



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Monitoreo de las comunidades microbianas de la cuenca del río Cutuchi utilizando *metabarcoding 16S rRNA* e indicadores microbianos tradicionales.

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

AUTOR: Jennifer Lissette Medina Pacheco

TUTOR: William Ricardo Calero Cáceres, PhD.

Ambato - Ecuador

Marzo - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 10 de Febrero del 2023

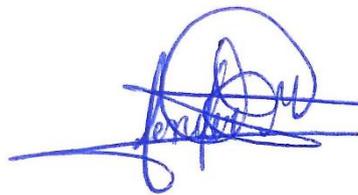
PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 1714344885-9

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jennifer Lissette Medina Pacheco, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Jennifer Lissette Medina Pacheco

C.I. 180435816-4

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

Presidente del Tribunal

Dr. Mario Daniel García Solís

C.I. 110360547-1

Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

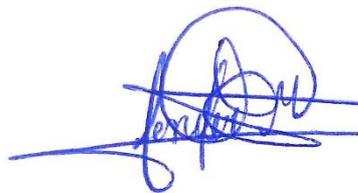
C.I. 180425690-5

Ambato, 7 de Marzo del 2023

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este presente Informe Final de Integración Curricular o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de la Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de éste, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Jennifer Lissette Medina Pacheco

C.I. 180435816-4

AUTOR

DEDICATORIA

A Dios, a la Virgen María y a San José, quienes son mi todo.

A mis padres, Patricio y Sandra, quienes, con su ejemplo, me han enseñado a luchar por mis sueños; gracias por su continuo sacrificio y su entrega total a mí.

A mi hermano Alexander, a mis primos Henry, Gabriel y Diego, y a mis tíos German, Mary, Jofre, Marce y Ligia, por su cariño y apoyo incondicional, gracias por estar conmigo.

A toda mi familia, porque gracias a sus oraciones y palabras, hacen de mí una mejor persona

Finalmente quiero dedicar esta investigación a mis amigos y amigas, por ser mi apoyo en todos los momentos. ¡Los llevaré siempre en mi corazón!

Jennifer Medina

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, a la Virgen María “Nuestra Señora de la Elevación” y a San José, quienes, con su amor, dan sentido a mi vida.

Expreso también mi gratitud a las siguientes personas, quienes han sido mi soporte para la culminación del siguiente proyecto de investigación:

A mis padres, tíos, primos y hermano, quienes han sido mi mano derecha, mis fieles amigos y compañeros de aventuras.

A mi tutor académico, Dr. William Calero, quien ha depositado en mí su confianza y ha sido mi guía y camino durante la realización de esta investigación.

A mis amigas y amigos: Mela S., Cris D., Taty, Faby, Pauli, Katy, Ana, Danny, Rosita, Pato, Cris V., Liss, Gaby J. y Gaby L. por regalarme de su tiempo, amor, aprecio e incondicional amistad. ¡Estarán siempre en mis oraciones!

ÍNDICE DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO 1.....	14
MARCO TEÓRICO.....	14
1.1. Antecedentes investigativos	14
1.1.1. Generalidades	14
1.1.2. Indicadores de contaminación fecal en agua.....	17
1.1.2.1. Coliformes	17
1.1.2.2. <i>Escherichia coli</i>	19
1.1.2.3. Aerobios totales (heterótrofos aerobios mesofílicos totales)	20
1.1.4. Metagenómica	23
1.1.4.1. <i>Metabarcoding de ADN</i>	24
1.1.4.2. Técnica de secuenciación Illumina	26
1.2. Objetivos	27
1.2.1. Objetivo General.....	27
1.2.2. Objetivos Específicos.....	27
CAPÍTULO 2.....	28
METODOLOGÍA.....	28

