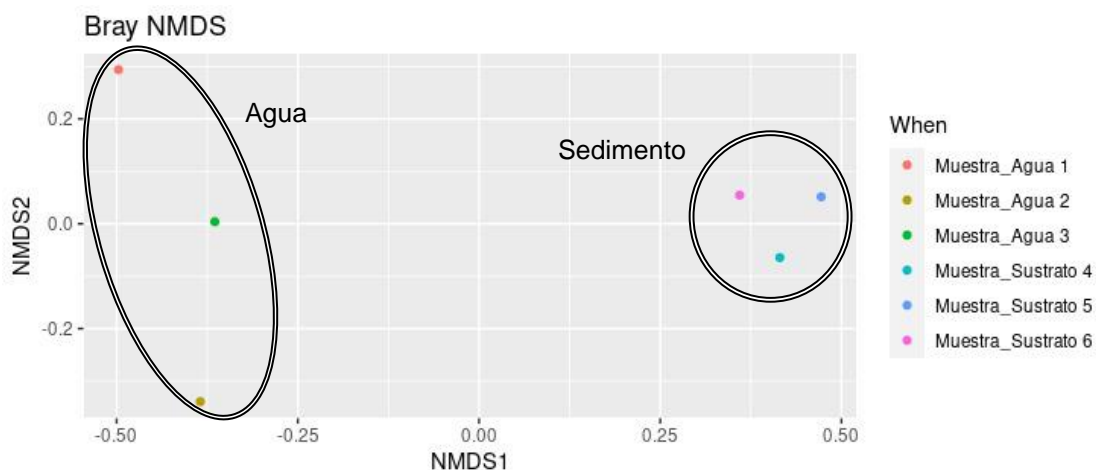
*Nota.* Las muestras dos y cinco se recolectaron en un día de lluvia, el resto se recolectó en días secos.

La medida de diversidad alfa indica que en días lluvia (muestra dos) la cantidad de bacterias disminuye drásticamente en el agua mientras que en días secos hay la posibilidad de encontrar una mayor cantidad de microorganismos (muestra uno y tres); en tanto que las bacterias que conforman el microbiota del sedimento no disminuye significativamente (muestra cuatro).



**Figura 36**

*Análisis multidimensional no paramétrico*



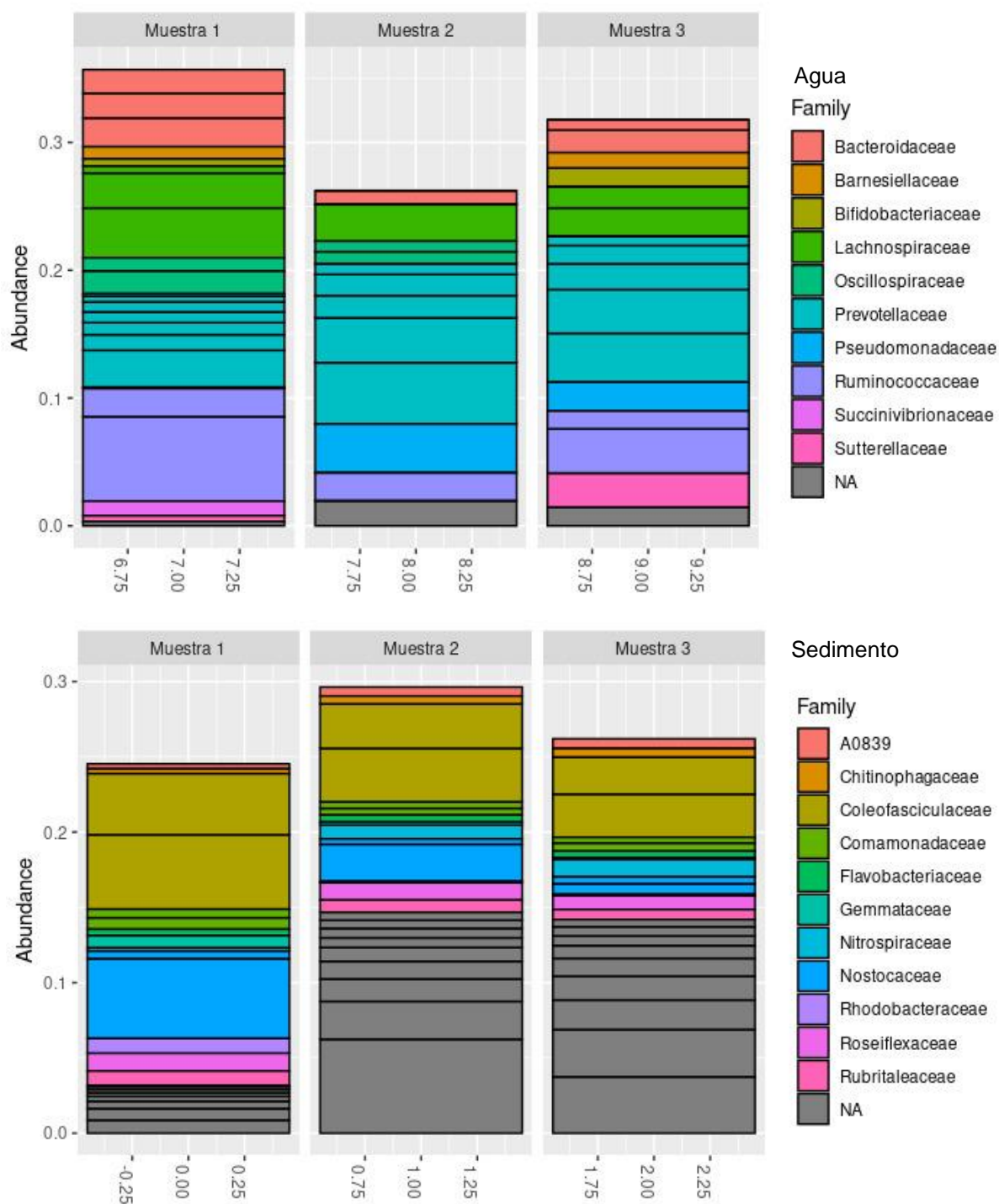
*Nota.* Las muestras dos y cinco se recolectaron en día de lluvia y el restante en días secos

El NMDS indica que en las muestras de sedimento no hay variación de la comunidad bacteriana, la cercanía al cero (del eje NMDS2) indica que prácticamente las comunidades son las mismas. En las muestras de agua, se puede apreciar cierto espacio que no superan el 0.3 indicando que hay una ligera diferencia en la composición de las bacterias presentes.

Las Figuras 37 y 38 indica la composición microbiana de cada una de las muestras (tres de agua y tres de sedimento), se puede observar que tienen mucha similitud entre muestras complementado la información de la Figura 35, además esto indica la reproductibilidad de los resultados.

