



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

UNIDAD DE POSGRADO

MAESTRÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL

Proyecto de Investigación previa la
obtención del Grado Académico de
Magíster en Gestión Ambiental.

TEMA

**DIVERSIDAD BACTERIANA EN LAS AGUAS RESIDUALES
DOMÉSTICAS DE CALCETA Y SU RELACIÓN EN LA CALIDAD
DEL AGUA DEL RIO CARRIZAL. AÑO 2018**

AUTORA

ING. VERA VERA BEATRIZ ROCÍO

DIRECTOR

ING. JAIME MORANTE CARRIEL, Ph.D

QUEVEDO – ECUADOR

2019



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

UNIDAD DE POSGRADO

MAESTRÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL

Proyecto de Investigación previa la
obtención del Grado Académico de
Magíster en Gestión Ambiental.

TEMA

**DIVERSIDAD BACTERIANA EN LAS AGUAS RESIDUALES
DOMÉSTICAS DE CALCETA Y SU RELACIÓN EN LA CALIDAD
DEL AGUA DEL RIO CARRIZAL. AÑO 2018**

AUTORA

ING. BEATRIZ ROCÍO VERA VERA

DIRECTOR

ING. JAIME MORANTE CARRIEL, Ph.D

QUEVEDO – ECUADOR

2019

CERTIFICACIÓN

Dr. Jaime Morante Carriel, Docente de Posgrado y Director de Proyecto de Investigación
CERTIFICA:

Que el proyecto **DIVERSIDAD BACTERIANA EN LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS DE CALCETA Y SU RELACIÓN EN LA CALIDAD DEL AGUA DEL RIO CARRIZAL. AÑO 2018**, de la autoría de la Ing. BEATRIZ ROCÍO VERA VERA, ha sido revisado en todos sus componentes, el mismo que está apto para la presentación y sustentación formal ante el tribunal respectivo, como requisito previo a la obtención del Grado Académico de Magíster en Gestión Ambiental

Quevedo, Febrero 12 de 2019

_____:

Ing. Jaime Morante Carriel, Ph.D.

DIRECTOR

AUTORÍA

Yo, ING. BEATRIZ ROCIO VERA VERA, autora del presente proyecto de investigación denominado **“DIVERSIDAD BACTERIANA EN LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICA DE CALCETA Y SU RELACIÓN EN LA CALIDAD DEL AGUA DEL RIO CARRIZAL. AÑO 2018”**, declaro que los datos contenidos en el mismo, son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Quevedo, Febrero 12 de 2019

Ing. Beatriz Rocío Vera Vera

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por constituirse en la institución de educación superior que me permitió reforzar mis conocimientos profesionales a través de los estudios de cuarto nivel.

A mis padres por haberme apoyado en todo momento, por sus valiosos consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien.

A mis hermanos por ser mi inspiración para seguir luchando por una vida mejor.

A mi esposo Leonel Zambrano por ser ese motor que impulsa mi vida hacia la superación personal y profesional.

AGRADECIMIENTO

A Dios por protegerme en cada momento de mi vida y darme las fuerzas y valor para vencer todo obstáculo que se presentó durante mí caminar y gracias por permitirme culminar una etapa más de mi vida.

A mis padres por sus ejemplos de perseverancia y constancia que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A la familia Zambrano Mejía, en especial a mi esposo Leonel Zambrano Mejía por ser mi apoyo incondicional en el desarrollo y ejecución de este trabajo, por darme fuerzas y aliento en momentos de dificultad, por su amor y comprensión.

A la familia Vera Llor en especial a mi tío René que como su primer nombre lo indica ha sido un Ángel en mi vida y que junto a su amada Estrella siempre están cuando mi corazón los llama.

A la familia Piguave Rendón por abrirme las puertas de su casa, por el apoyo ofrecido durante el periodo de estudios presenciales y por hacerme sentir como de su familia, siempre agradeceré tal gesto de bondad.

Al Eco. Carlos Zambrano, PhD, Coordinador de la Maestría en Gestión Ambiental por el apoyo brindado y por su amabilidad.

A mi tutor Ing. Jaime Morante Carriel, PhD, por su asesoría y apoyo en el desarrollo de este trabajo de titulación.

A la Blga. María Fernanda Pincay Cantos, por su orientación en el análisis de la información.

Al Blgo. Francisco, por su valioso apoyo y asesoría necesaria para culminar este trabajo de investigación.

PRÓLOGO

A mediados de los años 80 los microbiólogos comenzaron a cambiar los conceptos de la microbiología clásica, proponiendo la necesidad de disponer de técnicas no tradicionales para entender el mundo microbiano. Entre los métodos diseñados para acceder al conocimiento de la fisiología y genética de organismos no cultivables, la metagenómica se ha convertido en una poderosa herramienta de estudio. Se refiere al análisis funcional y de secuencia independiente de cultivo de toda la colección de genomas microbianos presentes en diferentes nichos o comunidades ambientales, plantas, animales o suelos. Esta nueva herramienta nos permiten una mejor comprensión de la diversidad taxonómica microbiana de una comunidad así como establecer su función con el fin de responder a las siguientes preguntas “¿quiénes están allí?” y “¿qué están haciendo?”

Los mayores descubrimientos alcanzados con esta tecnología ha permitido avanzar en el conocimiento de la microbiología ambiental sentando las bases ecológicas, fisiológicas, bioquímicas y genómicas para una variedad de procesos microbiológicos que participan en los ciclos biogeoquímicos, incluyendo la oxidación anaeróbica del metano, la fotosíntesis, absorción de fósforo, biodegradación de contaminantes orgánicos y numerosos aspectos de los ciclos del nitrógeno y azufre.

Es así, que en este proyecto de investigación se describen los avances recientes alcanzados con la aplicación de la metagenómica en el conocimiento de la diversidad bacteriana de las aguas residuales domésticas de Calceta y su relación la calidad del agua del río Carrizal, en el año 2018.

Dr. Fabricio Canchignia Martínez

RESUMEN

La investigación “Diversidad bacteriana en las aguas residuales doméstica de Calceta y su relación en la calidad del agua del río Carrizal. AÑO 2018”, tuvo como objetivo general, evaluar la relación entre la diversidad bacteriana presente en las aguas residuales domésticas de la ciudad de Calceta y su relación en la calidad del agua del río Carrizal, para esto se tomaron muestras en cuatro puntos claves: el afluente, efluente y dos muestras en el cuerpo hídrico donde desembocan las aguas tratadas. Para el análisis se utilizaron herramientas moleculares como la extracción de ADN, PCR y metagenómica, la sensibilidad de estas técnicas permitió la amplificación de fragmentos del gen 16S rDNA a partir del producto de PCR amplificado. Estas muestras fueron secuenciadas, siendo la secuenciación una alternativa que proporciona información sobre la identidad de la población microbiana, logrando caracterizar la estructura de un ambiente, el empleo de estas técnicas a su vez permitió determinar la calidad del agua de río Carrizal, este análisis involucró además de los microorganismos secuenciados a través del análisis metagenómico, indicadores como DBO, coliformes fecales y totales.

Palabras claves: Diversidad bacteriana, aguas residuales doméstica, metagenómica, calidad del agua.

ABSTRACT

The research "Bacterial diversity in the domestic wastewater of Calceta and the water quality of the Carrizal river. YEAR 2018 ", had as a general objective, to evaluate the relationship between the bacterial diversity present in the domestic wastewater of the city of Calceta and the water quality of the Carrizal River, for this, samples were taken at four key points: the tributary, effluent and two samples in the water body where the treated water flows. Molecular tools such as DNA extraction, PCR and metagenomics were used for the analysis. The sensitivity of these techniques allowed the amplification of 16S rDNA gene fragments from the amplified PCR product. These samples were sequenced, the sequencing being an alternative that provides information on the identity of the microbial population, managing to characterize the structure of an environment, the use of these techniques in turn allowed to determine the water quality of the Carrizal river, this analysis involved In addition to the microorganisms sequenced through metagenomic analysis, indicators such as BOD, fecal and total coliforms.

Key words: Bacterial diversity, domestic wastewater, metagenomics, water quality

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
PORTADA.....	i
HOJA EN BLANCO.....	ii
COPIA DE LA PORTADA.....	iii
CERTIFICACIÓN.....	iv
DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
PROLOGO.....	viii
RESUMEN EJECUTIVO.....	ix
ABSTRACT.....	x
ÍNDICE.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	xiv
CAPITULO I. MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
1.1. UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA.....	2
1.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA.....	2
1.3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.3.1. Problema General.....	3
1.3.2. Problemas Derivados.....	3
1.4. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.5. OBJETIVOS.....	4
1.5.1. General.....	4
1.5.2. Específicos.....	4
1.6. JUSTIFICACIÓN.....	4
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
2.1.1. Agua residual.....	7
2.1.2. Aguas residuales domésticas.....	7

2.1.3. Diversidad bacteriana	7
2.1.4. Características de las aguas residuales domésticas.....	8
2.1.5. ADN.....	9
2.1.5.1. Extracción y purificación de ADN	9
2.1.5.2 PowerSoil DNA Extraction kit MOBIO.....	10
2.1.5.3 GEN ADNr 16S.....	10
2.1.6. Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR).....	11
2.1.7. Metagenómica	11
2.2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	11
2.2.1. Técnicas de secuenciación de metagenómica.....	11
2.2.2. Ingeniería Genética y Metagenómica: una perspectiva para la biorremediación de aguas residuales.	12
2.3. FUNDAMENTACIÓN LEGAL	13
2.3.1 Derecho al agua.	13
2.3.2 Biodiversidad y recursos naturales.	13
2.3.3 Agenda Nacional de Investigación sobre la Biodiversidad 2018.	14
CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	15
3.1. Tipo de investigación.....	15
3.4. Instrumento de investigación.....	16
3.5. Procesamiento y análisis de la información	17
3.5.1. Determinación de la diversidad bacteriana en las aguas residuales domésticas de la ciudad de Calceta.....	17
3.5.2. Análisis de la calidad del agua del río carrizal.	19
3.5.3. Relación entre la diversidad bacteriana y la calidad del agua del río Carrizal ..	21
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 DIVERSIDAD BACTERIANA EN LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS DE LA CIUDAD DE CALCETA.....	23

4.2	ANÁLISIS DE LA CALIDAD DEL AGUA DEL RIO CARRIZAL.	26
4.2.1.	Análisis microbiológico.....	26
4.2.1.	Análisis químico.....	26
4.3	RELACIÓN ENTRE LA DIVERSIDAD BACTERIANA Y LA CALIDAD DEL AGUA DEL RÍO CARRIZAL	29
4.4	DISCUSIÓN.....	32
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		35
5.1	CONCLUSIONES.....	36
5.2	RECOMENDACIONES	37
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....		38
ANEXOS.....		43

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	UBICACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO.....	2
FIGURA 2.	DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL DE METAGENOMA.....	11
FIGURA 3	POWER BEAD TUBES DEL KIT MOBIO POWERSOIL, USADOS.....	17
FIGURA 4	RESULTADOS DE LA AMPLIFICACIÓN.....	18
FIGURA 5.	SECUENCIADOR “ION TORRENT™ PERSONAL GENOME.....	19
FIGURA 6.	MAPA DE GEORREFERENCIACIÓN	20
FIGURA 7	ANÁLISIS DE LA ABUNDANCIA DE ESPECIES.....	23
FIGURA 8	ESPECIES CON ABUNDANCIA RELATIVA.....	24
FIGURA 9	CURVAS DE RAREFACCIONES	25
FIGURA 10.	ANÁLISIS DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES	26
FIGURA 11	ANÁLISIS QUIMICO: PARÁMETROS DBO5 Y DQO.....	27
FIGURA 12.	ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO Y ABUNDANCIA	28
FIGURA 13	ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA POBLACION BACTERIAN.....	30

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el desarrollo de la población ha provocado que los niveles de contaminación asciendan, como por ejemplo la generación de desechos, emisiones atmosféricas y descargas de aguas residuales sin tratar a cuerpos hídricos siendo este un problema muy importante a tratar, dicha contaminación se debe a los deficientes tratamientos que se les da al agua, donde la carga contaminante del agua residual doméstica está representada por altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos patógenos de origen fecal, estos microorganismos pueden causar enfermedades de bajo riesgo como gastroenteritis y hasta fatales como hepatitis, disentería, diarrea (Arcos, *et al.*, 2015). El 80% de las aguas residuales en el mundo carecen de un adecuado tratamiento (ONU, 2015), las cuales son descargadas directamente en aguas superficiales generando un gran riesgo, siendo los países en desarrollo los más afectados por esta situación (Cárdenas, 2012)

En Ecuador, solo el 12% de las aguas que se emplean en el consumo humano recibe un tratamiento adecuado previo a su descarga en ríos y quebradas, de acuerdo con la Secretaría Nacional del Agua (La Hora, 2016)

El Cantón Bolívar, cuenta con una estación depuradora en la ciudad de Calceta compuesta por un proceso de pre tratamiento constituido por un biorreactor anaerobio, seguido por un sistema de lagunaje, con una laguna anaerobia y dos de maduración, las cuales se encargan de dar tratamiento al agua residual doméstica, sin embargo se estima que el tratamiento que se realiza no es eficiente, dada esta problemática se planteó identificar metagenómicamente la población bacteriana presente en estas aguas residuales domésticas con el objetivo de evaluar su incidencia en el tratamiento de las mismas y en la calidad del agua del cuerpo hídrico receptor.