2.1.	Materiales	28
2.2.	Métodos.....	32
2.2.1.	Muestreo y transporte.....	32
2.2.2.	Filtración	33
2.2.3.	Protocolo de Extracción de ADN.....	34
2.2.4.	<i>Metabarcoding 16S rRNA</i>	34
2.2.5.	Análisis bioinformático	34
2.2.6.	Enumeración bacteriana	35
2.2.6.1.	Coliformes totales y <i>E. coli</i>	35
2.2.6.2.	Aerobios totales	37
2.2.6.3.	Colifagos somáticos	37
2.2.7.	Análisis estadístico	39
	CAPÍTULO 3.....	40
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1.	Abundancia Relativa de Indicadores de Contaminación Fecal mediante conteo en placa.....	40
3.2.	Abundancia relativa mediante <i>Metabarcoding 16S rRNA</i>	46
3.2.1.	Filo	46
3.2.2.	Especie.....	50
3.3.	<i>Metabarcoding 16S rRNA</i> y Técnicas de Cultivo	53
	CAPÍTULO 4.....	57
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
4.1.	Conclusiones	57
4.2.	Recomendaciones	58
	C. MATERIALES DE REFERENCIA.....	59
	Referencias Bibliográficas	59

ANEXOS.....	77
Análisis de varianza.....	83
Pruebas Unifrac ponderada y no ponderada	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación de los Coliformes Totales	18
Figura 2 Vías de infección de los colifagos somáticos y bacteriófagos F-específicos	22
Figura 3 Regiones variables y conservadas del <i>ARN Ribosomal 16S</i>	25
Figura 4 Ubicación geográfica de los puntos de recolección estudiados	33
Figura 5 Protocolo de siembra y cuantificación en placa de Coliformes y <i>E. coli</i> ...	36
Figura 6 Protocolo de siembra de bacteriófagos somáticos	38
Figura 7 Heatmap de la abundancia relativa de conteo en placa. Los valores detallados corresponden al promedio de la cuantificación microbiana expresados como \log_{10} UFC/100 mL y \log_{10} UFC/100 mL para fagos somáticos. Los valores detallados entre paréntesis () representan la desviación estándar de los datos obtenidos.....	41
Figura 8 Abundancia relativa de los puntos muestreados mediante conteo en placa	45
Figura 9 Abundancia relativa a nivel de filogenia obtenida mediante <i>metabarcoding 16S rRNA</i>	48
Figura 10 Heatmap de abundancia relativa a nivel de especie obtenida mediante <i>metabarcoding 16S rRNA</i>	52
Figura 11 Heatmap de los géneros indicadores de contaminación fecal tradicional obtenidos mediante <i>metabarcoding 16S rRNA</i>	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Criterio de evaluación de la calidad de aguas dulces frías o calientes	19
---	----

Tabla 2 Concentración de bacteriófagos en diferentes muestras fecales y aguas residuales	23
Tabla 3 Equipos de Laboratorio empleados	28
Tabla 4 Materiales de laboratorio empleados	29
Tabla 5 Reactivos de laboratorio empleados	30
Tabla 6 Insumos y materiales de escritorio empleados.....	31
Tabla 7 Codificación y distribución de los puntos de recolección.....	32
Tabla 8 Índices de diversidad en los puntos muestreados.....	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Concentración (UFC/100mL) de los indicadores microbianos de contaminación fecal obtenidos en los muestreos realizados	77
Anexo 2 Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Cotopaxi	79
Anexo 3 Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Lasso	79
Anexo 4 Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Latacunga 1	80
Anexo 5 Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Latacunga 2.....	80
Anexo 6 Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Salcedo	81
Anexo 7 Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Las Viñas	81
Anexo 8 Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Patate	82
Anexo 9 Cultivo de los indicadores microbianos fecales del punto Las Viñas. A) Medio Chromocult. B) Medio PCA.....	82
Anexo 10 Tabla de los valores obtenidos de la prueba Unifrac ponderada (WSig). 85	
Anexo 11 Tabla de los valores obtenidos de la prueba Unifrac no ponderada (UWSig)	86