Figura 37

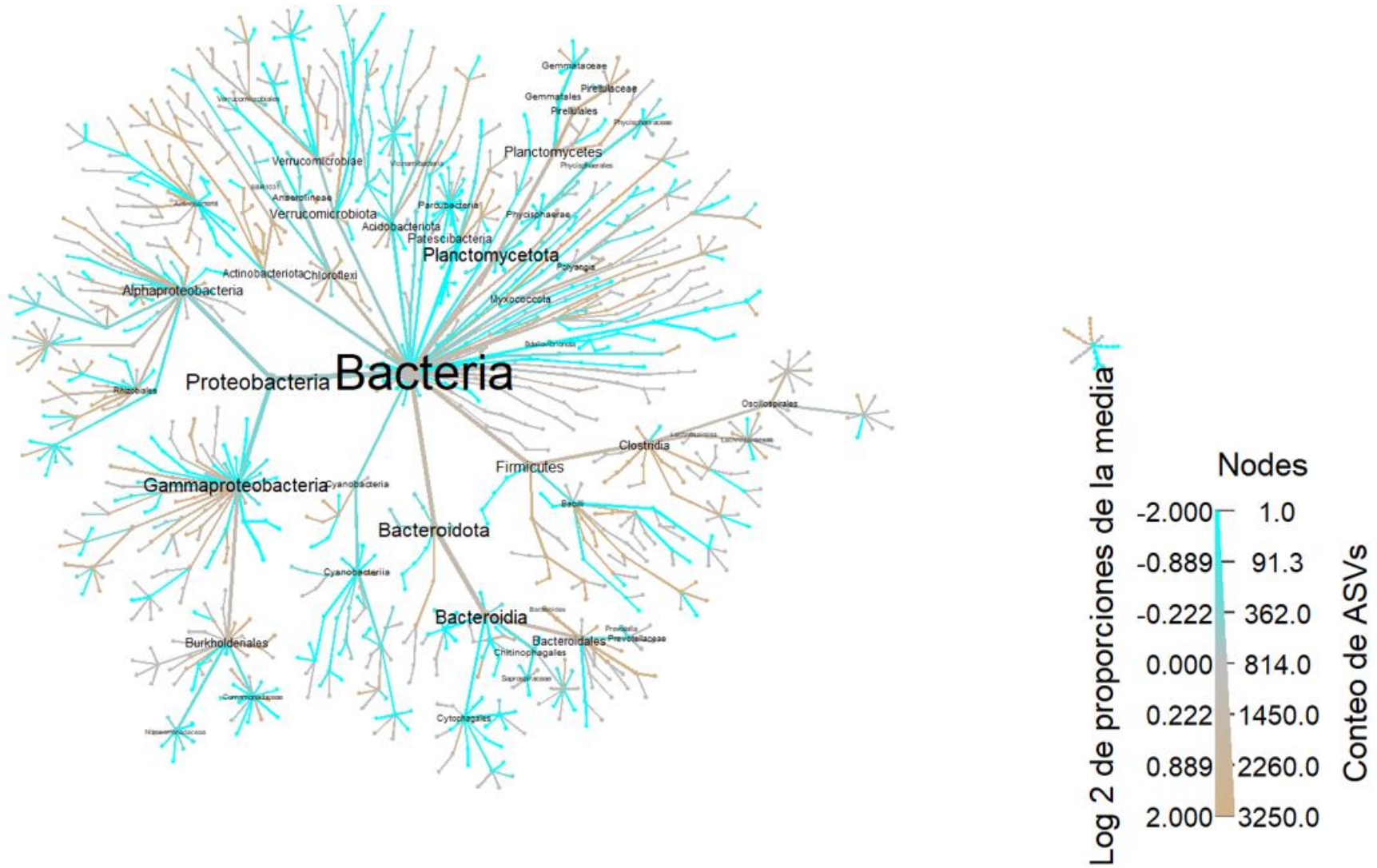
Composición microbiana a nivel de Familia



Nota. Se utilizó el paquete "phyloseq" versión 1.30.0 en Rstudio.

Figura 38

Árbol taxonómico de calor



## Capítulo V: Discusión

### Análisis físico-químico

Los parámetros analizados tanto en época de lluvia como en seca cumplen en su gran mayoría los límites dictaminados por el acuerdo ministerial 097-A, excepto por el oxígeno disuelto (OD) que tiene concentraciones muy bajas, lo que contrasta con los estudios realizados por Bu et al. (2020) que encontraron concentraciones muy pequeñas de OD en aguas subterráneas en la zona oriental de China. Se puede atribuir las pequeñas cantidades de OD al proceso de desnitrificación que ocurren en la capa freática del efluente, este proceso consume oxígeno minimizando su concentración en el agua (Konan et al., 2020). La cantidad de oxígeno al no ser suficientes puede generar un estado de estrés en los peces haciendo que surjan infecciones oportunistas que se relacionan con necrosis en branquias y en consecuencia pueden provocar la muerte (S. J. Scott & Bollinger, 2014).

La presencia de amoníaco ( $\text{NH}_4^+$ ) en la temporada seca, aunque cumple con los límites, es un indicador de contaminación por infiltración de compuestos contenidos en estiércol aprovechado como abono en plantas ubicadas en la parte superior del efluente hídrico, según Konan et al. (2020) la presencia de amoníaco en aguas subterráneas se debe a actividades agrícolas y abonos que contiene heces de animales que se drenan hasta llegar al líquido vital; esto corrobora los resultados obtenidos en esta investigación.

La presencia de arsénico en la época de lluvia infringe la normativa, en la investigación de Podgorski & Berg (2020) se afirma que la existencia de este metal en aguas subterráneas se da de forma natural y puede estar distribuido en gran parte de la corteza terrestre formando compuestos con varios metales como el plomo, zinc y cobalto (A. Rahman & Rahaman, 2018), lo que coincide con los resultados obtenidos. Dado que el pH en todo momento se encuentra por debajo de 9.2 y su entorno tiene condiciones reductoras, la especie predominante es el As (III) formando el compuesto arsenito sin carga  $\text{H}_3\text{AsO}_3^0$  (Edmunds et al., 2015). La ausencia de

este metal en la época seca podría explicarse por las reacciones de adsorción y precipitación que sufre el arsénico con minerales presente en la arcilla a un pH cercano al neutro (W. Cao et al., 2022; Edmunds et al., 2015).

Danczak et al. (2019) observaron que la movilidad del arsénico también es influenciada en parte por el metabolismo microbiano de bacterias resistentes que son capaces de reducir y transportar en su interior este metal, pueden retenerlo mediante procesos de oxidación; es posible que, en época de lluvia se desprendieran bacterias con arsénico en su interior provocando su presencia. Tomando en consideración el valor del pH en época de lluvia, Mayorga (s.f.) asevera que cuando hay valores cercanos a 8.5 o superiores el arsénico adsorbido por el sedimento comienza a liberarse y si hay presencia de bicarbonato, la adsorción de As disminuye drásticamente, esto explica las concentraciones obtenidas en tiempo de lluvia.

El arsénico en el agua es un riesgo para la piscicultura en vista de que se acumula en tejidos como el hígado, retina y riñones de los peces provocando una alteración en su sistema inmune disminuyendo algunos anticuerpos (Kumar et al., 2023), haciéndola inadecuada para la crianza de peces.