El enfoque metagenómico se ha aplicado previamente para investigar la diversidad y abundancia de genes asociados con el metabolismo del Nitrógeno, Azufre, Carbono y Fósforo, en cuerpos de agua como la columna vertical de agua en el Regiones Subtropical del Pacífico Norte (DeLong *et al.*, 2006), el Océano Pacífico central (Hewson *et al.*, 2009), la Corriente de California (Allen *et al.*, 2012), el Mar Muerto (Bodaker *et al.*, 2010), las salmueras mediterráneas de aguas profundas (Smedile *et al.*, 2013) y el suroeste del Océano Atlántico (Junior *et al.*, 2015). Sin embargo, hasta ahora, la falta general de información

genómica en el Océano Subártico Occidental (PSA) ha obstaculizado nuestra comprensión de la adaptación de los microbios al entorno subártico con temperaturas cercanas a la congelación y la geografía acuática de todo el mundo.

En este contexto, y al no manejar adecuadamente las lagunas, estas pueden presentar problemas de eficiencia en su operación y control convirtiéndose en una fuente potencial de desarrollo de vectores, enfermedades, el efluente de estas lagunas contienen una alta concentración de DBO que se lo puede considerar el indicador de contaminación más usado y aplicable a aguas residuales en nuestro país, siendo necesario implementar estudios metagenómicos que permitan evaluar, analizar y caracterizar la diversidad de microbiana presentes en aguas residuales doméstica de Calceta y su efecto en el Rio Carrizal.

La investigación se encuentra segmentada por capítulos, siendo los siguientes:

En el primer capítulo, se detalla el marco contextual de la investigación, consta la problemática, antecedentes de la investigación sobre diversidad bacteriana en depuradora de aguas residuales doméstica de Calceta.

En el segundo capítulo el marco teórico de la investigación consta de dos partes: marco conceptual donde se enlista las principales definiciones referentes al tema de investigación; en el marco teórico se encuentra las teorías sobre aguas residuales domésticas, análisis metagenómico e indicadores de calidad del agua.

En el Capítulo III, se describe la metodología de la investigación, con los tipos de investigación, métodos, así como las fuentes y herramientas para la recopilación de información pertinente.

En el capítulo IV, se detallan los resultados de la investigación, debidamente soportada por la discusión de los resultados en función de información bibliográfica relevante

El capítulo V, se detallan las conclusiones del trabajo de investigación y se plantean algunas recomendaciones en función de la los resultados y las metodologías desarrolladas en la investigación

CAPÍTULO I.
MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA

La presente investigación se realizó en la estación depuradora de aguas residuales domésticas de la ciudad Calceta, Cantón Bolívar y en el área de influencia de la depuradora.

La estación depuradora de aguas residuales domésticas, está ubicada en el área periurbana cuyo perímetro se encuentra en el sector El Morro de la parroquia Calceta, a su alrededor se encuentran las ciudadelas Divino Niño y Santa Martha. La depuradora cuenta con un reactor anaerobio y tres piscinas de oxidación, una anaerobia y dos de maduración esta última dividida en dos secciones.

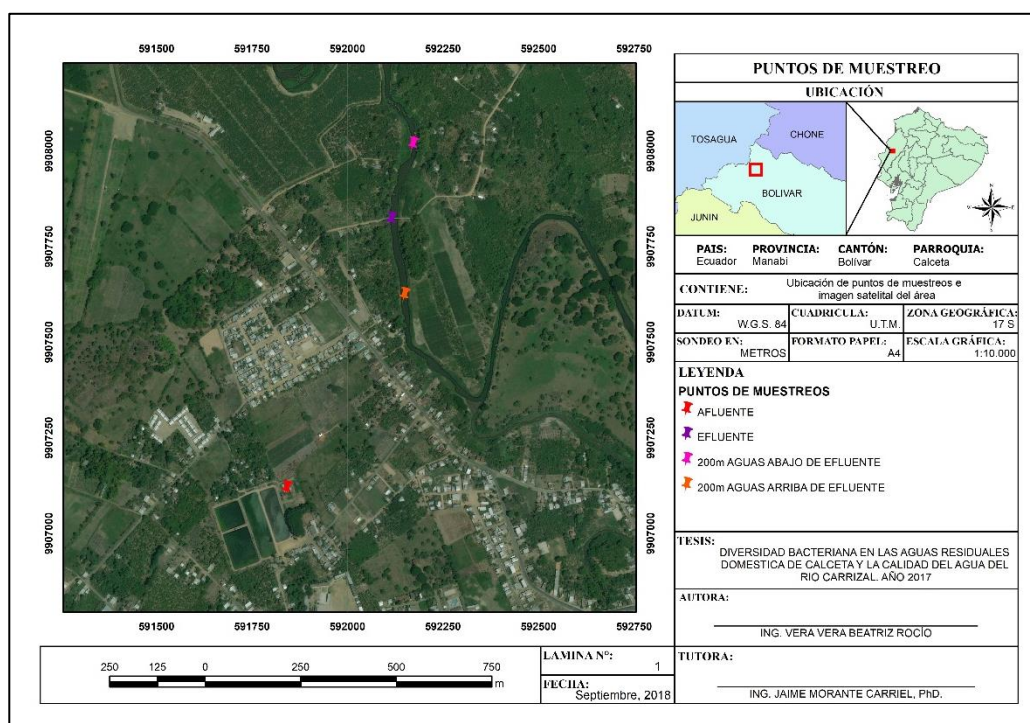


Figura 1. Ubicación de los puntos de muestreo. Elaborado por: Vera, 2018

1.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA

El Cantón Bolívar, cuenta con una estación depuradora en la ciudad de Calceta compuesta por un proceso de pre tratamiento constituido por un biorreactor anaerobio, seguido por un sistema que incluye una laguna anaerobia y dos de maduración, las cuales se encargan de dar tratamiento al agua residual doméstica, esta presenta problemas debido a que tiene un sistema de depuración deficiente generando problemas de contaminación (Montesdeoca,

2013), como es el caso de la generación de malos olores que afecta a los pobladores que tienen sus viviendas en el sector de la estación depuradora.

Por lo tanto es indispensable conocer la diversidad bacteriana existente no solo en las lagunas, sino también en el cuerpo receptor (río Carrizal) de modo que se permita ponderar la calidad del agua y con ello determinar la relación entre estos dos factores. Gandarillas *et al.*, (2017) establece que el correcto uso de tratamientos biológicos de en la depuración de aguas residuales es muy viable ya que dichos métodos son muy eficientes, y se pueden obtener buenos resultados en poco tiempo. Sin embargo, el seguir utilizando este tipo de sistemas de depuración con una deficiente gestión ambiental pondría poner en riesgo la salud humana y del ecosistema.

1.3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.3.1. Problema General

¿Cómo se relaciona la diversidad bacteriana de las aguas residuales domésticas de la ciudad de Calceta con la calidad del agua del río Carrizal?

1.3.2. Problemas Derivados

¿Cómo está caracterizada la diversidad bacteriana de las aguas residuales domésticas de la ciudad de Calceta?

¿Cuál es la ponderación que recibe la calidad del agua del río Carrizal?

¿Cuál es la relación entre los microorganismos y la calidad del agua del río Carrizal?

1.4. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

El estudio se centró en caracterizar la diversidad bacteriana en las aguas residuales domésticas de la ciudad de Calceta, lo que permitió en primer instancia determinar la eficiencia de las lagunas en disminución de microorganismos patógenos y al evaluar también la calidad del agua del río Carrizal, se pudo analizar si la descarga de las aguas residuales

constituye o no una amenaza para el ecosistema acuático y para la salud de la población aledaña al lugar en estudio.

Campo: Gestión ambiental

Área: Ambiental

Línea de investigación: Evaluación de la calidad del agua, aire y suelo, incluyendo las alternativas de mitigación a los impactos ambientales.

Aspecto: Diversidad bacteriana en aguas residuales

Tiempo: Septiembre 2017 – Agosto 2018

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. General

Evaluar la relación entre la diversidad bacteriana de las aguas residuales domésticas de la ciudad de Calceta y su relación en la calidad del agua del río Carrizal

1.5.2. Específicos

Determinar la diversidad bacteriana en las aguas residuales domésticas de la ciudad de Calceta

Analizar la calidad del recurso agua del río Carrizal en relación a los límites permisibles.

Establecer la relación entre los microorganismos y la calidad del agua del río Carrizal

1.6. JUSTIFICACIÓN

La metagenómica es un campo nuevo en el que se persigue obtener secuencias del genoma de los diferentes microorganismos, en este caso bacterias que componen una comunidad, extrayendo y analizando su ADN de forma global. La posibilidad de secuenciar directamente los genomas de microbios, sin necesidad de cultivarlos abre nuevas posibilidades que suponen un cambio de rumbo en la este tipo de estudios. Este hecho es

una revolución científica debido a su alto rendimiento y el bajo coste. Permite acceder al genoma sin ver a los microorganismos ni cultivarlos (Ramírez, 2013).

El objetivo de investigar la diversidad bacteriana en las aguas residuales domésticas, mediante un análisis metagenómico es generar información sobre la población bacteriana presente en ellas y la relación entre los microorganismos presentes con el ambiente, específicamente con la calidad del agua del río Carrizal. Este análisis permitirá también el acceso a la reserva genética de los microorganismos todavía no cultivados comparándolos con información de bases de datos a nivel mundial. La generación de información sobre los microorganismos existentes, sienta las bases para seguir realizando estudios utilizando el patrimonio genético encontrado y determinar la relevancia ecológica de estos grupos de poblaciones bacterianas e indagar sobre las capacidades o mecanismos que poseen estos microorganismos para dar soluciones a problemas ambientales a través de ensayos de biorremediación.

CAPÍTULO II.
MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. FUNDAMENTACIÓN CONCEPTUAL

2.1.1. Agua residual

Según Díaz *et al.*, (2012) las aguas residuales son productos de las acciones y efectos en las que el hombre introduce materias contaminantes de modo directo o indirecto, implica alteraciones perjudiciales de su calidad con relación a los usos posteriores o con su función ecológica. A su vez Mass y Medrano (2015) las definen como aguas provenientes del sistema de abastecimiento de una población, después de haber sido modificado por diversos usos en actividades domésticas industriales y comunitarias.