RESUMEN

El agua es un recurso natural imprescindible para la vida, desarrollo humano y conservación de la biodiversidad. En el Ecuador, el 83 por ciento de la población tiene acceso a agua potable, y en zonas rurales únicamente el 53,9 por ciento. Por la dificultad de obtener este recurso, gran parte de esta población opta por agua de ríos para actividades domésticas, desencadenando enfermedades gastrointestinales. En este contexto, las aguas del río Cutuchi son usadas en actividades agrícolas, sin embargo, han presentado niveles preocupantes de polución por la descarga de aguas domésticas e industriales sin tratar. De tal forma que, el presente estudio se basó en el monitoreo de las comunidades microbianas del río Cutuchi utilizando *metabarcoding 16S rRNA* e indicadores microbianos tradicionales. La línea de investigación corresponde a Microbiología y Biotecnología. Los resultados obtenidos evidenciaron que, en seis de los siete puntos muestreados las densidades fueron superiores a 4 log₁₀ UFC·100 mL a la - 1 para coliformes totales, *E. coli* y colifagos somáticos. Se detectó una alta concentración de indicadores fecales resistentes a tetraciclina y ceftriaxona. *Metabarcoding 16S rRNA* clasificó la abundancia microbiana en 9 filos y 36 especies bacterianas principales. Los valores obtenidos detallan la presencia de bacterias fecales propias del tracto gastrointestinal de los humanos y animales, revelando una degradación en la calidad del agua del río Cutuchi. Este estudio podría utilizarse como línea base para la evaluación de la eficiencia de las plantas de tratamiento, desde un punto de vista de poblaciones microbianas en aguas impactadas por descargas residuales.

Palabras clave: *metabarcoding 16S rRNA*, conteo en placa, indicadores fecales, río Cutuchi, aguas residuales, gestión ambiental y contaminación ambiental.

ABSTRACT

Water is an essential natural resource for life, human development and biodiversity conservation. In Ecuador, 83 percent of the population has access to drinking water, and in rural areas only 53.9 percent. Due to the difficulty of obtaining this resource, a large part of this population opts for river water for domestic activities, triggering gastrointestinal diseases. In this context, Cutuchi river are used in agricultural activities, however, they have presented worrying levels of pollution due to the discharge of untreated domestic and industrial water. In such a way that, the present study was based on the monitoring of the microbial communities of the Cutuchi river using 16S rRNA metabarcoding and traditional microbial indicators. The research line corresponds to Microbiology and Biotechnology. The results obtained showed that, in six of the seven points sampled, the densities were higher than $4 \log_{10} \text{CFU} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ for total coliforms, *E. coli* and somatic coliphages. A high concentration of fecal indicators resistant to tetracycline and ceftriaxone was detected. Metabarcoding 16S rRNA classified the microbial abundance into 9 phyla and 36 major bacterial species. The values obtained detail the presence of fecal bacteria typical of the gastrointestinal tract of humans and animals, revealing a degradation in the water quality of the Cutuchi river. This study could be used as a baseline for the evaluation of the efficiency of the treatment plants, from the point of view of microbial populations in waters impacted by residual discharges.

Key words: *metabarcoding 16S rRNA*, plate count, fecal indicators, Cutuchi river, wastewater.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Generalidades

El agua es un recurso natural imprescindible para la vida, el desarrollo humano y conservación de la biodiversidad del planeta. Pese a que un alto porcentaje (69%) de agua dulce se concentra en los polos norte y sur, un considerable 30% se ubica en acuíferos profundos, solo un 1% recorre las cuencas hidrográficas del mundo, siendo este porcentaje de consumo humano y animal (**Reid et al., 2019**). Como respuesta a la importancia de estos afluentes, en el año 2000, líderes de 189 países firmaron la Declaración del Milenio, documento que compila 8 Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM) cuantificables; entre los cuales, destaca el garantizar la sostenibilidad del medio ambiente (**ONU, 2018**). No obstante, para el 2015, el progreso cumplido con los ODM fue sustancial, pero con logros desiguales en ciertos objetivos, provocando que para el 2016, se sustituyan por la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, teniendo a su favor el apoyo de 193 Estados (**PNUMA, 2022**). Dentro de esta agenda, se establecen 17 objetivos, de los cuales 8 se relacionan con la calidad del agua, sin embargo, el objetivo 6 “Agua Limpia y Saneamiento” se enfoca en alcanzar recursos hídricos libres de impurezas, disponibilidad y saneamiento (**ONU, 2021**).