Varios estudios (Mijic et al., 2020; Spreadbury et al., 2021; Q. Yang et al., 2020) indican que el Pb puede estar presente en lixiviados de asfalto de carreteras y puede llevar a fuentes subterráneas de agua por procesos de infiltración de varios años y más aún cuando se utiliza asfalto recuperado en la pavimentación; esto podría explicar su presencia en las muestras de agua analizadas en la temporada de lluvia, ya que la fuente hídrica se encuentra aproximadamente a 100 metros de bajo de la carretera vía Pisque-Puéllaro y por información obtenida de los moradores, se conoce que esta vía fue arreglada con asfalto recuperado por varias ocasiones. Igualmente, el Pb puede estar presente debido al uso constante de pesticidas que tienen este elemento y en conjunto con la aplicación habitual de fertilizante en suelo

agrícola hacen que el suelo disminuya su pH, facilitando la movilidad de este metal pesado a fuentes de agua subterráneas a través de la infiltración en presencia de lluvia (Wongsasuluk et al., 2014). De acuerdo con la investigación de Kumar et al. (2023) se afirma que los peces tienen la capacidad de bioacumular este metal en sus músculos generando efectos de cáncer en su desarrollo; esta hace que el agua en cuestión no sea adecuada para actividades de piscicultura sin un tratamiento previo para su uso.

Según Q. Wang et al. (2022) la presencia de varios metales pesados puede hacer cambios en la comunidad microbiana del agua, esto podría provocar un desequilibrio en las comunidades microbianas haciendo que las bacterias oportunistas se encuentren en mayor proporción, Attramadal et al. (2014) sugiere que para el buen desarrollo de los alevines es preferible tener un ambiente con abundantes especies probióticas, bacterias que favorezcan su crecimiento tales como las comunidades microbianas maduras y poca cantidad de microorganismos oportunistas; lamentablemente estas condiciones no son cumplidas ya que se ha encontrado una gran porcentaje de bacterias oportunistas (Filo Bacteroidota 31.66% en agua) a más de ello se han encontrado microbios indicadores de contaminación.

### **Análisis de coliformes fecales**

Los coliformes fecales son uno de los parámetros biológicos que se toman en cuenta para determinar la calidad del agua con el fin de indagar posibles contaminantes e incluso mencionar su origen con diferentes técnicas moleculares como la PCR cuantitativa (Lutterodt et al., 2021; Z. Ur Rahman et al., 2021; Zhang et al., 2014). Según la investigación de Aram et al. (2021) la presencia de plomo o cadmio en aguas subterráneas están relacionados con la contaminación de coliformes fecales, esto corrobora los resultados obtenidos en este estudio debido al hallazgo de coliformes tanto en placas Petrifilm 3M (Tabla 12) como a través del método NMP (Figura 20) junto a la presencia de plomo (Tabla 11) en el efluente hídrico. Si bien la cantidad de coliformes totales se encuentra dentro de la normativa, es un indicativo de que

realmente hay contaminación fecal en el lugar de estudio. Es posible que la poca cantidad que se obtuvo ( $1.40 \pm 1.09$  UFC/mL en Petrifilm 3M; 4.5 NMP/100mL) en los ensayos se deba al proceso de unión de los coliformes (tales como *E. coli*) a partículas de sedimento de entre 4 a 8  $\mu\text{m}$  que sedimentan de forma natural, disminuyendo su concentración en el agua y dejando de ser parte del resto de las bacterias planctónicas (Wu et al., 2019).

Varias investigaciones (Duman et al., 2019; Hamilton et al., 2020) advierten que las aguas contaminadas por coliformes fecales, son un riesgo para la piscicultura en vista de la acumulación de estos microorganismos en la mucosa de los peces que al ser usados como alimento son fuentes de varias infecciones estomacales que pueden ser graves; esto sugiere que es preferible realizar un proceso de eliminación de coliformes antes de su uso en la crianza de peces a fin de evitar complicaciones de salud tanto al personal que se encarga del cuidado como a los posibles consumidores.

### **Análisis del aislamiento e identificación de bacterias**

Se logró aislar cuatro microorganismos, los cuales al realizar la tinción Gram se los clasificó como bacilos gramnegativos (Figuras 22, 23, 24 y 25), estos resultados coinciden con los obtenidos por García-López et al. (2004) donde encontraron 44 bacilos gramnegativos provenientes de una fuente de agua dulce, además informan que cada uno de esos bacilos se cultivó en medio TSA que posteriormente fueron identificados mediante métodos de secuenciación del gen 16S. Gracias al análisis comparativo en BLASTN de las secuencias consenso obtenidas en el programa "Geneious" a partir de la secuenciación Sanger del gen ribosomal 16S rRNA se llegó a determinar las posibles bacterias *Bacillus swezeyi* y *Aeromonas media*. En la investigación de Dunlap et al. (2017) reportan el aislamiento de *B. swezeyi* en medio de cultivo TSA y agar nutriente mencionando que su crecimiento fue abundante, corroborando los resultados de esta investigación, adicionalmente describen que sus condiciones óptimas de temperatura y pH son de 37°C y 7 respectivamente. Latif-Eugenín et al.

(2016) informan que es posible el aislamiento y cultivo en medio TSA de varias especies del género *Aeromonas* incluido *Aer. media* con un buen crecimiento aseverando los resultados obtenidos y según Kuncham et al. (2017) es posible identificar especies bacterianas mediante el gen 16S corroborando estos resultados. Esta bacteria es un patógeno oportunista usualmente relacionado con *Aer. rivipollencis* que tiene cualidades de resistencia a antibióticos de lactamasas aumentando su virulencia hacia los peces de su entorno (Fono-Tamo et al., 2023; Talagrand-Reboul et al., 2017); estas especies representan otro peligro en las actividades de la piscicultura principalmente si se realiza un sistema de recirculación debido a su posible proliferación en las piscinas. En Dinamarca aislador *Aer. media* e identificaron varios genes de resistencia a antibióticos (Ampicilina, ceftiofina, cefalotina, penicilina, tetraciclina y amoxicilina) e incluso descubrieron la posibilidad de que esta especie pueda transmitir estas características de resistencia antimicrobiana y virulencia a otras especies bacterianas (Dubey et al., 2022) intensificando aún más el riesgo de contraer infecciones en el cultivo de peces. Varias investigaciones (Austin & Austin, 2012a; Pękala-Safińska, 2018; Woo & Bruno, 2011) relacionan la presencia de bacterias del género *Aeromonas* con distintas enfermedades como: Flavobacteriosis (*Fla. columnare*); necrosis producida por *Pangasius hypophthalmus*, infecciones por *Pseudomonas sp.* y *Shewanella putrefaciens*; septicemias con microorganismos del género *Edwardsiella*; entre otras.

En las dos muestras restantes no se logró formar las secuencias conciso debido a posibles errores en la elaboración del amplicón, concentraciones inadecuadas de cebadores con relación al fragmento objetivo de ADN o incluso en el control de calidad (Crossley et al., 2020).