2.1.2. Aguas residuales domésticas

Se denominan aguas residuales domésticas a aquellas aguas de origen residencial y comercial que contiene desechos fisiológicos, entre otros, provenientes de la actividad humana, y deben ser dispuestas adecuadamente. Este tipo de agua contienen principalmente papel, jabón, orina, heces y detergentes (Delgadillo *et al.*, 2010).

2.1.3. Diversidad bacteriana

Tradicionalmente los estudios para caracterizar la diversidad bacteriana en diferentes ambientes se basan en la suposición de que las técnicas de cultivo permiten recuperar la mayor parte de los microorganismos en una muestra (Escalante *et al.*, 2001). Es un término amplio que incluye no solamente la diversidad filogenética, sino también la molecular, funcional y los mecanismos de actuación. Para conseguir esta visión tan amplia del mundo microbiano se pueden utilizar técnicas metagenómicas que permite enfocarse en un gran número de microorganismos y comunidades que son de gran interés por sus posibles aplicaciones biotecnológicas así como sistemas modelo para el estudio de comunidades naturales (Calderoli, 2016)

Para Acinas (2007) el estudio de la diversidad microbiana no solo permite conocer la función, estructura y evolución de las poblaciones que componen una comunidad microbiana, sino también es una de las líneas de investigación más relevante en el campo de la biotecnología.

2.1.4. Características de las aguas residuales domésticas

Las aguas residuales domésticas se caracterizan por su composición física, química y biológica relacionándose entre varios parámetros que forman esta composición (Kestler, 2004).

2.1.4.1. Características físicas

Color:

El color determina la calidad del agua residual según el tiempo que estén retenidas (Orellana, 2005). Esta característica se debe al contenido de sustancias en suspensión o disueltas tales como materia orgánica resultante de la degradación de vegetales y diversos compuestos que normalmente se encuentran en ella (Marín, 2010).

Olor:

Este surge por la presencia de algunas sustancias que se producen por la descomposición anaerobia de la materia orgánica, cuando las aguas residuales llegan a la planta de tratamiento los niveles de mal olor son bajos, con el tiempo estos desagradables olores aumentan por la liberación de gases como sulfhídrico o compuestos amoniacales (Muñoz, 2008).

2.1.4.2. Características químicas

Las aguas residuales están compuestas de elementos orgánicos, estos pueden ser de origen vegetal o animal, aunque el desarrollo de la población ha hecho que las aguas residuales contengan cada vez más compuestos orgánicos sintéticos (García *et al.*, 2006). Los compuestos orgánicos presentes en el agua residual comúnmente son: hidratos de carbono, proteínas, y lípidos, y sus derivados, estos pueden ser biodegradables y por consiguiente se pueden eliminar por oxidación (Rojas, 2002). En su investigación Lutenberg (2010) indica que las aguas residuales domésticas están compuestas por gases en diferentes concentraciones entre ellos los que más destacan: Ácido sulfhídrico, Anhídrido carbónico, Metano.

2.1.4.3. Características biológicas

Las aguas residuales domésticas presentan una gran variedad de organismos vivos con elevada capacidad metabólica y una capacidad potencialmente degradadora de materia orgánica e inorgánica. La presencia de componentes orgánicos vuelven a las aguas residuales un medio muy eficiente para el crecimiento de microorganismos que son de gran importancia ya que estos cierran los ciclos biogeoquímicos, del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre (Marín, 2010). Entre los microorganismo que se pueden encontrar en las aguas residuales son algas, mohos, bacterias, virus, flagelados, ciliados, rotíferos, nematodos, anélidos, larvas, etc. (García *et al.*, 2006).

2.1.5. ADN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es un ácido nucleico que contiene toda la información genética que compone a un organismo viviente. El ADN contiene las instrucciones genéticas que están implicadas en el proceso de desarrollo y funcionamiento de todos los seres vivos, desde las bacterias hasta los organismos multicelulares como plantas y animales. Una secuencia discreta de ADN que contiene las instrucciones para elaborar una proteína se conoce como gen (NHGRI, 2015).

2.1.5.1. Extracción y purificación de ADN

La extracción de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular y de todas las técnicas de recombinación de ADN. En el caso del ADN, la extracción consiste en su aislamiento y purificación basándose en las características fisicoquímicas de la molécula. Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere una carga neta negativa al ADN, haciéndolo altamente polar y permite disolverlo en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Cuando se pone en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante, quedando expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite (Castillo, 2014).

Se han diseñado múltiples protocolos de extracción con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Para esto además de métodos convencionales existe un gran número de kits comerciales, entre ellos el PowerSoil DNA Extracción kit MOBIO.

2.1.5.2 PowerSoil DNA Extraction kit MOBIO

El kit de aislamiento de ADN PowerSoil® consta de un método novedoso y patentado para aislar ADN genómico de muestras ambientales utilizando nuestro sistema patentado Tecnología de eliminación de inhibidores® (IRT). El kit está destinado para su uso con el medio ambiente, para una amplificación por PCR más exitosa de los organismos de la muestra. Análisis de PCR se ha realizado para detectar una variedad de organismos, incluyendo bacterias (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*), hongos (por ejemplo, levaduras, mohos), algas y actinomicetos (por ejemplo, *Streptomyces*).

2.1.5.3 GEN ADNr 16S

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas.

La secuencia del ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) ha sido de gran utilidad para la asignación y clasificación taxonómica. Actualmente, gracias a la capacidad de las tecnologías de nueva generación de secuenciación (NGS) se están produciendo numerosas secuencias, sin embargo, debido a las limitantes de las mismas tecnologías, estas son parciales. Si bien las secuencias parciales son útiles, se tiene mejor precisión en las mediciones de diversidad taxonómica cuando se utilizan completas. Por ello ha crecido el interés de ensamblar adecuadamente las secuencias cortas con el uso de programas informáticos especializados en reconstruir genes ARNr 16S, pero se ha dificultado por la gran similitud entre las secuencias (Arena y Chiappa, 2017)

2.1.6. Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se

caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. Por ello, se ha convertido en el método de elección de muchos investigadores para los estudios genéticos y de biología molecular (Ibarra y Velasquillo, 2013).

2.1.7. Metagenómica

El termino metagenómica hace referencia al estudio de genomas de una comunidad microbiana. Meta viene del griego ‘más allá de’ entendiéndolo como ir más allá del genoma, ya que permite analizar la estructura y función en conjunto de un gran número de genes presentes en un ambiente determinado (Gilbert *et al.*, 2010)

La metagenómica persigue obtener secuencias del genoma de los diferentes microorganismos, bacterias en este caso, que componen una comunidad, extrayendo y analizando su ADN de forma global. Este ADN del metagenoma representa a todos los genomas de las bacterias que conforman la población. El procedimiento empleado actualmente, consiste en aislar el material genético, manipularlo para finalmente construir genotecas de ADN donde quedará almacenada toda la información genética obtenida (Zapata y Pretell, 2015).

2.2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.2.1. Técnicas de secuenciación de metagenómica

Actualmente los proyectos que se están desarrollando en torno a la metagenómica buscan evaluar la diversidad microbiana y sus funciones de los diferentes hábitats evaluados. Estos estudios buscan principalmente caracterizar la estructura taxonómica de una comunidad microbiana, ya sea mediante el empleo de un gen marcador, como lo es el 16S ARNr o mediante el uso de la secuenciación aleatoria. La secuenciación aleatoria para un metagenoma puede ser dividida en dos grupos técnicamente distintos.

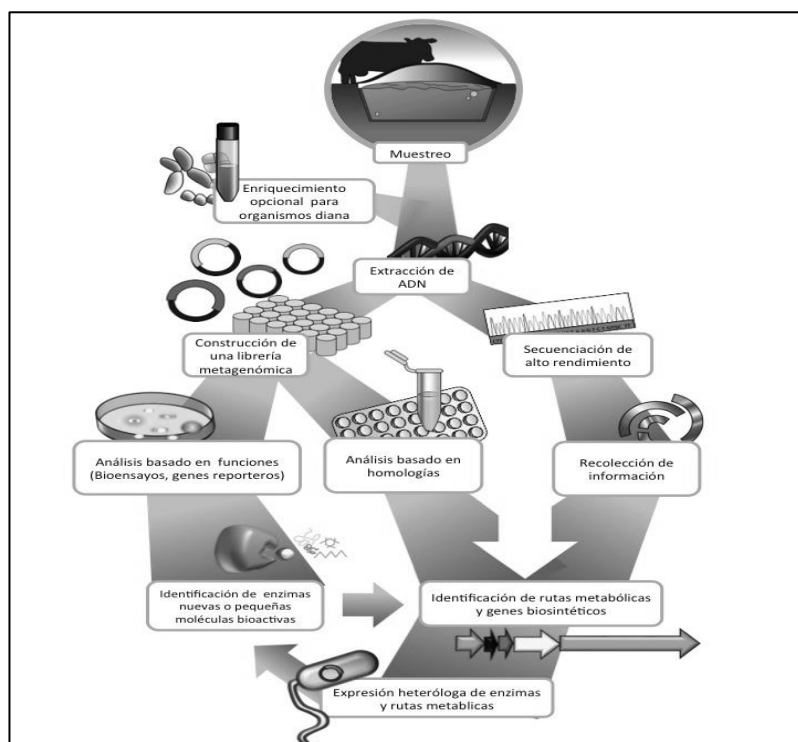


Figura 2. Diagrama de flujo general de las etapas implicadas en un estudio de metagenómica. Fuente: Fronteras en microbiología aplicada 2014

Recientemente la metagenómica tiene enfoques aplicada a estudio ambiental, muchas muestras han llevado al descubrimiento de nuevos microorganismos con un papel importante en el ciclo del carbono y nitrógeno (Hallam *et al.*, 2006) Sin embargo, algunos grupos filogenéticos permanecen sin detectar debido a que muestran más de una falta de coincidencia con los cebadores de PCR usados comúnmente (Baker *et al.*, 2003).

2.2.2. Ingeniería Genética y Metagenómica: una perspectiva para la biorremediación de aguas residuales.

Esta herramienta debe utilizarse para el entendimiento y desarrollo de nuevas técnicas en el tratamiento de agua residuales, este análisis permite realizar una caracterización de nuevos microorganismos, por ende, nuevos genes dándonos una pauta para comprender nuevas vías metabólicas, a conocer aquellas especies no cultivables que formaron resistencia al medio, y de alguna manera se adaptaron a condiciones extremas.

2.3. FUNDAMENTACIÓN LEGAL

2.3.1 Derecho al agua.

Según la Constitución Política de la República del Ecuador (2008) Título II Capítulo II Sección Segunda: Ambiente Sano, Art. 14 al Art. 15; Título VII Capítulo Segundo Sección Primera: Naturaleza y Ambiente Art. 395 al 399.

Art. 14.- Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y en buen vivir.

Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.

Art.15.- El Estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientales limpias y de energías alternativas no contaminantes y de bajo impacto. La soberanía energética no se alcanzará en detrimento de la soberanía alimentaria, ni afectará el derecho al agua.

2.3.2. Biodiversidad y recursos naturales

El TULSMA en su Título VII del Régimen del Buen Vivir, Capítulo II Biodiversidad y recursos naturales, Sección II Ambiente sano señala:

Art.396.- El estado adoptará las políticas y medidas oportunas que eviten los impactos ambientales negativos, cuando exista certidumbre de daño. En caso de duda sobre el impacto ambiental de alguna acción y omisión, aunque no exista evidencia científica del daño, el Estado adoptará medidas protectoras eficaces y oportunas.

La responsabilidad por daños ambientales es objetiva. Todo daño al ambiente, además de las sanciones correspondientes, implicará también la obligación de restaurar integralmente los ecosistemas e indemnizar a las personas y comunidades afectadas.

Cada uno de los actores de los procesos de producción, distribución, comercialización y uso de bienes o servicios sumará la responsabilidad directa de prevenir cualquier impacto ambiental, de mitigar y reparar los daños que ha causado, y de mantener un sistema de control ambiental permanente.