El aseguramiento de la calidad del agua es uno de los grandes retos que la sociedad debe enfrentar en el siglo XXI, debido a que, la contaminación de afluentes atenta contra la salud humana, limita la producción de alimentos, impacta en el equilibrio de los ecosistemas y obstaculiza el crecimiento económico (**UNESCO, 2022**). La degradación de la calidad del agua se traduce directamente en problemas ambientales,

sociales y económicos, ocasionando que la disponibilidad de los escasos recursos hídricos del mundo sea cada vez más limitada por el empeoramiento de la contaminación de los cuerpos de agua dulce causada por el desecho de aguas residuales sin tratar o sistemas de tratamiento (PTAR) insuficientes (ONU, 2021). Además, existen contaminantes emergentes, como productos de cuidado personal y farmacéuticos, pesticidas, químicos industriales y el cambio climático, los cuales representan un nuevo desafío para la calidad del agua, con impactos a largo plazo aún desconocidos en la salud humana y los ecosistemas (WWF, 2022).

Reportes publicados por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), el Fondo de las Naciones Unidas para la infancia (UNICEF) y la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) evidencian que alrededor de 2.400 millones de personas no cuentan con ningún tipo de servicio higiénico básico, ocasionando que esta falta de saneamiento sea una de las formas de mayor incidencia en la contaminación del agua (ONU, 2021); causando que, alrededor del 90% de las aguas residuales en países subdesarrollados sean decantadas de forma directa sin un tratamiento previo en ríos, lagos, acuíferos y aguas costeras (UNESCO, 2022). Lo anterior mencionado provoca la diseminación potencial de numerosas enfermedades altamente letales, dado que, alrededor del mundo aproximadamente 2.000 millones de personas consuman agua contaminada con materia fecal (ONU, 2022).

Por otro lado, a nivel mundial la Organización Mundial de la Salud (OMS) registra que el 24 % de la carga de morbilidad y el 23 % de todas las defunciones son atribuidas a factores ambientales (OPS, 2022); y dentro de estos, el consumo de agua contaminada por desechos humanos, animales y químicos o por saneamiento insuficiente es el causante de 842.000 muertes al año, siendo representado por un 35 % correspondiente a muertes de niños menores a 5 años de edad afectados por infección gastrointestinales y el porcentaje restante a jóvenes, adultos y adultos mayores (OMS, 2022). A nivel regional, América Latina, representa el 8 % de la población total del mundo y alberga alrededor del 30 % de las fuentes de agua dulce, sin embargo, de este porcentaje, al menos el 40 % del agua para consumo y uso

humano queda sin tratar (**WWF, 2022**). Por lo que, la baja calidad de los recursos hídricos ha generado una crisis sanitaria y ambiental en las últimas décadas, provocando alrededor de 100.000 descensos, donde, 1 de cada 5 niños mueren por afecciones asociadas a consumo de este recurso (**Yassi et al., 2002**). En este contexto, entre los países con niveles de contaminación hídrica más preocupantes, se encuentran: Colombia, México, Brasil, Perú, Argentina y Ecuador (**Banco Mundial, 2015**).

En el Ecuador, los recursos hídricos son factores determinantes para el desarrollo sostenible; sin embargo, en las últimas décadas, se ha evidenciado su contaminación con microorganismos potencialmente patógenos para la salud humana y animal (**Boretti & Rosa, 2019**). En el país, solo el 83 % de la población tiene acceso a agua potable (**INEC, 2017**); aunque, esta no cumpla con los estándares para ser considerada agua de consumo humano. En las regiones rurales, únicamente el 53,9 % de la población tiene acceso a este recurso. No obstante, por la dificultad para obtener agua bebible, gran parte de esta población opta por usar agua de ríos para diferentes actividades domésticas, lo que en el 2015 desencadenó que alrededor de 28,787 personas llegasen a padecer diarreas y gastroenteritis de origen infeccioso (**Vinueza et al., 2021**).