### **Análisis de la metataxonómica**

En la investigación de Rieder et al. (2023) se sugiere que las secuencias de lectura corta son adecuados para determinar la composición de una comunidad microbiana con



excelentes resultados, incluyendo que tiene un costo bajo y las herramientas para el análisis del gen ribosomal 16S tienen un alto rendimiento, las herramientas usadas en esta investigación (DADA2, phyloseq) sostienen dichas recomendaciones ya que gracias a estas aplicaciones se logró analizar con éxito los datos proporcionados por Biosequence, sobre todo DADA2 que tiene una sensibilidad muy alta en la formación de ASVs a partir de secuencias “single ends” por su aprendizaje de errores a partir de datos proporcionados (Callahan et al., 2016), este procedimiento hace que los datos de baja calidad sean optimizados y posteriormente generar buenos resultados.

Esta parte de la investigación se basó en el análisis de variantes de secuencias de amplicón (ASVs) en vez de las unidades taxonómicas operativas (OTUs) debido a que los procedimientos basados ASVs tienen mayor exactitud por la eliminación de ruidos permitiendo hallar diferentes cepas bacterianas con una mínima diferencia en las secuencias presentes en muestras ambientales (Chiarello et al., 2022).

### ***Composición de la comunidad bacteriana***

El filo con mayor abundancia en el agua fue Firmicutes con un 39.53% y en sedimento fue el filo Proteobacteria con 26.37% (Figura 30), estudios recientes (Goma-Tchimbakala et al., 2022; Khandelwal et al., 2022) comunican que por lo general estos microorganismos se encuentran en lugares contaminados con petróleo, debido a su gran capacidad de resistencia y degradación de hidrocarburos complejos; esto sugiere que el agua del sitio de estudio está contaminado con petróleo confirmando la posibilidad de contaminación por los lixiviados de asfalto provenientes de la carretera situada en la parte superior del ojo de agua. Si bien estas bacterias no tienen un efecto directo en la piscicultura, son indicativos de contaminación de derivados de petróleo que es perjudicial para los peces por sus efectos cancerígenos.

Sin embargo, en la investigación de D'Auria et al. (2018) también se encontró la dominancia de bacterias concernientes al filo Proteobacteria indicando que su presencia se

debe principalmente a guano de murciélagos que habitan en el interior de las cuevas y que microorganismos del filo Firmicutes son habituales en todos los lugares con agua que presentan contaminación por materia orgánica de origen humano o animal. Hedrich et al. (2011) reportaron la presencia de varias bacterias de los filos Proteobacteria, Nitrospirae y Firmicutes capaces de oxidar el hierro II a hierro III en condiciones anóxicas, haciendo que se precipite y se inmovilice en las partes profundas de los lugares acuáticos, esta puede ser una de las posibles razones por las cuales en el análisis físico-químico no se encontraron cantidades suficientes de este metal en las muestras tomadas.

El filo Bacteroidota (31.66%), es el segundo más abundante en el agua (Figura 30), está conformado mayormente por bacterias oportunistas de los géneros *Flavobacterium*, *Cytophaga* y *Bacteroides* (gramnegativas quimio-heterótrofas) que se mueven mediante la corriente del agua y sus principales huéspedes son los peces que encuentran a su alcance (Hudson & Egan, 2022); esto puede resultar en una pérdida económica en la piscicultura en vista de las enfermedades que pueden contraer los peces en su crecimiento.

Los microorganismos del tercer filo que destaca con un 4.82% denominado Actinobacteriota, son consideradas como probióticos muy beneficiosos para mantener una buena salud en los sistemas de piscicultura; en donde resalta el género *Streptomyces* que tiene una capacidad antimicrobiana eficaz en prevenir enfermedades, además es capaz de degradar materia orgánica e inorgánica considerada como desechos (James et al., 2023), por esta razón se debe seleccionar un método adecuado de tratamiento de agua que permitan aumentar la cantidad de este tipo de bacterias antes de su manejo y de esta forma no depender del uso excesivo de antibióticos para el control de enfermedades.

Las clases Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria presentes en agua y sedimento (Figura 31), tienen un papel importante en la degradación de materia orgánica como lo mencionan Taniguchi et al. (2020) estas bacterias son esenciales para la sostenibilidad en la

acuicultura, lo anterior permite deducir que esta fuente hídrica tiene una ventaja en cuanto a la eliminación de heces que pueden producir los peces; por el otro lado la clase Clostridia es reconocida por la alta capacidad que tiene al desintegrar carbohidratos complejos mediante su fermentación en el intestino de los peces provocando problemas digestivos (Salas-Leiva et al., 2020).

(Schriewer et al., 2010) en su estudio describen el uso de bacterias del orden Bacteroidales como marcadores de contaminación fecal animal, es decir, su presencia en fuentes de agua sugiere que están contaminadas; en este caso al encontrar coliformes fecales por diferentes métodos (Figura 16 y 20) es necesario un tratamiento o controlar dichas fuentes que alteran la composición natural del agua. Dentro de este Orden se encuentra el género *Prevotella* que fue el de mayor abundancia de ASVs encontrados e identificados (Figura 34), según Koskey et al. (2014) su presencia se debe a que la contaminación fecal es de origen humano; la posible explicación de estos resultados se debe a que en la parte superior del ojo de agua se encuentra el asentamiento de una familia que por la falta de alcantarillado utilizan un pozo séptico y su infiltración alcanzó las aguas subterráneas que conectan con la fuente de agua. Por otro lado, también se detectó ASVs de los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Lactococcus* que son comunes en las heces de murciélagos (Dimkić et al., 2021) confirmando la presencia de estos animales en los alrededores del lugar de estudio.

En los resultados obtenidos también se encontró evidencias de la presencia de bacterias del género *Acinetobacter* del filo Proteobacteria, esto indica el riesgo de que en el agua existan especies capaces de causar infecciones a los peces causando varios síntomas como congestión branquial e inflamación intestinal que impiden su correcto desarrollo y por ende pérdidas económicas en la piscicultura (Peçkala-Safińska, 2018), recientemente se ha detectado la especie *A. Iwoffii* en peces con úlceras en la piel, hemorragias alrededor de la boca y en los órganos internos en la región de China (S. Cao et al., 2018).

Se divisó la presencia de los géneros *Aeromonas* y *Flavobacterium* en un bajo porcentaje confirmando los resultados de Rieder et al. (2023) que describe una ventaja importante en la aplicación de metataxonómica en el análisis de aguas para la piscicultura mencionando que es posible detectar la presencia de especies oportunistas como lo son *Aeromonas* y *Flavobacterium* que podrían generar espacios ideales para bacterias patógenas, esta información permite idear un tratamiento específico con el fin de eliminar dichos microorganismos evitando así inconvenientes futuros mejorando la gestión de la crianza de peces. Bartelme et al. (2019) también encontraron la presencia de *Flavobacterium* en varias fuentes de agua utilizadas para la acuicultura mencionando que es posible evidenciar la presencia de *Flavobacterium spartasii*, *F. columnare*, *F. branchiophilum* y *F. psychrophilum* responsables de diversas enfermedades sistémicas de los peces (Chen et al., 2017). En la investigación de S. J. Scott & Bollinger (2014) lograron aislar *Aeromonas hydrophila* y *F. columnare* afirmando que estas dos especies fueron las responsables de la muerte de peces en un ambiente natural; esto advierte los riesgos que se pueden presentar si la fuente de agua en estudio no se trata antes de su aplicación en la piscicultura.