Las acciones legales para perseguir y sancionar por daños ambientales serán imprescriptibles.

Según el Acuerdo Ministerial No. 061, Art. 209 De la calidad del agua.- Son las características físicas, químicas y biológicas que establecen la composición del agua y la hacen apta para satisfacer la salud, el bienestar de la población y el equilibrio ecológico. La evaluación y control de la calidad de agua, se la realizará con procedimientos analíticos, muestreos y monitoreos de descargas, vertidos y cuerpos receptores; dichos lineamientos se encuentran detallados en el Anexo I.

Toda actividad antrópica deberá realizar las acciones preventivas necesarias para no alterar y asegurar la calidad y cantidad de agua de las cuencas hídricas, la alteración de la composición físico-química y biológica de fuentes de agua por efecto de descargas y vertidos líquidos o disposición de desechos en general u otras acciones negativas sobre sus componentes, conllevará las sanciones que correspondan a cada caso.

2.3.3. Agenda Nacional de Investigación sobre la Biodiversidad 2018

Objetivo 1.1: Generar y promover la investigación básica que permita inventariar, describir, documentar y catalogar la diversidad biológica, con énfasis en grupos taxonómicos de escaso conocimiento, ecosistemas vulnerables y áreas prioritarias para la conservación.

Objetivo 2.4: Determinar el efecto de la contaminación sobre los ecosistemas terrestres y acuáticos.

Objetivo 3.1: Desarrollar investigaciones científicas con enfoque multidisciplinar para el incremento del conocimiento, conservación y uso sostenible de la biodiversidad y de su patrimonio genético.

CAPÍTULO III.

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Tipo de investigación

3.1.1. Descriptiva y experimental

La investigación es descriptiva porque consiste en llegar a conocer las poblaciones bacterianas presentes en las aguas residuales, a través de la caracterización descriptiva microbiológica de las mismas. En un estudio descriptivo se selecciona una serie de bacterias y se mide o recolecta información sobre cada una de ellas.

3.2. Método de investigación

3.2.1. Método deductivo – analítico

El método aplicado fue el deductivo – analítico, debido a que permite tomar en cuenta los elementos individuales del objeto estudiado para poder comprender mejor la situación en general, consiente en distinguir los elementos de un fenómeno y se procede a revisar ordenadamente cada uno de ellos por separado. Consiste en la extracción de las partes de un todo, con el objeto de estudiarlas y examinarlas por separado, para conocer las relaciones entre las mismas.

3.3. Toma de muestra

La muestra se tomó de agua residual doméstica tanto en afluente como en el efluente del sistema de lagunaje y en agua del río Carrizal. Para el análisis se procedió a la toma de 2 muestras de agua en afluente y efluente y 2 muestras de agua más a con una distancia hasta de 200 metros de longitud aguas arriba y 200 metros de longitud aguas abajo tomando como referencia la zona de descarga del agua residual.

Las muestras para el análisis metagenómico fueron recolectadas en envases HDA plásticos estériles de 50ml y para los análisis físico-químicos y microbiológicos se emplearon frascos HDA de vidrio con tapa plástica azul tornillo de 500 ml.

3.4. Instrumento de investigación

Cuaderno de notas o diario de campo

En el cual se registra todas las actividades que se realizaron a nivel de campo.

Cámara fotográfica

Se usó para el registro fotográfico de todas las actividades que se efectuaron en la investigación.

Sistema de Posicionamiento Global (GPS)

Para determinar con exactitud la ubicación de los puntos a muestrear

3.5. Procesamiento y análisis de la información

Para el análisis de datos de las secuencias se usaron softwares como Qiime, Mothur, MGRast y el tradicional análisis de Excel. Como procedimiento investigativo para alcanzar el desarrollo de los objetivos específicos, se consideró el siguiente proceso:

3.5.1. Determinación de la diversidad bacteriana en las aguas residuales domésticas de la ciudad de Calceta

Actividad 1.- Extracción de ADN

Para la extracción de ADN bacteriano se utilizó el método PowerSoil DNA Extraction del kit MOBIO. Para iniciar el proceso se homogeneizó la muestra por agitación, y se tomó 10ml para obtener un sedimento de microorganismos y materia en suspensión. El sedimento se resuspendió en 60 µl de Solución C1, y transferido a los “PowerBead Tubes (ver figura 3).



Figura 3: Power Bead Tubes del kit MOBIO Powersoil, usados

Estos fueron llenados con 60 µl de solución C1 conteniendo el sedimento correspondiente a 10ml de cada muestra a analizar (Afluente, Efluente, Rio abajo y Rio Arriba respectivamente).

Los enfoques moleculares que se emplearon para estudiar la estructura de la comunidad bacteriana empezaron con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La relativa

simplicidad de este método y sensibilidad extrema nos permitió amplificar secuencias a partir del 16S rRNA o un gen funcional único correspondiente a la población en estudio. Los productos que se obtuvieron de la PCR fueron secuenciados.

Actividad 2. Amplificación del gen ADNr 16S

Una vez realizada la extracción de ADN, se comprobó la calidad mediante amplificación del gen 16S usando los primers universales 16S rRNA 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 16S rRNA 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Para la PCR, se usaron los primers a una concentración final de 0.4 μ M en 25 μ l de reacción.

El programa de amplificación consistió de una desnaturalización previa por 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos conformados por las etapas de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 58°C por 40 segundos y extensión a 72°C por 40 segundos. Luego se realizó una extensión final a 72°C por 7 minutos y conservación a 4°C.

Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 4).

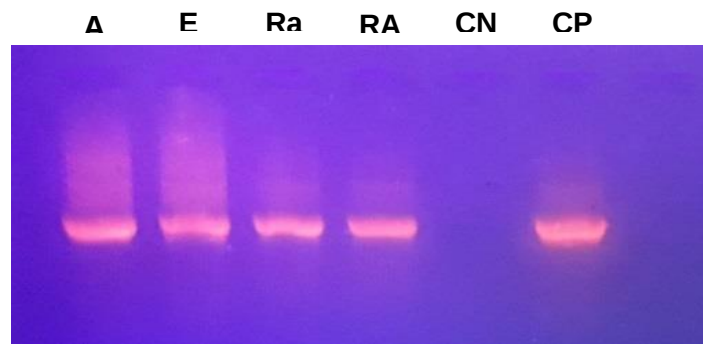


Figura 4: Resultados de la amplificación. Como resultados de la amplificación del gen 16SrRNA en ADN extraído de las muestras de Afluyente (A), Efluente (E), Rio abajo (Ra) y Rio arriba (RA). En las calle 5 y 6 se presenta el control negativo (CN) y control positivo (CP) de PCR, respectivamente.

Actividad 3. Secuenciación metagenómica

Los ADNs se sometieron a preparación de librerías marcadas para identificar todas las secuencias pertenecientes a una misma muestra. La secuenciación se realizó con el sistema “Ion Torrent™ Personal Genome Machine™ (PGM)”. (Figura 5).



Figura 5: Secuenciador “Ion Torrent™ Personal Genome Machine™ (PGM)”.

La amplificación por PCR corresponde a fragmentos de 300 pb con los cebadores universales 515F/806R de la región variable V4 del gen 16S rRNA realizando 30 ciclos de una etapa usando el HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, EE. UU.) En las siguientes condiciones: 94°C durante 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 53°C durante 40 segundos y 72°C durante 1 minuto, después de lo cual se realizó una etapa de elongación final a 72°C durante 5 minutos.

Los datos de secuencia se procesaron usando un servidor en línea de análisis (MR DNA, Shallowater, TX, EE. UU.).

Se eliminaron los códigos de barras y cebadores de las secuencias de los amplicones, luego se eliminaron secuencias <150 pb, se eliminaron también secuencias con identificaciones de base ambiguas y con ejecuciones de homopolímero superiores a 6 pb. Las secuencias fueron limpiadas de ruidos de fondo, se generaron OTU y se eliminaron las quimeras. Las unidades taxonómicas operacionales (OTU) se definieron agrupando al 3% de divergencia (97% de similitud). Las OTU finales se clasificaron taxonómicamente utilizando BLASTn contra una base de datos derivada del Proyecto base de datos Ribosomal (RDP) de la Universidad Estatal de Michigan y del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) por sus siglas en inglés.

3.5.2. Análisis de la calidad del agua del río carrizal.

Actividad 4. Georreferenciación de la zona de muestreo.

Los puntos de muestreo: afluente, efluente, aguas arriba y aguas debajo de la zona de descarga fueron georreferenciados mediante un GPS marca Garmin Etrex 10 (Figura 6).

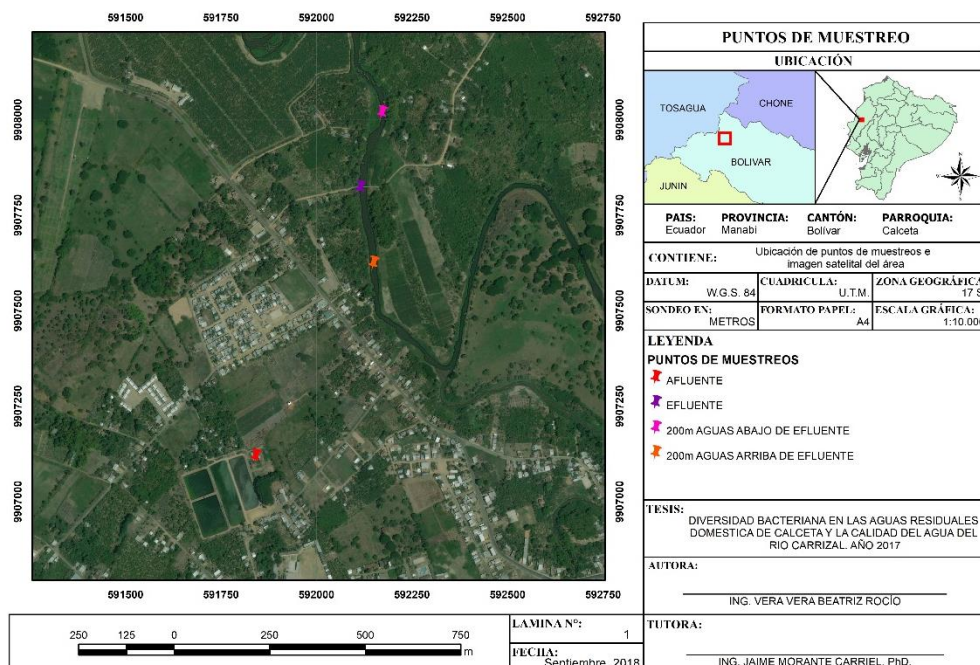


Figura 6. Mapa de georreferenciación de los puntos de muestreo

Elaborado por: Vera, 2018

Actividad 5. Recolección de muestras.

En el proceso de recolección de muestras se utilizó el procedimiento establecido por la norma ecuatoriana INEN 2226:2013, este será de tipo puntual, las muestras serán obtenidas de los puntos definidos, una vez recolectadas fueron trasladadas a un laboratorio de química ambiental y microbiología ambiental de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, para realizar los análisis correspondientes. El traslado se lo realizó siguiendo las indicaciones establecidas por la norma INEN 2169:2013 para el manejo y conservación de muestras.

Actividad 6. Caracterización de muestras de aguas del río Carrizal.

La caracterización de las muestras del agua residual doméstica consistió en la evaluación de parámetros químicos iniciales: DBO5 medida a 20°C, DQO y pH, así como también parámetros microbiológicos como coliformes fecales y totales.

3.5.3. Relación entre la diversidad bacteriana y la calidad del agua del río Carrizal

Una vez obtenidos estos datos del análisis metagenómico y sumandos a los de la calidad del agua del río Carrizal, se estableció la relación entre la diversidad bacteriana presente en las aguas residuales domésticas y la calidad del agua del río Carrizal como un indicador de la salud de ese ecosistema acuático, considerando los criterios de calidad contenidos en la normativa ambiental vigente.