Entre los ríos con mayor contaminación a nivel nacional se encuentran: Guayas, Machángara, Guayllabamba, Zamora y Esmeraldas; según estudios fisicoquímicos y bacterianos (**Vinueza et al., 2021**). Mientras que, ríos como el Napo y Cutuchi a pesar de no poseer los mismos niveles de contaminación que los anteriores han mostrado niveles preocupantes de polución en sus afluentes (**Zapata et al., 2021**). La cuenca del río Cutuchi se extiende sobre el valle Interandino al norte del volcán Cotopaxi y sus vertientes fluyen a través de las provincias Cotopaxi y Tungurahua; siendo empleadas, como agua de riego en los cultivos de esas zonas, las cuales abastecen de alimento a las principales ciudades del Ecuador (**Calero-Cáceres, Tadesse, et al., 2022**). A pesar del papel que desempeñan las aguas del río Cutuchi en las actividades agrícolas del país, estas reciben descargas domésticas e industriales sin tratar, las cuales rondan los 30.000 m³/día, representando un 3,6 % de su caudal promedio del río (**Calero-**

Cáceres, Tadesse, et al., 2022). De esta problemática se destaca el hecho de que este afluyente recibe al menos 1,8 toneladas de basura por día y las aguas residuales de 88 empresas relacionadas con agricultura (57 %), industrias (16 %), petróleo (23 %) y otras actividades (4 %) (**GAD Latacunga, 2014**).

1.1.2. Indicadores de contaminación fecal en agua

Desde el punto de vista de salud humana, la gestión de los recursos hídricos es la herramienta comúnmente usada para el control de la calidad y evaluación del nivel de contaminación fecal del agua, siendo esta, una de las principales fuentes de contaminación, la cual se origina por el desecho de residuos fecales humanos y animales (**Devane et al., 2022**). Estos restos son portadores de una alta carga microbiana y vírica; y su variación es estimada mediante la aplicación de ciertos parámetros físicos, químicos y biológicos (**Hurst et al., 2022**).

Dentro de los parámetros biológicos, la detección y cuantificación de la carga microbiana se realiza mediante métodos de cultivo en placa, para lo que, se emplea microorganismos indicadores como Coliformes, *E. coli*, aerobios totales y bacteriófagos (**Hussain, 2019**).

1.1.2.1. Coliformes

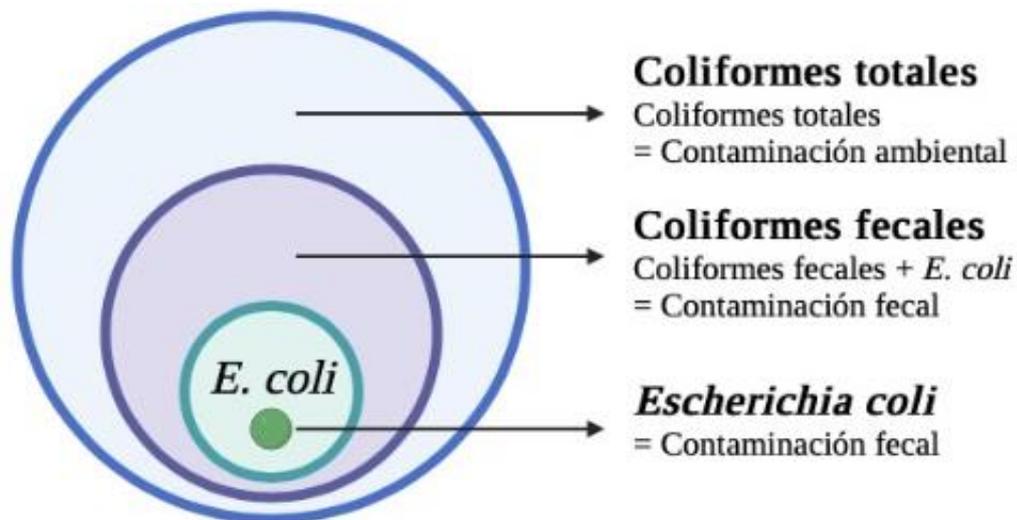
Los Coliformes conforman un grupo de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, que incluye a todos los bacilos anaerobios facultativos gramnegativos no formadoras de esporas con forma de bastón, los cuales fermentan lactosa con producción de gas en una temperatura de incubación de 35°C a 37°C (**Santo Domingo et al., 2019**); abarcando bacterias pertenecientes a géneros de *Escherichia Klebsiella, Enterobacter* y *Citrobacter* (**Srikullabutr et al., 2021**). A