## Capítulo VI: Conclusiones y recomendaciones

### Conclusiones

- 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 Cianobacteria (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.

## Recomendaciones

- 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.

## Capítulo VII: Bibliografía

- Aram, S. A., Saalidong, B. M., & Lartey, P. O. (2021). Comparative assessment of the relationship between coliform bacteria and water geochemistry in surface and ground water systems. *PLoS ONE*, *16*(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0257715>
- Attramadal, K. J. K., Truong, T. M. H., Bakke, I., Skjermo, J., Olsen, Y., & Vadstein, O. (2014). RAS and microbial maturation as tools for K-selection of microbial communities improve survival in cod larvae. *Aquaculture*, *432*, 483–490. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2014.05.052>
- Austin, B., & Austin, D. (2012a). *Bacterial Fish Pathogens* (5ta ed.). Springer . <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4884-2>
- Austin, B., & Austin, D. (2012b). Bacterial fish pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. In *Environmental Biology of Fishes* (5th ed., Vol. 1, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/BF02984445>
- Baird, R., Eaton, A., & Rice, E. (2017). *Standard methods: For the examination of water and waste water* (L. Bridgewater, Ed.; 23rd ed.). American Public Health Association. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90598-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90598-4)
- Ballard, D., Winkler-Galicki, J., & Wesoly, J. (2020). Massive parallel sequencing in forensics: advantages, issues, technicalities, and prospects. *International Journal of Legal Medicine*, *134*(4), 1291. <https://doi.org/10.1007/S00414-020-02294-0>
- Bartelme, R. P., Smith, M. C., Sepulveda-Villet, O. J., & Newton, R. J. (2019). Component Microenvironments and System Biogeography Structure Microorganism Distributions in Recirculating Aquaculture and Aquaponic Systems. *MSphere*, *4*(4). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00143-19>

Baxevanis, A., Bader, G., & Wishart, D. (2020). *Bioinformatics* (4ta ed.). John Wiley & Sons, Inc.

Benson. (2001). *Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology* (8th ed.). The McGraw-Hill.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852.  
<https://doi.org/10.1038/S41587-019-0209-9>

Brown, A., & Smith, H. (2015). Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology. In A. Brown & H. Smith (Eds.), *Detecting Pathogens in Food*. McGraw-Hill.

Bu, J., Sun, Z., Ma, R., Liu, Y., Gong, X., Pan, Z., & Wei, W. (2020). Shallow Groundwater Quality and Its Controlling Factors in the Su-Xi-Chang Region, Eastern China. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, Vol. 17, Page 1267, 17(4), 1267. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17041267>

Cadavid, I., & Gómez, G. (n.d.). *Protocolo de preparación de muestras para envío a secuenciación*. Macrogen. Retrieved June 2, 2022, from [https://dspace.tdea.edu.co/bitstream/handle/tdea/1478/Protocolo de preparación de muestras para envío a secuenciación.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.tdea.edu.co/bitstream/handle/tdea/1478/Protocolo%20de%20preparaci3n%20de%20muestras%20para%20env3o%20a%20secuenciaci3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/NMETH.3869>



- Cao, S., Geng, Y., Yu, Z., Deng, L., Gan, W., Wang, K., Ou, Y., Chen, D., Huang, X., Zuo, Z., He, M., & Lai, W. (2018). *Acinetobacter lwoffii*, an emerging pathogen for fish in *Schizothorax* genus in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*(6), 1816–1822. <https://doi.org/10.1111/tbed.12957>
- Cao, W., Ren, Y., Dong, Q., Li, Z., & Xiao, S. (2022). Enrichment of High Arsenic Groundwater Controlled by Hydrogeochemical and Physical Processes in the Hetao Basin, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(20). <https://doi.org/10.3390/IJERPH192013489/S1>
- Carrizo, J. A., Rossi, M., Moran-Gilad, J., Van Domselaar, G., & Ramirez, M. (2018). A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians. *Clinical Microbiology and Infection*, *24*(4), 342–349. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2017.12.015>
- Carson, S., Miller, H. B., Witherow, D. S., & Srougi, M. C. (2019). Molecular Biology Techniques: A Classroom Laboratory Manual. In *Molecular Biology Techniques*. Andre Gerhard Wolff. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815774-9.00046-0>
- Chen, S., Blom, J., Loch, T. P., Faisal, M., & Walker, E. D. (2017). The emerging fish pathogen *Flavobacterium spartansii* isolated from Chinook salmon: Comparative genome analysis and molecular manipulation. *Frontiers in Microbiology*, *8*(NOV), 2339. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02339/BIBTEX>
- Chiarello, M., McCauley, M., Villéger, S., & Jackson, C. R. (2022). Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. *PLoS ONE*, *17*(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0264443>
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring.

*Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 32(6), 767.

<https://doi.org/10.1177/1040638720905833>

Curry, E. (2020). *Introduction to Bioinformatics with R: A Practical Guide for Biologist* (1ra ed.). CRC Press.

Dale, J., & Park, S. (2010). Molecular Genetics of Bacteria. In *Applied Neuropsychology* (Quita, Vol. 15, Issue 2). John Wiley & Sons, Ltd.

Danczak, R. E., Johnston, M. D., Kenah, C., Slattery, M., & Wilkins, M. J. (2019). Capability for arsenic mobilization in groundwater is distributed across broad phylogenetic lineages. *PLoS ONE*, 14(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0221694>

Daou, C., Hoz El, M., Kassouf, A., & Legube, B. (2020). Multivariate Monitoring of Surface Water Quality: Physico-Chemical, Microbiological and 3D Fluorescence Characterization. *Water*, 12(6), 1673. <https://doi.org/10.3390/W12061673>

Das, S., & Dash, H. R. (2015). *Microbial Biotechnology-A Laboratory Manual for Bacterial Systems*. Springer New Delhi Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2095-4>

D'Auria, G., Artacho, A., Rojas, R. A., Bautista, J. S., Méndez, R., Gamboa, M. T., Gamboa, J. R., & Gómez-Cruz, R. (2018). Metagenomics of Bacterial Diversity in Villa Luz Caves with Sulfur Water Springs. *Genes*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/GENES9010055>

Dey, A., Bokka, V., & Sen, S. (2020). Dependence of bacterial growth rate on dynamic temperature changes. *IET Systems Biology*, 14(2), 68–74. <https://doi.org/10.1049/IET-SYB.2018.5125>

Dimkić, I., Fira, D., Janakiev, T., Kabić, J., Stupar, M., Nenadić, M., Unković, N., & Grbić, M. L. (2021). The microbiome of bat guano: for what is this knowledge important? *Applied*

*Microbiology and Biotechnology*, 105(4), 1407. <https://doi.org/10.1007/S00253-021-11143-Y>