Para analizar la estructura poblacional de las bacterias en todas las muestras, se realizó el análisis de agrupamiento y abundancia a través de la combinación entre un CLUSTER y un HEATMAP. Además se realizó un Diagrama de Venn para establecer la similitud en la estructura poblacional de las comunidades bacterianas existentes en los diferentes tipos de aguas evaluadas.

CAPÍTULO IV.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DIVERSIDAD BACTERIANA EN LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS DE LA CIUDAD DE CALCETA

La Figura 7, revela mayor abundancia de especies en la muestra tomada a 200 m aguas arriba del efluente, seguido de la muestra que pertenece a 200 m aguas abajo del efluente y en menor proporción en las muestras correspondientes al afluente y efluente de la planta de tratamiento o sistema de lagunaje.

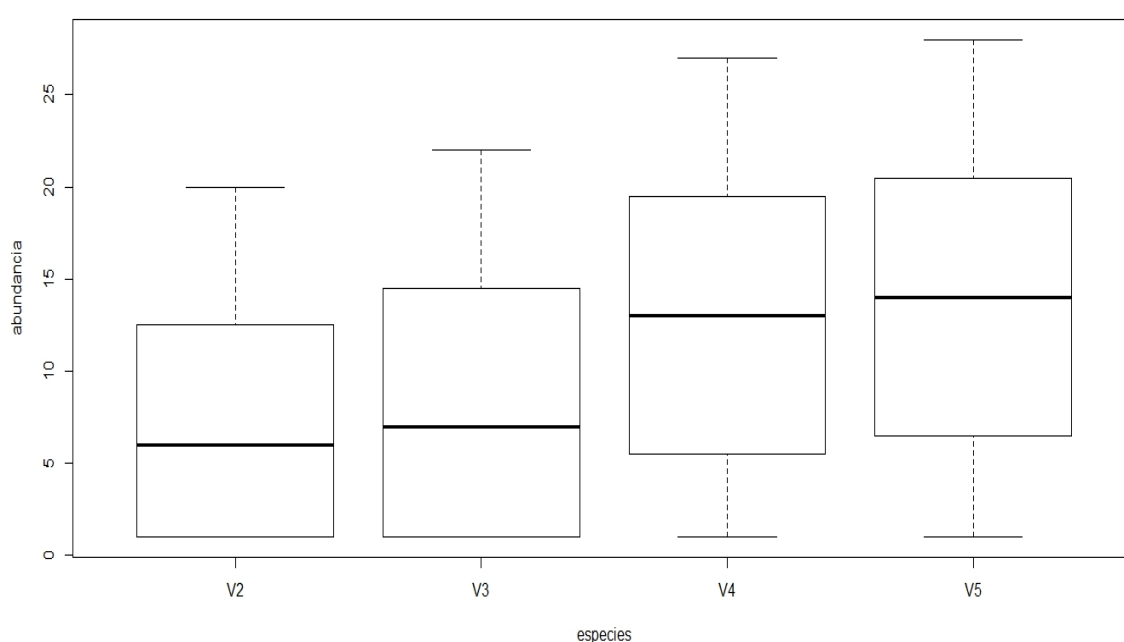


Figura 7. Abundancia de especies con relacion a las muestras evaluadas: V2 (afluente), V3 (efluente), V4 (200m aguas abajo) y V5 (200m aguas arriba)

Estadísticamente no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto a la abundancia de especies para las 4 muestras analizadas, sin embargo se puede notar un ligero aumento de especies en la muestra tomada a 200 m aguas arriba del efluente lo que puede estar relacionado con la existencia de asentamientos urbanos cercanos al rio Carrizal mismos que por falta de cultura ambiental arrojan residuos orgánicos e inorgánicos que produce un aumento en la diversidad bacteriana en el ecosistema acuático, lo que concuerda con Álvarez *et al.* (2016) quien manifiesta que “Los crecimientos urbanos, la industrialización y las actividades agrícolas interactúan con los procesos naturales del ciclo hidrológico de

manera cualitativa y cuantitativa. Los desechos generados por estas actividades humanas empeoran de manera notable la calidad de los recursos hídricos” (p. 108).

Por su parte, el afluente presentó una menor abundancia relativa en relación a las demás muestras dado que en ella en su mayoría están presentes solo bacterias características de las aguas residuales domésticas (figura 8).

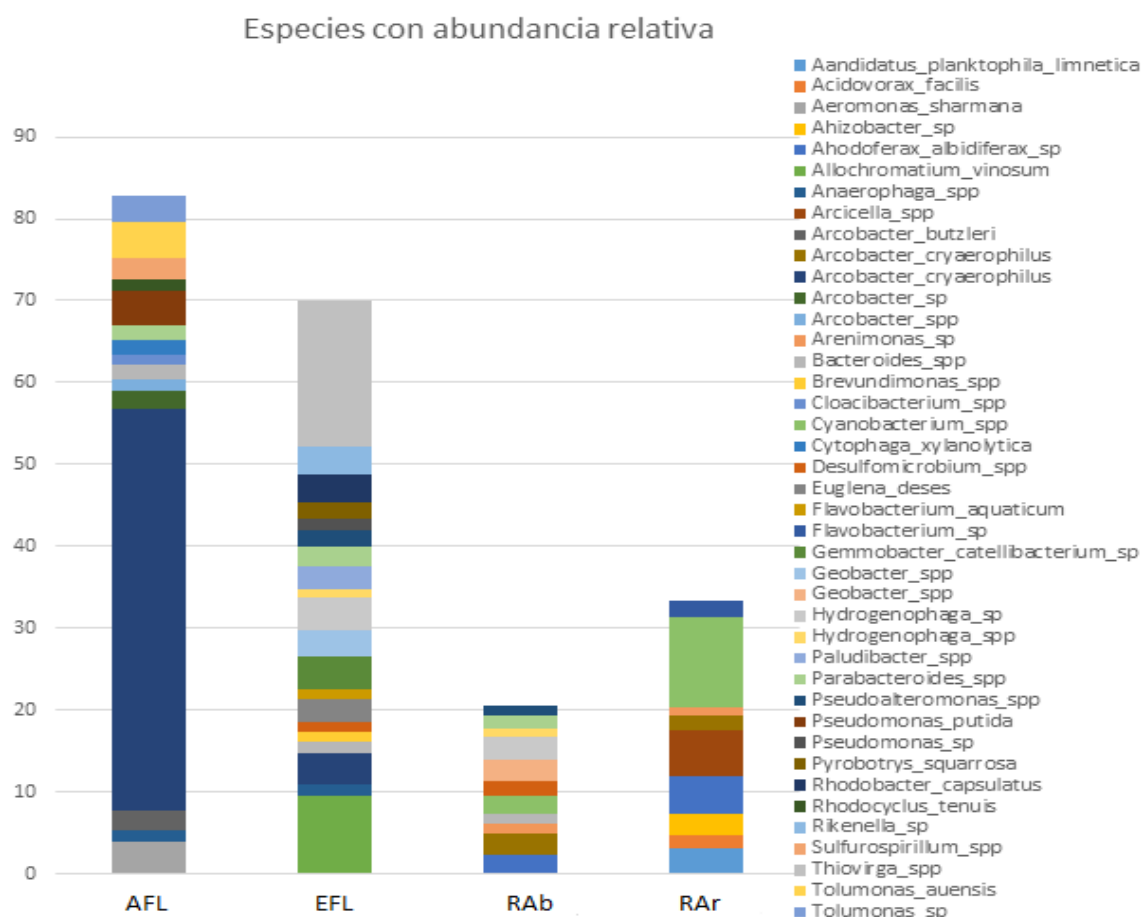


Figura 8. Especies con abundancia relativa en cada una de las muestras

Se identificó 41 especies de bacterias con abundancia relativa mayores al 1% presentes en las muestras de agua. Presentando en el afluente una mayor abundancia relativa las bacterias *Arcobacter cryaerophilus* perteneciente al género *Arcobacter* (57,24%), seguido de las *Tolomonas auensis* (5,04%), las *Pseudomonas putida* (4,86%) y las *Aeromonas sharmana* (4,51%) con relación al 100% de la muestra. Mientras que en el efluente la mayor abundancia la presentó las bacterias de la especie *Thiovirga spp.* (23,73%), *Allochroaium vinosum* (12,59%) y en menor proporción *Gemmobacter catellibacterium sp.* (5,43) y

Hydrogenophaga sp. (5,22%). Por su parte el análisis a 200 m aguas abajo mostró mayor abundancia de las especies *Allochrodatum vinosum* (13,27%), *Thiovirga* spp. (10,79%), *Gemmobacter catellibacterium* sp.(7,63%) y *Rikenella* sp. (6,12%). Mientras que los resultados 200 m aguas arriba fueron los siguientes: *Cyanobacterium* spp. (26,68%), *Arcicella* spp. (13,32 %) *Rhodoferrax albidiferrax* sp. (11,15%) y en menor porcentaje *Candidatus planktophila limnetica* (7,68%).

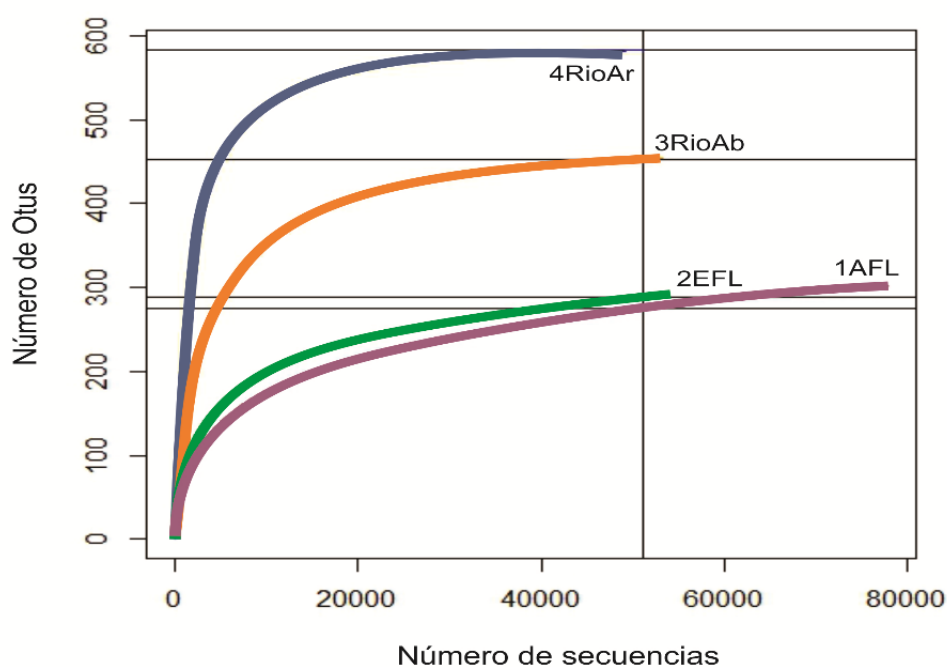


Figura 9. Curvas de Rarefacciones. Diversidad de cada sitio de muestreo

De acuerdo al análisis de rarefacción en general existe una estabilización entre las 50100 secuencias para encontrar una diversidad bacteriana. En la muestra el 4 RAr (200m rio arriba) se lograron encontrar 580 Otus o especies identificadas a 30000 secuencias siendo esta la de mayor diversidad puesto que se necesitó menor número de secuencias para encontrar la diversidad existente. A su vez la muestra 3 RAb (correspondiente a 200 metros aguas abajo del rio Carrizal) se estabilizó a 40000 secuencias encontrando 450 Otus.

Las muestras AFL y EFL poseen similar estructura debido a que ambas se estabilizaron entre 40800 a 50000 secuencias, encontrando de 280 a 300 Otus.