pesar de que los coliformes no sean responsables de enfermedades crónicas, estos microorganismos están presentes en diferentes ambientes como en la vegetación, suelo, agua y en el tracto intestinal de animales de sangre caliente y humanos (Nappier et al., 2020), siendo utilizados como indicadores para la detección de contaminantes medioambientales en industrias alimentarias o en recursos hídricos (Bridle et al., 2021).

Dentro del grupo Coliforme se identifican tres diferentes grupos de bacterias, coliformes totales, coliformes fecales termotolerantes y *Escherichia coli* (Khan & Gupta, 2020). Los Coliformes totales son usados como un indicador general de las condiciones sanitarias de una muestra, ya que por su ubicuidad en el medio ambiente no se puede emplear como indicador fecal, es así que son aplicadas para la evaluación de la calidad de agua potable o subterránea (Hartinger et al., 2021). Mientras que, los coliformes fecales (termotolerantes) son un subgrupo de los coliformes con la capacidad de crecer a 44,5°C por 24 h y habitar en las heces humanas y animales; constituyéndose de forma particular por *Klebsiella* spp. y *E. coli*, siendo esta la bacteria la más abundante en los excrementos (An et al., 2020).

Figura 1

Clasificación de los Coliformes Totales



Adaptado de Niyoyitungiye et al. (2020)

En el Ecuador, el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA) detalla los criterios de calidad aceptables para la conservación de vida acuática en aguas dulces frías o calientes, así como aguas marinas y estuarios. En el libro VI, Anexo 1, Tabla 3 se visualiza el límite máximo permisible de coliformes fecales de 200 NMP/100 mL y coliformes totales 2000 NMP/100 mL (Tabla 1) (TULSMA, 2017). A nivel internacional, los entes reguladores pueden ser más estrictos en niveles máximos permisibles de contaminantes bacterianos como en el caso de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) que solo permite 400 NMP/100 mL de coliformes totales, siendo una quinta parte de lo tolerado en la regulación ecuatoriana; de igual forma la Agencia Europea de Medio Ambiente (EEA), traduciendo la concentración de coliformes totales a la mitad en comparación de la norma ecuatoriana. Esto permite visualizar la exigencia de altos estándares de calidad del agua en países externos mientras que en Latinoamérica y Ecuador las débiles regulaciones no han permitido disminuir los niveles de contaminación a indicadores aceptables (EEA, 2016; EPA, 2022).

Tabla 1

Criterio de evaluación de la calidad de aguas dulces frías o calientes

	Límite Máximo Permisible (UFC/100 mL)	
	Coliformes Fecales	Coliformes Totales
TULSMA	200	2000
EPA	200	400
EEA	100	500

Adaptado de EEA (2016); EPA (2022); TULSMA, (2017)

1.1.2.2. *Escherichia coli*

E. coli forma parte de las bacterias termotolerantes de los coliformes, pero se diferencia de este grupo por la producción de la enzima β -glucuronidasa (Bridle et al., 2021). Forma parte de la microbiota gastrointestinal y heces de los humanos y

animales de sangre caliente (Mellahi et al., 2021). A pesar de que la mayoría de las cepas de *E. coli* no son consideradas como patógenas, cuando se ingieren, pueden causar infecciones en el tracto estomacal del huésped inmunocomprometido, produciendo síntomas como náuseas, vómito, diarrea y fiebre (Price et al., 2017).