Djemiel, C., Dequiedt, S., Karimi, B., Cottin, A., Girier, T., el Djoudi, Y., Wincker, P., Lelièvre, M., Mondy, S., Chemidlin Prévost-Bouré, N., Maron, P. A., Ranjard, L., & Terrat, S. (2020). BIOCOM-PIPE: a new user-friendly metabarcoding pipeline for the characterization of microbial diversity from 16S, 18S and 23S rRNA gene amplicons. *BMC Bioinformatics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12859-020-03829-3>

Dubey, S., Ager-Wick, E., Peng, B., Evensen, Ø., Sørum, H., & Munang'andu, H. M. (2022). Characterization of virulence and antimicrobial resistance genes of *Aeromonas media* strain SD/21–15 from marine sediments in comparison with other *Aeromonas* spp. *Frontiers in Microbiology*, 13, 4217. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.1022639/BIBTEX>

Duman, M., Saticioglu, I. B., & Altun, S. (2019). Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of fecal contaminants and spoilage bacteria that emerge in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 38(2), 41. <https://doi.org/10.12938/BMFH.18-007>

Dunlap, C. A., Schisler, D. A., Perry, E. B., Connor, N., Cohan, F. M., & Rooney, A. P. (2017). *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2720–2725. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.002007/CITE/REFWORKS>

Edmunds, W. M., Ahmed, K. M., & Whitehead, P. G. (2015). A review of arsenic and its impacts in groundwater of the Ganges-Brahmaputra-Meghna delta, Bangladesh. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 17(6), 1032–1046. <https://doi.org/10.1039/c4em00673a>

- Escalante, A. E., Barbolla, L. J., Ramírez-Barahona, S., & Eguiarte, L. E. (2014). The study of biodiversity in the era of massive sequencing. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(4), 1249–1264. <https://doi.org/10.7550/RMB.43498>
- Ferreira, V., Magalhães, R., Teixeira, P., Castro, P. M. L., & Calheiros, C. S. C. (2022). Occurrence of Fecal Bacteria and Zoonotic Pathogens in Different Water Bodies: Supporting Water Quality Management. *Water* 2022, Vol. 14, Page 780, 14(5), 780. <https://doi.org/10.3390/W14050780>
- Fono-Tamo, E. U. K., Kamika, I., Dewar, J. B., & Lekota, K. E. (2023). Comparative Genomics Revealed a Potential Threat of *Aeromonas rivipollensis* G87 Strain and Its Antibiotic Resistance. *Antibiotics*, 12(1), 131. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12010131/S1>
- García-López, I., Otero, A., García-López, M. L., & Santos, J. A. (2004). Molecular and phenotypic characterization of nonmotile Gram-negative bacteria associated with spoilage of freshwater fish. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 878–886. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2004.02214.X>
- Goma-Tchimbakala, E. J. C. D., Pietrini, I., Dal Bello, F., Goma-Tchimbakala, J., Lo Russo, S., & Corgnati, S. P. (2022). Great Abilities of *Shinella zoogloeoides* Strain from a Landfarming Soil for Crude Oil Degradation and a Synergy Model for Alginate-Bead-Entrapped Consortium Efficiency. *Microorganisms*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10071361>
- Gutiérrez, H., & de la Vaca, R. (2012). *Análisis y Diseño de Experimentos* (3ra ed.). McGraw-Hill.
- Hamilton, B. M., Harwood, A. D., Wilson, H. R., Keeton, T. P., & Borrello, M. C. (2020). Are anglers exposed to *Escherichia coli* from an agriculturally impacted river? *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(4). <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8168-7>

Hedrich, S., Schlömann, M., & Barrie Johnson, D. (2011). The iron-oxidizing proteobacteria.

*Microbiology*, 157(6), 1551–1564. [https://doi.org/10.1099/MIC.0.045344-](https://doi.org/10.1099/MIC.0.045344-0/CITE/REFWORKS)

0/CITE/REFWORKS

Hezacar. (2019). *PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DE LA*

*PARROQUIAL DE PUÉLLARO*. [https://puellaro.gob.ec/pichincha/wp-](https://puellaro.gob.ec/pichincha/wp-content/uploads/2022/03/PLAN-DE-DESARROLLO-Y-ORDENAMIENTO-TERRITORIAL-PARROQUIA-DE-PUELLARO.pdf)

[content/uploads/2022/03/PLAN-DE-DESARROLLO-Y-ORDENAMIENTO-TERRITORIAL-](https://puellaro.gob.ec/pichincha/wp-content/uploads/2022/03/PLAN-DE-DESARROLLO-Y-ORDENAMIENTO-TERRITORIAL-PARROQUIA-DE-PUELLARO.pdf)

[PARROQUIA-DE-PUELLARO.pdf](https://puellaro.gob.ec/pichincha/wp-content/uploads/2022/03/PLAN-DE-DESARROLLO-Y-ORDENAMIENTO-TERRITORIAL-PARROQUIA-DE-PUELLARO.pdf)

Hofmann, A., & Clokie, S. (2018). *Wilson and Walker's Principles and Techniques of*

*Biochemistry and Molecular Biology* (Octava). Cambridge University Press.

<https://doi.org/10.1017/9781316677056>

Hong, P. Y., Mantilla-Calderon, D., & Wang, C. (2020). Metagenomics as a Tool To Monitor

Reclaimed-Water Quality. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(16), 1–15.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00724-20>

Hudson, J., & Egan, S. (2022). Opportunistic diseases in marine eukaryotes: Could

Bacteroidota be the next threat to ocean life? *Environmental Microbiology*, 24(10), 4505.

<https://doi.org/10.1111/1462-2920.16094>

INEN. (2020, April). *Agua Para Consumo Humano NTE INEN 1108*. Norma Técnica

Ecuatoriana. <https://inencloud.normalizacion.gob.ec/nextcloud/s/SqkiE7MZ2Kp7xBY>

Izard, J., & Rivera, M. (2015). *Metagenomics for Microbiology* (1st ed.). Elsevier.

James, G., Prasanna Geetha, P., Thavarool Puthiyedathu, S., & Vattringal Jayadradhan, R. K.