Para entender la diversidad bacteriana presente en las aguas residuales domésticas de la Ciudad de Calcuta, y su relación en la Calidad del agua del Río Carrizal, es fundamental

realizar análisis de calidad de dicha agua, teniendo en cuenta los aspectos microbiológicos y otros parámetros de tipo fisicoquímicos (Apartado 4.2).

4.2 CALIDAD DEL AGUA DEL RIO CARRIZAL Y LOS LÍMITES PERMISIBLES

4.2.1. Análisis microbiológico

Los resultados del análisis microbiológico de coliformes fecales y totales encontrados en cada punto de muestreo, las muestras con mayor contenido de coliformes totales las que corresponden a 200m aguas arriba con alrededor de 18000 NMP/100ml, sin embargo, el contenido de coliformes fecales es bajo con 2000 NMP/100ml, por su parte las muestras afluente y efluente por la naturaleza de las mismas dejan ver mayor contenido de coliformes totales y fecales (anexo 6). Los resultados revelan una que la disminución de coliformes totales y fecales no es significativa después del tratamiento que se le da al agua residual, con porcentajes de remoción inferiores al 50%, sin embargo la muestra correspondiente a agua de rio tomada a 200 m aguas abajo del efluente, a pesar de recibir el aporte de bacterias desde el efluente residual presenta contenidos bajos de los patógenos evaluados (figura 10).

4.2.1. Análisis químico

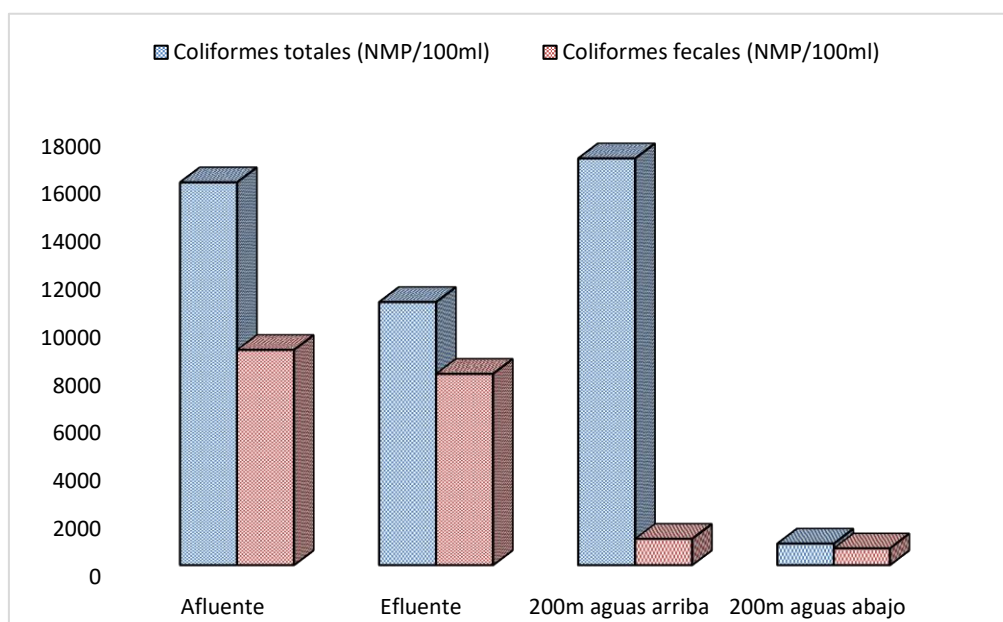


Figura 10. Análisis de coliformes totales y fecales según el NMP/100ml de muestra. Al analizar la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) se puede notar una mayor DBO₅ en la muestra correspondiente al efluente o agua tratada con 110 mg/l, relativamente mayor

a lo presentado por el afluente 10 mg/l, mientras que las muestras tomadas en el río a una distancia de 200 m aguas arriba y 200 m aguas abajo de la zona de descarga revelaron los menores valores de DBO₅ con no más de 2ml/l (figura 11).

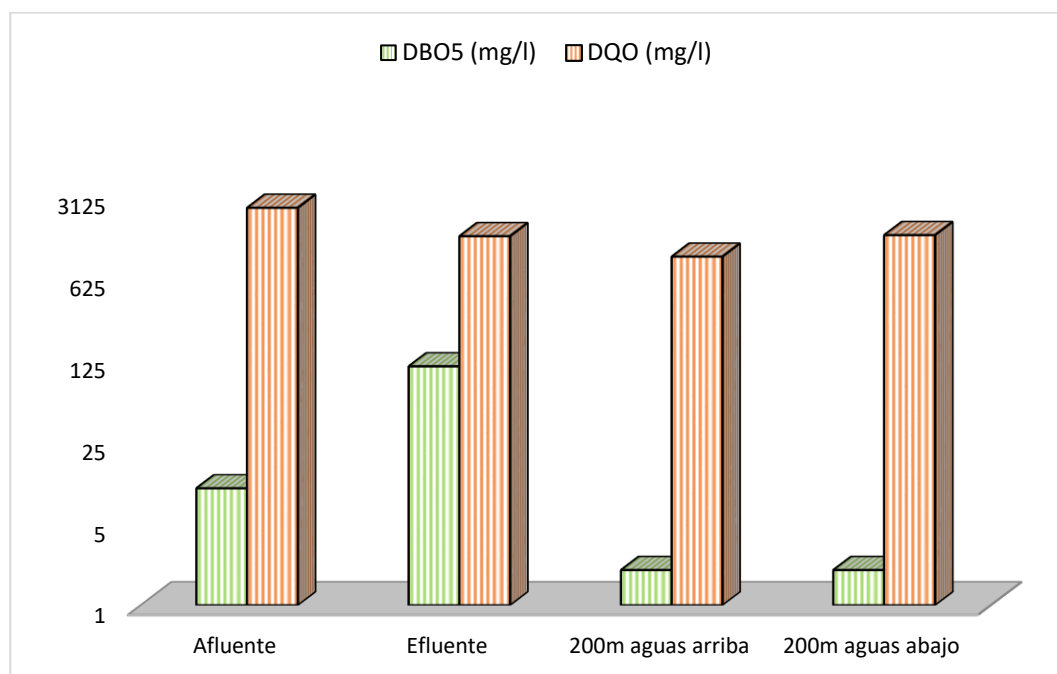


Figura 11. Análisis químico: Parámetros DBO₅ y DQO en cada punto de muestreo

Según la normativa vigente que regula el recurso agua, reforma del libro VI del texto unificado de legislación secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA), Anexo I, Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: recurso agua.; los valores medidos se compararon con la tabla 9 de la presente norma, en la cual especifica en el artículo 5.2.4.9 “Las aguas residuales que no cumplan con los parámetros de descarga establecidos en esta Norma, deberán ser tratadas adecuadamente, sea cual fuere su origen: público o privado. Los sistemas de tratamiento deben contar con un plan de contingencia frente a cualquier situación que afecte su eficiencia” (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Límites de descarga a cuerpo de agua dulce, parámetro microbiológicos del efluente residual del sistema de lagunaje se aguas residuales domésticas de Calceta

Parámetro	Unidad	Valor	Límites permisibles Ministerio de Ambiente Ecuador, 2015
Coliformes totales	NMP/100ml	11000	-----

Coliformes fecales	NMP/100ml	8000	2000
--------------------	-----------	------	------

Tabla 2. Límites de descarga a cuerpo de agua dulce, parámetros químicos del efluente residual del sistema de lagunaje se aguas residuales domésticas de Calceta

Parámetro	Unidad	Valor	Límites permisibles Ministerio de Ambiente Ecuador, 2015
DBO5	mgO ₂ /l	110	100
DQO	mgO ₂ /l	1420	200

Al comparar los datos obtenidos en el efluente con los límites permisibles según el Ministerio de Ambiente del Ecuador, se puede notar claramente que no se está realizando un adecuado tratamiento a las aguas residuales puesto que los resultados sobrepasan los límites máximos permisibles para la descarga a un cuerpo de agua dulce (anexo 5).

En contraste con los análisis químicos y de abundancia microbiológica en la dinámica de la calidad del agua, fue necesario desarrollar variables que permitan medir la relación microbiológica y genética entre la diversidad bacteriana y la calidad de agua del Rio Carrizal.

4.3 RELACIÓN ENTRE DIVERSIDAD BACTERIANA Y LA CALIDAD DEL AGUA DEL RÍO CARRIZAL

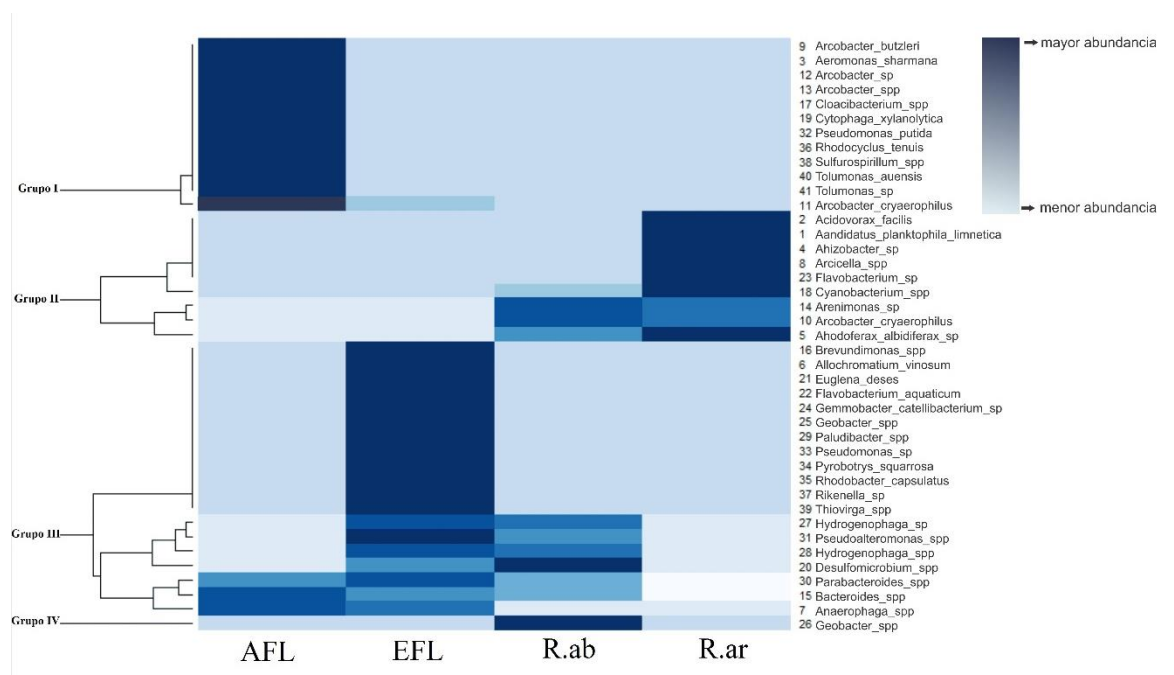


Figura 12. Analisis de agrupamiento y abundancia a través de la combinación entre un CLUSTER y HEATMAP

Para el análisis de la estructura poblacional de las bacterias se realizó un análisis de agrupamiento y abundancia mediante un CLUSTER y HEATMAP. El análisis de agrupamiento revela la formación de 4 grupos (I, II, III Y IV) de acuerdo a la abundancia relativa. El grupo que posee una mayor similitud de especies es grupo III con 19 especies, seguido del grupo I que agrupó 12 especies, mientras que el grupo IV presentó la menor diversidad con apenas 1 especie.

En cuanto al análisis de abundancia según el HEATMAP el grupo I presentó mayor número de individuos de las especies: *Arcobacter_butzleri*, *Aeromonas_sharmana*, *Arcobacter_sp*, *Arcobacter_spp*, *Cloacibacterium_spp*, *Cytophaga_xylanolytica*, *Pseudomonas_putida*, *Rhodocyclus_tenuis*, *Sulfurospirillum_spp*, *Tolumonas_auensis*, *Tolumonas_sp* y *Arcobacter_cryaerophilus*, en la muestra correspondiente a afluente.