Además, *E. coli* es empleada como una herramienta para el monitoreo de la calidad del agua y el nivel de contaminación fecal en cualquier muestra medio ambiental (Dagher et al., 2021), y por su facilidad de cultivo en el laboratorio la mayoría de los países han adoptado el uso de esta bacteria y de coliformes termotolerantes para evaluar la presencia de microorganismos potencialmente patógenos en alimentos y recursos hídricos (Calderón et al., 2022).

1.1.2.3. Aerobios totales (heterótrofos aerobios mesofílicos totales)

Los microorganismos heterótrofos aerobios mesófilos se definen como aquellos que utilizan nutrientes orgánicos como fuente de carbono y energía, tienen la capacidad de desarrollarse en presencia de oxígeno, el cual pueden utilizar estricta o facultativamente en sus procesos metabólicos para la obtención de energía, así como de crecer en un rango de temperaturas entre 20°C y 45 °C (Silva et al., 2019). Sin embargo, es necesario considerar que solo una pequeña fracción (menos del 1 %) de las bacterias en entornos acuáticos puede medirse mediante métodos dependientes del cultivo; una gran proporción de bacterias se encuentran en un estado viable pero no cultivable (VBNC) (Lin et al., 2020). Entre los géneros de bacterias que cumplen con esta característica se encuentran una gran cantidad de microorganismos Gram positivos y negativos, entre los que destacan las siguientes especies: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y algunas especies de Enterobacterias (Salazar-Llorente et al., 2021).

La identificación de microorganismos aerobios totales en aguas residuales funciona como un indicador de la calidad de conservación del afluente como también de la eficiencia del sistema de tratamiento enfocado en la eliminación de bacterias o para considerar la potabilidad del agua (**Oliver et al., 2021; Wang et al., 2015**), esto debido a que este análisis permite la estimación de la cantidad de microorganismos totales existente en una muestra. Sin embargo, su presencia no debe ser considerada necesariamente como motivo de preocupación por la presencia de agentes microbianos patógenos, debido a que para asegurar esto último es indispensable la aplicación de ensayos complementarios de detección específica (**Mellahi et al., 2021**).

1.1.3. Bacteriófagos como indicadores virales de contaminación fecal

Los microorganismos indicadores clásicos para el monitoreo continuo de los recursos hídricos son los coliformes fecales y *E.coli* (**Holcomb & Stewart, 2020**). Sin embargo, en las últimas décadas, los bacteriófagos han sido sugeridos como indicadores potenciales de virus entéricos y muchos estudios han demostrado su potencial (**Toribio-Avedillo et al., 2021**). Los fagos comparten algunas características estructurales con los virus entéricos, reflejado de mejor manera el comportamiento y la resistencia al proceso de tratamiento de los virus que los indicadores bacterianos (**Kapoor et al., 2021; Momba et al., 2019**). Otra característica valiosa de estos virus es su sencilla y económica técnica de detección, la cual produce resultados óptimos en un periodo de tiempo relativamente corto; además los fagos no constituyen un riesgo para la salud de los operadores (**Martín-Díaz et al., 2020**).