(2023). Applications of Actinobacteria in aquaculture: prospects and challenges. *3 Biotech*,

13(2), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S13205-023-03465-7/METRICS>

- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/JAM.13468>
- Jünemann, S., Kleinbölting, N., Jaenicke, S., Henke, C., Hassa, J., Nelkner, J., Stolze, Y., Albaum, S. P., Schlüter, A., Goesmann, A., Sczyrba, A., & Stoye, J. (2017). Bioinformatics for NGS-based metagenomics and the application to biogas research. *Journal of Biotechnology*, 261, 10–23. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2017.08.012>
- Karki, P., Mohiuddin, S. G., Kavousi, P., & Orman, M. A. (2020). Investigating the effects of osmolytes and environmental pH on bacterial persisters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(5). [https://doi.org/10.1128/AAC.02393-19/SUPPL\\_FILE/AAC.02393-19-S0001.PDF](https://doi.org/10.1128/AAC.02393-19/SUPPL_FILE/AAC.02393-19-S0001.PDF)
- Khandelwal, A., Sugavanam, R., Ramakrishnan, B., Dutta, A., Varghese, E., Nain, L., Banerjee, T., & Singh, N. (2022). Free and Immobilized Microbial Culture–Mediated Crude Oil Degradation and Microbial Diversity Changes Through Taxonomic and Functional Markers in a Sandy Loam Soil. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 675. <https://doi.org/10.3389/FENVS.2021.794303/BIBTEX>
- Konan, K. H., Kouame, I. K., Dao, A., Noufe, D., Koffi, J. T. K., & Kamagate, B. (2020). Analysis of the qualitative evolution of groundwater in the Abouabou area in the Port-Bouët municipality (Abidjan, Côte d'Ivoire). *Heliyon*, 6(10), e05268. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E05268>
- Koskey, A. M., Fisher, J. C., Eren, A. M., Ponce-Terashima, R., Reis, M. G., Blanton, R. E., & Mclellan, S. L. (2014). Blautia and Prevotella sequences distinguish human and animal fecal pollution in Brazil surface waters. *Environmental Microbiology Reports*, 6(6), 696. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12189>

- Kumar, N., Chandan, N. K., Bhushan, S., Singh, D. K., & Kumar, S. (2023). Health risk assessment and metal contamination in fish, water and soil sediments in the East Kolkata Wetlands, India, Ramsar site. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1–18.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-28801-y>
- Kuncham, R., Sivaprakasam, T., Puneeth Kumar, R., Sreenath, P., Nayak, R., Thayumanavan, T., & Subba Reddy, G. V. (2017). Bacterial fauna associating with chironomid larvae from lakes of Bengaluru city, India - A 16s rRNA gene based identification. *Genomics Data*, 12, 44–48. <https://doi.org/10.1016/J.GDATA.2017.03.001>
- Latif-Eugenín, F., Beaz-Hidalgo, R., & 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(3), 883–891. <https://doi.org/10.1111/JAM.13210>
- Liao, J., Weller, D. L., Kovac, J., & Huang, Y. (2022). Editorial: Functional Diversity of Aquatic Microorganisms and Their Roles in Water Quality. *Frontiers in Water*, 4, 41.  
<https://doi.org/10.3389/FRWA.2022.879155>
- Luca, J. (2019). *Placa de recuento rápido de coliformes/E. coli Recuento de E. coli = 0 Recuento total de coliformes = 0*. 3M Petrifilm.  
<https://multimedia.3m.com/mws/media/1716403O/gua-de-interpretacin-3m-petrifilm-rapido-de-e-coli-coliforme.pdf>
- Lutterodt, G., Miyittah, M. K., Addy, B., Ansa, E. D. O., & Takase, M. (2021). Groundwater pollution assessment in a coastal aquifer in Cape Coast, Ghana. *Heliyon*, 7(4), e06751.  
<https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2021.E06751>
- Mahmoud, M. A. A., & Magdy, M. (2021). Metabarcoding profiling of microbial diversity associated with trout fish farming. *Scientific Reports*, 11(1), 421.  
<https://doi.org/10.1038/S41598-020-80236-X>

- Mayorga, P. (n.d.). *Arsénico en aguas subterranas su transferencia al suelo y a la planta* [Universidad de Valladolid]. Retrieved February 11, 2023, from <https://digital.csic.es/bitstream/10261/81461/1/Arsenico%20en%20aguas%20subterranas.pdf>
- McCombie, W. R., McPherson, J. D., & Mardis, E. R. (2019). Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(11). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A036798>
- McLaren, M. R. (2020). *Silva SSU taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva version 138)*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.3731176>
- Microbiologie Clinique. (n.d.). *Caldo nutritivo | Composición | Preparación | Interpretación*. Técnica Microbiológica . Retrieved May 9, 2022, from <https://microbiologie-clinique.com/nutrient-broth.html>
- Microbiologie Clinique. (2022). *Agar tríptico de soja TSA | Principio | Preparación | Interpretación*. <https://microbiologie-clinique.com/trypticase-soy-agar-principle-interpretation.html>
- Mijic, Z., Dayioglu, A. Y., Hatipoglu, M., & Aydilek, A. H. (2020). Hydraulic and environmental impacts of using recycled asphalt pavement on highway shoulders. *Construction and Building Materials*, 234. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.117226>
- Ministerio del Ambiente. (2015, November 4). *LIBRO VI DEL TEXTO UNIFICADO DE LEGISLACION SECUNDARIA DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE: NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTES AL RECURSO AGUA*. Registro Oficial . [https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-09/Documento\\_Registro-Oficial-No-387-04-noviembre-2015\\_0.pdf](https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-09/Documento_Registro-Oficial-No-387-04-noviembre-2015_0.pdf)



- Moposita, F. (2017). *Identificación de Bacterias, Microalgas y Hongos termófilos de la Fuerte Geotermal "Chachimbiro" Mediante técnicas Microbiológicas y Moleculares*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Naranjo, Y. (2017). *Identificación de Bacterias, Hongos y Algas Mesófilos y Termófilos de las Fuertes Geotermales: El Riñón-Provincia de Azuay y Guapán-Provincia del Cañar*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Nicholl, D. (2008). *An Introduction to Genetic Engineering* (Tercera). Cambridge University Press.
- OECD. (2003). *Assessing Microbial Safety of Drinking Water*. IWA Publishing.
- Pallen, M. J. (2016). Microbial bioinformatics 2020. *Microbial Biotechnology*, 9(5), 681.  
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12389>
- Pękala-Safińska, A. (2018). Contemporary Threats of Bacterial Infections in Freshwater Fish. *Journal of Veterinary Research*, 62(3), 261. <https://doi.org/10.2478/JVETRES-2018-0037>
- Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). Escherichia coli. In *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks: Second Edition* (pp. 89–117). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8>
- Podgorski, J., & Berg, M. (2020). Global threat of arsenic in groundwater. *Science*, 368(6493), 845–850.  
[https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABA1510/SUPPL\\_FILE/ABA1510\\_PODGORSKI\\_SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABA1510/SUPPL_FILE/ABA1510_PODGORSKI_SM.PDF)
- Rahman, A., & Rahaman, H. (2018). Contamination of arsenic, manganese, and coliform bacteria in groundwater at Kushtia District, Bangladesh: human health vulnerabilities. *Journal of Water and Health*, 16(5), 782–795. <https://doi.org/10.2166/WH.2018.057>