El mayor número de individuos en el Grupo II lo aportan *Acidovorax_facilis*, *Aandidatus_planktophila_limnetica*, *Ahizobacter_sp*, *Arcicella_spp*, *Flavobacterium_sp*,

Cyanobacterium_spp, *Arenimonas_sp*, *Arcobacter_cryaerophilus* y *Ahodoferax_albidiferax_sp* en la muestra rio arriba.

En el grupo III con mayor diversidad, tomando en cuenta la muestra del Efluente predominaron en mayor abundancia los individuos de las especies:

- *Brevundimonas_spp*
- *Allochrodatum_vinosum*
- *Euglena_deses*
- *Flavobacterium_aquaticum*
- *Gemmobacter_catellibacterium_sp*
- *Geobacter_spp*, *Paludibacter_spp*
- *Pseudomonas_sp*
- *Pyrobutrys_squarrosa*
- *Rhodobacter_capsulatus*
- *Rikenella_sp*
- *Thiovirga_spp*
- *Hydrogenophaga_sp*
- *Pseudoalteromonas_spp*
- *Hydrogenophaga_spp*
- *Desulfomicrobium_spp*
- *Parabacteroides_spp*
- *Bacteroides_spp*
- *Anaerophaga_spp*
- *Pseudoalteromonas_spp*

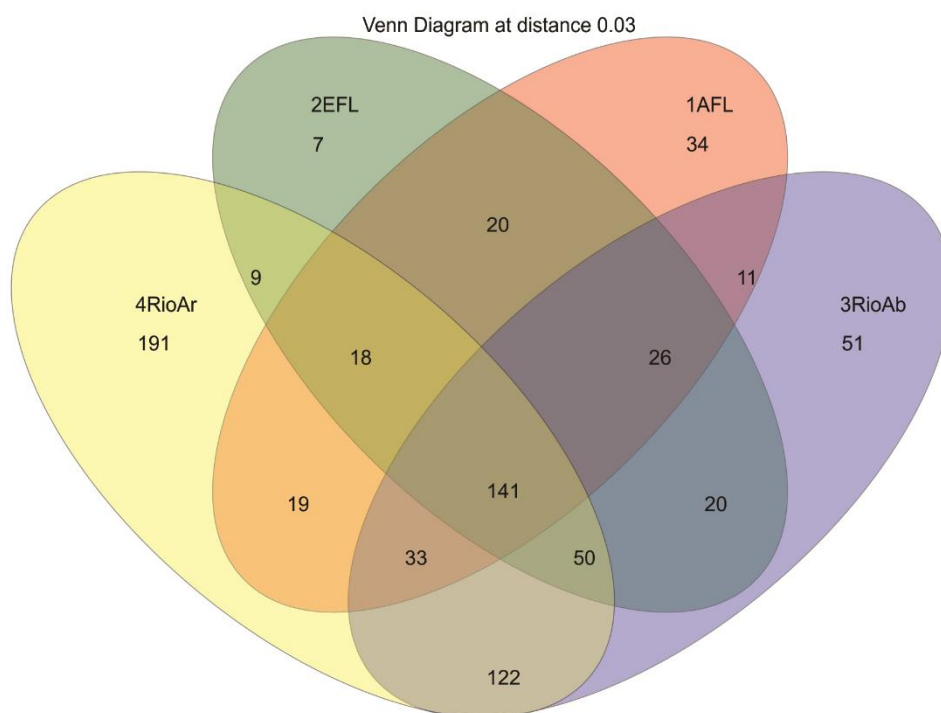


Figura 13. Analisis estructural de la poblacion bacteriana en aguas residuales. Numeros de especies compartidas 1 AFL (Afluyente), 2 EFL (Efluente), 3 RioAb (200m aguas abajo) Y 4RioAr (200m aguas arriba)

El diagrama de Venn muestra el número de especies encontradas en cada grupo y a su vez la similitud en la estructura de las comunidades bacterianas que existe entre los diferentes tipos de muestras, la mayor diversidad bacteriana la revela la muestra tomada 200 metros aguas arriba del efluente, y la menor diversidad la muestra correspondiente al efluente (agua tratada). Como resultado de la riqueza compartida entre las muestras corresponde a detallar:

El número de especies compartidas entre las muestras es:

- Afluyente y efluente 205
- Afluyente y rio abajo 211
- Afluyente y rio arriba 211
- Efluente y rio abajo 237
- Efluente y rio arriba 218
- Rio abajo y rio arriba 346.

A si mismo existen especies de bacterias presentes en tres tipos de muestras como se presenta a continuación:

- Afluente, efluente y río abajo 167
- Afluente, efluente y río arriba 149
- Afluente, río abajo y río arriba 174
- Efluente río abajo y río arriba 191

La riqueza total de todos los grupos es 752, es decir que existe un 46% de similitud entre la estructura de las comunidades bacterianas presentes en las muestras de agua analizadas, considerando un total de 1630 especies de bacterias entre todas las muestras.

Al realizar un análisis de la estructura poblacional global existen 141 especies que se interrelacionan con todas las muestra.

Al analizar muestras con características similares encontramos que la estructura poblacional entre las muestras 200 m aguas arriba y 200 m aguas abajo la compone 122 especies que se interrelacionan entre sí para poder mantener la estructura.

Por su parte las aguas correspondientes a afluente y efluente existen 20 especies comunes en ambas muestras

4.4 DISCUSIÓN

El desarrollo reciente de la secuenciación de alto rendimiento del metagenoma ahora permite a los investigadores investigar y comparar la estructura comunitaria de los conjuntos microbianos de diversos entornos y estudiar su potencial metabólico (Thompson *et al.*, 2017).

Hasta hace aproximadamente dos décadas, la identificación de grupos fisiológicos microbianos y la evaluación de su diversidad en suelos y aguas contaminadas, exigía el aislamiento a partir de cultivos en medios diferenciales (Aamann *et al.*, 1995). La estimación de la estructura poblacional requería la utilización de técnicas de identificación y conteo en placa, las cuales no revelaban la realidad, debido a que la porción de diversidad microbiana estimada a través de técnicas de cultivo tradicional en laboratorio, representaba aproximadamente el 1% del total de la diversidad presente en un ambiente (Schmeisser *et al.*, 2007.). Esto indica que estas técnicas están significativamente sesgadas a los microorganismos de crecimiento rápido y de fácil cultivo, dejando por fuera al grupo de los microorganismos denominados no cultivables, los cuales representan hasta un 99% del total de individuos presentes en un ambiente (Schloss and Handelsman, 2013).

Con el fin de suplir esta deficiencia técnica y eliminar el sesgo metodológico, se realizaron ensayos metagenómicos, orientados a analizar la diversidad bacteriana en las aguas residuales domésticas de Calceta y su relación en el agua del río Carrizal, independiente de su cultivo bacteriano (Sleator, et. al., 2008.). Esta aproximación involucra herramientas de biología molecular, como el aislamiento del ADN, seguido por ensayos metagenómicos completo, la secuenciación directa de este ADN ambiental o, la amplificación de secuencias de interés para análisis de función. Esta aproximación permite el análisis de la diversidad de genes relacionados con efectos de contaminación, permitiendo inferir en la calidad de agua dentro de un hábitat determinado (Schloss and Handelsman, 2013).

Los microorganismos, son la parte dominante de la actividad metabólica y de la biomasa, los estudios de la dinámica y composición de las poblaciones acuáticas son muy importantes (Fuhrman *et al.* 2015). En la presente investigación se observó una variación significativa de la diversidad bacteriana a lo largo del periodo de estudio, observando una mayor biodiversidad cuando el sistema hidrológico se ve influenciado por el lavado de los sólidos suspendidos arrastrados y en consecuencia la disminución de sólidos disueltos.

La comunidad bacteriana refleja una composición de bacterias de baja salinidad, incluyendo principalmente al género *Arcobacter*, expresando predominancia. Se observó una mayor predominancia de pocas familias y tienen oscilación con el tiempo en función de los valores ambientales. Pocos estudios se han realizado sobre comunidad de microorganismos en estuarios como el realizado por Taylor *et al.*, (2014) quienes reportaron a la ordenes *Flavobacteriales* y *Rhodobacterales* como las más abundantes, diferente a la reportada en éste estudio, sin embargo Ortmann & Ortell en 2014, no detectaron cambios significativos estacionales en la comunidad bacteriana sugiriendo que esto puede deberse a la estabilidad del ecosistema, diferente a lo reportado por Ji *et al.*, (2016) quienes observaron que la abundancia de la comunidad bacteriana fue significativamente diferente en los sitios de muestreo al igual que este estudio, sin embargo, las fluctuaciones de la comunidad bacteriana en la zona de estudio presentaron amplia variación.

En las muestras evaluadas se reporta la presencia de bacterias potencialmente patógenas como: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* y *Neisseria*, esta última presente solo en el afluente residual, similar a lo encontrado por Rio *et al.*, (2017) quienes manifiestan que dentro de las bacterias establecidas como contaminantes del agua se han aislado Gram negativas, especialmente

pertenecientes a los géneros antes mencionados, aunque el grupo bacteriano que cumple con las características de potencial bioindicador de calidad del agua es el de las bacterias coliformes.

A su vez Barahona *et al.*, (2017) indica que la presencia de las bacterias indicadoras de contaminación fecal y potencialmente patógenas en los ríos se debe a los vertimientos aledaños de aguas residuales domésticas, agrícolas y asentamientos humanos que condicionan la calidad y el uso de recurso hídrico.

CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Se identificó 41 especies de bacterias con abundancia relativa mayores al 1%, siendo las de mayor abundancia las bacterias *Arcobacter cryaerophilus* perteneciente al género *Arcobacter* (57,24%) en el afluente.
- Se observó un aumento de microorganismos contaminantes en la muestra tomada a 200 m aguas arriba del efluente, datos que están relacionados con la presencia de residuos orgánicos e inorgánicos por asentamientos humanos próximos al Rio Carrizal, produciendo un aumento en la diversidad bacteriana en el ecosistema acuático.
- El afluente presentó menor abundancia relativa en relación a las demás muestras. En ella, estuvieron presentes solo bacterias características de las aguas residuales domésticas
- El agua procedente de la estación depuradora de Calceta presentó altos contenidos de DBO5 y microorganismos patógenos que están por encima de los límites permisibles establecidos en el anexo I del libro VI del TULSMA, lo que indica que el tratamiento que se le está dando al agua residual no es eficiente en cuanto a la remoción de materia orgánica y microorganismos patógenos que alteran la calidad del agua del rio Carrizal.
- Se determinó que la presencia de las bacterias indicadoras de contaminación fecal y potencialmente patógenas en las muestras de agua evaluadas en mayor proporción en aguas sin intervención del efluente residual probablemente debido a los vertimientos de aguas residuales domésticas, agrícolas y asentamientos humanos que alteran la calidad y el uso de recurso hídrico establecido por la normatividad ambiental ecuatoriana.

5.2 RECOMENDACIONES

- Este trabajo sienta las bases para seguir aplicando nuevas tecnologías y tipos de análisis como es el caso del análisis metagenómico que implica poder encontrar la diversidad microorganismos que componen la estructura de un ambiente.
- El empleo de las bacterias indicadoras de contaminación fecal continúa resultando de gran utilidad en el monitoreo de la calidad de las aguas; sin embargo, se hace necesario no sólo evaluar a nivel biológico sino también es el empleo de variables físico químicas que contribuyan a establecer una relación entre los indicadores y determinar el grado de contaminación de las aguas y al deterioro de su calidad.
- Realizar investigaciones con el uso de otros microorganismos nativos con capacidad de biorremediación, para la disminución de la carga orgánica presente en la estación depuradora de Calceta y evitar que se altere la calidad del agua del río Carrizal.
- Conocer la dinámica poblacional de diversos hábitats y con ello el descubrimiento de nuevos antibióticos, genes, enzimas, estructuras proteicas y rutas metabólicas para identificar microorganismos capaces de dar soluciones a problemas ambientales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aamann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews* 59:143– 169
- Acinas, S. G. 2007. Diversidad y estructura de una comunidad microbiana. *Actualidad SEM - Boletín Informativo de la Sociedad Española de Microbiología* 44:24-9
- Allen, L. Z., Allen, E. E., Badger, J. H., McCrow, J. P., Paulsen, I. T., Elbourne, L. D., et al. (2012). Influence of nutrients and currents on the genomic composition of microbes across an upwelling mosaic. *ISME J.* 6, 1403–1414. doi: 10.1038/ismej.2011.201
- Arcos, M; Ávila, S; Estupiñán, S y Gómez, A. (2015). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. CO. Rev.UNICOLMAYOR. Vol. 3 Núm. 4. p 69- 79.
- Arnaiz, C. (2000). Tratamiento biológico de aguas residuales (En línea). Consultado el 25 de mayo. 2016. Formato PDF. Recuperado de <http://cidta.usal.es/> revista TECNOLÓGICA DEL AGUA
- Baker, G.C., Smith, J.J., and Cowan, D.A. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 55: 541–555.
- Barahona, Y. M., Luna, J. A., Romero, I. M. (2016). Calidad bacteriológica del agua de los ríos Manaure y Casacará, departamento del Cesar, Colombia. *Revista Luna Azul*, 45, 82-101.
- Bazurto, L. (2017). Microorganismos Nativos En La Eficiencia De Remoción De Materia Orgánica Del Efluente De La Estación Depuradora De Calceta, Manabí. Tesis. Ingeniero Ambiental. Calceta. Manabí. Ecuador
- Bodaker, I., Sharon, I., Suzuki, M. T., Feingersch, R., Shmoish, M., Andreishcheva, E., et al. (2010). Comparative community genomics in the Dead Sea: an increasingly extreme environment. *ISME J.* 4, 399–407. doi: 10.1038/ismej.2009.141
- Calderoli, P. (2016). Análisis de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno del suelo aplicando procedimientos metagenómicos. Obtenido de Universidad Nacional de La Plata: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/52022>
- Cárdenas, J. (2012). Modelación dinámica de las lagunas de oxidación de la ciudad de Portoviejo. Tesis. Maestría en Ingeniería Ambiental. EC. (En línea). Consultado el 3 de Septiembre 2016. Formato PDF. Recuperado de <http://dspace.unl.edu.ec>

- Delgadillo, O; Camacho, A; Pérez, L y Andrade, M. (2010). Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales. Cochabamba, BO, Editorial Universidad Mayor de San Simón. Ed. Nelson Antequera Durán. 99 p.
- DeLong, E. F., Preston, C. M., Mincer, T., Rich, V., Hallam, S. J., Frigaard, N.-U., et al. (2006). Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science* 311, 496–503. doi: 10.1126/science.1120250
- Diario La Hora. (29 de Octubre de 2016). Ecuador: 88% de las aguas residuales llega a los ríos.
- Díaz, E; Alvarado, A y Camacho, K. 2012. El tratamiento de agua residual doméstica para el desarrollo local sostenible: el caso de la técnica del sistema unitario de tratamiento de aguas, nutrientes y energía (SUTRANE) en San Miguel Almaya, México. *Revista Redalyc*. Vol. 14. Núm. 1. p 78-97.
- Escalante, A., Gosset, G., Martinez, A., & Bolivar, F. (2001). Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Redalyc*, 583-584
- Fuhrman JA, Cram JA, Needham DM. 2015. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nature Rev. Microbiol.* 13: 133–146. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3417>
- García, I; Betancort, J; Salas, J; Peñate, B; Pidre, J y Sardón, N. 2006. Guía sobre tratamientos de aguas residuales urbanas para pequeños núcleos de población. Mejora de la calidad de los efluentes. (En línea). Consultado el 12 de jun. 2016. Formato PDF. Recuperado de www.cienciacanaria.esa
- Gilbert, J. A. et al. (2010), “Metagenomics. A foundling finds its feet”, en *Standards in Genomic Sciences*, 3: 212-213
- Hallam, S.J., Mincer, T.J., Schleper, C., Preston, C.M., Roberts, K., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2006) Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biol* 4: e95.
- Hewson, I., Paerl, R. W., Tripp, H. J., Zehr, J. P., and Karl, D. M. (2009). Metagenomic potential of microbial assemblages in the surface waters of the central Pacific Ocean tracks variability in oceanic habitat. *Limnol. Oceanogr.* 54, 1981–1994. doi: 10.4319/lo.2009.54.6.1981
- Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena. *Tecnología en salud*, 70-78.

- Ji, Y., Angel, R., Klose, M., Claus, P., Marotta, H., Pinho, L., Conrad, R. (2016). Structure and function of methanogenic microbial communities in sediments of Amazonian lakes with different water types. *Environmental Microbiology*, 18, 5082–5100. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13491>
- Junior, N. A., Meirelles, P. M., de Oliveira Santos, E., Dutilh, B., Silva, G. G., Paranhos, R., et al. (2015). Microbial community diversity and physical–chemical features of the Southwestern Atlantic Ocean. *Arch. Microbiol.* 197, 165–179. doi: 10.1007/s00203-014-1035-6
- Kestler, P. 2004. Uso, reuso, y reciclaje del agua residual en la vivienda. Tesis, Ing. Civil Administrativa. GT. p 25-40. (En línea). Consultado el 10 de jul. 2016. Formato PDF. Recuperado de www.bvsde.paho.org
- Laboratory for Microbial Ecology. (2004). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) Obtenido de <http://www.eeescience.utoledo.edu>
- Lutenberg, O. 2010. Tratamiento sanitario de aguas residuales, eliminación de microorganismos y agentes contaminantes características de efluentes y criterios de seguridad. PE. (En línea). Consultado el 26 de jun. 2016. Formato PDF. Recuperado de www.ana.gob.pe
- Marín, R. 2010. Características físicas, químicas y biológicas de las aguas. Córdoba, ES. p 4. (En línea). Consultado el 10 de Julio. 2016. Formato PDF. Recuperado de <http://api.eoi.es>
- Mass, k y Medrano, Y. 2015. Tratamiento de aguas residuales a partir de digestión anaerobia. COL. (En línea). Consultado el 20 de jun. 2016. Formato PDF. Recuperado de <http://bibliotecadigital.usbcali.edu.co>
- Montesdeoca, 2013. Tratamiento de aguas residuales en la urbanización ciudad politécnica, cantón Bolívar, provincia de Manabí. Revista ESPAM Ciencia. (En línea). Consultado el 10 de Septiembre 2016. Formato PDF. Recuperado de <http://espam.edu.ec>
- Muñoz, A 2008. Caracterización y tratamiento de aguas residuales. Tesis. Ing. Industrial. UAEH. MX. p 305. (En línea). Consultado el 10 de jul. 2016. Formato PDF. Recuperado de www.dgsa.uaeh.edu.mx
- NCBI. (2019). National Center for Biotechnology Information. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- ONU, 2015. Gestión de aguas residuales, PNUMA. (Programa de las naciones unidas para el medio ambiente). (En línea). Consultado el 2 de jun. 2016. Formato PDF. Recuperado de www.un.org
- Orellana, 2005. Características de los líquidos residuales. (En línea). Consultado el 18 de Jul. 2016. Formato PDF. Recuperado de <http://www.frro.utn.edu.ar/>
- Ortmann, A. C., & Ortell, N. (2014). Changes in free-living bacterial community diversity reflect the magnitude of environmental variability. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(1), 291– 301. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12225>
- Ramirez, H. (2013). Metagenómica biodiversidad y nuevos productos biotecnológicos. Recuperado el 22 de Septiembre de 2017, de <https://es.slideshare.net/HelmerArturo/metagenmica-biodiversidad-y-nuevos-productos-biotecnolgicos>
- Ríos, S., Agudelo, R., & Gutiérrez, L. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 236-247.
- Rojas, R. 2002. (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, División de Salud y Ambiente, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud) curso internacional “Gestión integral de tratamiento de aguas residuales” *Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales*. (En línea). Consultado el 9 de jun. 2016. Formato PDF. Recuperado de www.datateca.edu.co
- Schloss, P. D., and J. Handelsman. 2013. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology* 14:303–310.
- Schmeisser, C., H. Steele, and W. R. Streit. 2007. Metagenomics, biotechnology with nonculturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:955-962.
- Sleator, R. D., C. Shortall, and C. Hill. 2008. Metagenomics. *Letters in Applied Microbiology* 47:361-366.
- Smedile, F., Messina, E., La Cono, V., Tsoy, O., Monticelli, L. S., Borghini, M., et al. (2013). Metagenomic analysis of hadopelagic microbial assemblages thriving at the deepest part of Mediterranean Sea. *Matapan-Vavilov Deep. Environ. Microbiol.* 15, 167–182. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02827.x
- Taylor, J. D., Cottingham, S. D., Billinge, J., & Cunliffe, M. (2014). Seasonal microbial community dynamics correlate with phytoplankton-derived polysaccharides in

surface coastal waters. The ISME Journal, 8(1), 245–248.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2013.178>

Thompson, L. R., Williams, G. J., Haroon, M. F., Shibl, A., Larsen, P., Shorenstein, J., et al. (2017). Metagenomic covariation along densely sampled environmental gradients in the Red Sea. *ISME J.* 11, 138–151. doi: 10.1038/ismej.2016.99

Universidad Estatal de Michigan. (2018). Proyecto de base de datos Ribosomal. Obtenido de Departamento de microbiología: <http://rdp.cme.msu.edu>

ANEXOS

ANEXO 1

Quevedo, 12 de febrero de 2019

Ing. Roque Vivas Moreira, M.Sc.
DIRECTOR DE POSGRADO
UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Presente.-

De mis consideraciones:

En calidad de Director del Proyecto de Investigación "**DIVERSIDAD BACTERIANA EN LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS DE CALCETA Y SU RELACIÓN EN LA CALIDAD DEL AGUA DEL RIO CARRIZAL. AÑO 2018**", de la autoría de la Ing. BEATRIZ ROCÍO VERA VERA, me permito informar a usted y por su intermedio a los miembros del tribunal:

Que el proyecto en mención ha sido subido al sistema URKUND, para validar posible incidencia de plagio, obteniendo una significancia del 2%. En este sentido, la ING. BEATRIZ ROCÍO VERA VERA, puede hacer uso del presente certificado como requisito para optar al grado académico de Magister en Gestión Ambiental.

Documento : [PROYECTO-BEATRIZ-VERA 2018 URKUND.docx](#) (D47672199)

Presentado : 2018-02-12 15:32 (-05:00)

Presentado por : jmorante@uteq.edu.ec

Recibido : jmorante.uteq@analysis.arkund.com

2% de estas 16 páginas, se componen de texto presente en 1 fuentes.



JAIME MORANTE CARRIEL, Ph.D
Director



Anexo 2: Rio Carizal



Anexo 3: Afluente (agua que llega a la planta)



Anexo 4: Efluente residual (agua tratada)

MUESTRAS ANALIZADAS	PARÁMETROS	
	COLIFORMES TOTALES (NMP/100ml)	COLIFORMES FECALES (NMP/100ml)
Afluente	1,6000	9000
Efluente	11000	8000
200m aguas arriba	17000	1100
200m aguas abajo	900	700

Anexo 5: Análisis químico de las muestras de agua

MUESTRAS ANALIZADAS	PARÁMETROS		
	DBO5 (mg/l)	DQO (mg/l)	pH
Afluente	10	2480	7,22
Efluente	110	1420	7,59
200m aguas arriba	2	950	7,33
200m aguas abajo	2	1450	7,52

Anexo 6: Análisis microbiológico de las muestras de agua