- Rahman, Z. ur, Ahmad, S., Fidel, R., Khalid, S., Ahmad, I., Humphrey, O. S., Khan, H., & Khan, B. (2021). Faecal and nitrate contamination in the groundwater of Mardan district, Pakistan. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(9), 3615–3624.  
<https://doi.org/10.1007/s10653-021-00848-8>
- Rieder, J., Kapopoulou, A., Bank, C., & Adrian-Kalchhauser, I. (2023). Metagenomics and metabarcoding experimental choices and their impact on microbial community characterization in freshwater recirculating aquaculture systems. *Environmental Microbiome*, 18(1), 8. <https://doi.org/10.1186/S40793-023-00459-Z>
- Romero, P. E., Calla-Quispe, E., Castillo-Vilcahuaman, C., Yokoo, M., Fuentes-Rivera, H. L., Ramirez, J. L., Ampuero, A., Ibáñez, A. J., & Wong, P. (2021). From the Andes to the desert: 16S rRNA metabarcoding characterization of aquatic bacterial communities in the Rimac river, the main source of water for Lima, Peru. *PLoS ONE*, 16(4).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0250401>
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Gómez, A. M., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). DNA Next-Generation Sequencing (NGS): Present and Future in Clinical Practice. *Universitas Médica*, 61(2). <https://doi.org/10.11144/JAVERIANA.UMED61-2.SNGS>
- Salas-Leiva, J., Mazón-Suástegui, J. M., Teles, A., & Tovar-Ramírez, D. (2020). Structure and predictive metabolic contribution of intestinal microbiota of Longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) juveniles in aquaculture systems. *Molecular Biology Reports*, 47(12), 9627–9636.  
<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05970-x>
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning\_ A Laboratory* (Tercera). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, J. (2022). Clase 19 Metagenómica I . Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental . <https://www.youtube.com/watch?v=7CeIDGYr5C0>

- Schriewer, A., Miller, W. A., Byrne, B. A., Miller, M. A., Oates, S., Conrad, P. A., Hardin, D., Yang, H. H., Chouicha, N., Melli, A., Jessup, D., Dominik, C., & Wuertz, S. (2010). Presence of Bacteroidales as a Predictor of Pathogens in Surface Waters of the Central California Coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17), 5802.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00635-10>
- Scott, A. D., & Baum, D. A. (2016). Phylogenetic Tree. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, 3, 270–276. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00203-1>
- Scott, S. J., & Bollinger, T. K. (2014). *Flavobacterium columnare*: an important contributing factor to fish die-offs in southern lakes of Saskatchewan, Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(6), 832–836.  
[https://doi.org/10.1177/1040638714553591/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\\_1040638714553591-FIG2.JPEG](https://doi.org/10.1177/1040638714553591/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1040638714553591-FIG2.JPEG)
- Servicio Ecuatoriano de Normalización. (2019). *Reseña Histórica – Servicio Ecuatoriano de Normalización INEN*. Gobierno de Ecuador . <https://www.normalizacion.gob.ec/resena-historica/>
- Sigee, D. (2005). *Freshwater Microbiology* (1st ed., Vol. 1, Issue 69). John Wiley & Sons, Ltd.
- Smith, A. D., & de Sena Brandine, G. (2019). Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. *F1000Research*, 8.  
<https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.21142.2>
- Spreadbury, C. J., Clavier, K. A., Lin, A. M., & Townsend, T. G. (2021). A critical analysis of leaching and environmental risk assessment for reclaimed asphalt pavement management. *Science of The Total Environment*, 775, 145741.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.145741>

- Straub, D., Blackwell, N., Langarica-Fuentes, A., Peltzer, A., Nahnsen, S., & Kleindienst, S. (2020). Interpretations of Environmental Microbial Community Studies Are Biased by the Selected 16S rRNA (Gene) Amplicon Sequencing Pipeline. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.550420/FULL>
- Talagrand-Reboul, E., Roger, F., Kimper, J. L., Colston, S. M., Graf, J., Latif-Eugenín, F., Figueras, M. J., Petit, F., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., & Lamy, B. (2017). Delineation of taxonomic species within complex of species: *Aeromonas media* and related species as a test case. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 621. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00621/BIBTEX>
- Taniguchi, A., Eguchi, M., & Eguchi, M. (2020). Community structure of actively growing bacteria in a coastal fish-farming area. *PLoS ONE*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0235336>
- ThermoScientific. (2016). *Thermo Scientific Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)* . DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) Composition. [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012704\\_DreamTaq\\_Green\\_PCR\\_MasterMix\\_K1081\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012704_DreamTaq_Green_PCR_MasterMix_K1081_UG.pdf)
- Vidal, V., Olvera, M., Morales, V., Cuéllar, J., Riofrío, A., Morales, R., Barato, P., Chávez, C., García, O., & Montoya, L. (2017). *Manual de Buenas Prácticas de Manejo para la Piscicultura en Agua Dulce* (Primera, Vol. 1). OIRSA-OSPESCA.
- Wang, Q., Zhou, X., Liu, Y., Ding, Q., Wu, Z., Deng, J., Zuo, J., Yuan, L., Shao, P., Cheng, B., & Gao, L. (2022). Bacterial Community and Antibiotic Resistance Gene Profiles of Fish Gut Contents and Their Aquaculture Environment in Tianjin, China. *Aquaculture Journal*, 2(4), 269–284. <https://doi.org/10.3390/AQUACJ2040016>

- Wang, X. (2016). *Next-Generation Sequencing Data Analysis* (1ra ed.). Taylor & Francis Group, LLC.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA Fingerprinting in Plants Principles, Methods, and Applications* (Second). Taylor & Francis Group.
- Weyenberg, G., & Yoshida, R. (2016). Phylogenetic Tree Distances. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, 3, 285–290. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00218-3>
- Willey, J., Sandman, K., & Wood, D. (2020). *Prescott 's Microbiology* (11th ed.). McGraw-Hill.
- Wongsasuluk, P., Chotpantarat, S., Siriwong, W., & Robson, M. (2014). Heavy metal contamination and human health risk assessment in drinking water from shallow groundwater wells in an agricultural area in Ubon Ratchathani province, Thailand. *Environmental Geochemistry and Health*, 36(1), 169–182. <https://doi.org/10.1007/s10653-013-9537-8>
- Woo, P., & Bruno, D. (2011). *Fish Diseases and Disorders* (2da ed.). MPG Books Group.
- Wu, T., Zhai, C., Zhang, J., Zhu, D., Zhao, K., & Chen, Y. (2019). Study on the Attachment of *Escherichia coli* to Sediment Particles at a Single-Cell Level: The Effect of Particle Size. *Water* 2019, Vol. 11, Page 819, 11(4), 819. <https://doi.org/10.3390/W11040819>
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P. Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12859-016-0992-Y/FIGURES/5>
- Yang, Q., Yin, H., He, X., Chen, F., Ali, A., Mehta, Y., & Yan, B. (2020). Environmental impacts of reclaimed asphalt pavement on leaching of metals into groundwater. *Transportation Research Part D: Transport and Environment*, 85, 102415. <https://doi.org/10.1016/J.TRD.2020.102415>

Yoshinaga, Y., Daum, C., He, G., & Malley, R. O. (2018). Genome Sequencing. *Methods in Molecular Biology*, 1775, 37–52. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7804-5>

Zhang, Y., Kelly, W. R., Panno, S. V., & Liu, W. T. (2014). Tracing fecal pollution sources in karst groundwater by Bacteroidales genetic biomarkers, bacterial indicators, and environmental variables. *Science of the Total Environment*, 490, 1082–1090. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.086>

## Apéndices