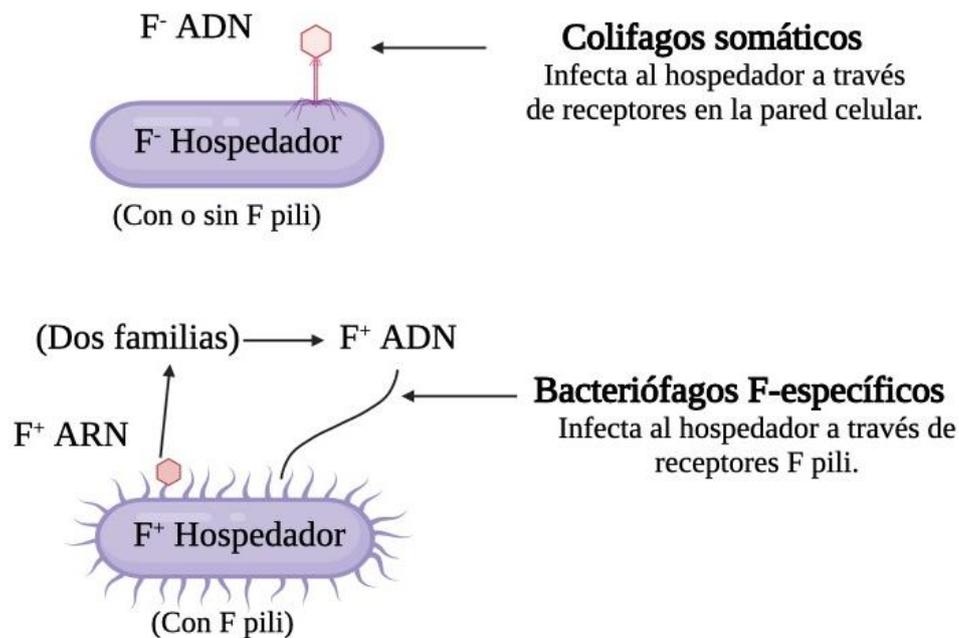
Los bacteriófagos son virus de organismos procariotas que pueden ser encontrados en casi todos los lugares donde existan bacterias, siendo así los de mayor abundancia a nivel global (**Dion et al., 2020**). Estos virus pueden afectar a un amplio rango de bacterias o a su vez ser muy específico, estas variaciones están dadas por los diferentes receptores expresados en la superficie celular del huésped, los cuales pueden ser proteínas de la membrana celular, lipopolisacáridos, ácidos teicoicos, flagelos o pili

(Wan et al., 2021). Existen tres grupos de bacteriófagos; colifagos somáticos, bacteriófagos F-específicos y bacteriófagos que infecta a *Bacteroides* (Dennehy & Abedon, 2021).

Los colifagos somáticos habitan de forma usual en aguas residuales humanas e infectan de forma particular a *E. coli* y a otras bacterias coliformes del tracto gastrointestinal a través de su pared celular (Elbahnasawy et al., 2021). La unión e infección mediante el receptor ubicado en la superficie externa de la célula de *E. coli* confieren el nombre de “colifagos somáticos”. Los bacteriófagos F-específicos se destacan por la unión e infección al huésped bacteriano a través del pili (Toribio-Avedillo et al., 2019). El pili un tipo de apéndice presente en la superficie de las cepas masculinas bacterianas, mientras que, el factor F es una secuencia de ADN o plásmido que confiere a la bacteria la capacidad de producir un pili sexual empleada para la conjugación con otras bacterias (Hyman & Abedon, 2012).

Figura 2

Vías de infección de los colifagos somáticos y bacteriófagos F-específicos



Adaptado de Jofre et al. (2011)

Los colifagos somáticos son aisladas de las heces de los humanos y animales, exhibiendo concentraciones entre 10^2 y 10^8 PFU/g (Pascual-Benito et al., 2022); mientras que, en aguas residuales 10^3 - 10^7 PFU/mL. En este tipo de afluentes, mediante el correcto tratamiento de agua, se inactivan los fagos somáticos, sin embargo, se ha reportado la presencia de ciertos virones presentes en este tipo de aguas (Tabla 2) (Blanch et al., 2020).

Tabla 2

Concentración de bacteriófagos en diferentes muestras fecales y aguas residuales

Muestra		Somáticos (UFP/g)	F-específico (UFP/mL)	Bacteriófagos de <i>Bacteroides</i> (UFP/g o 100 mL)
Material fecal	Humano	$<1 - 7,3 \times 10^5$	$<1 - 1 \times 10^4$	$<1 - 1 \times 10^4$
	Animal	$<1 - 1 \times 10^8$	$<1 - 1,2 \times 10^6$	
Agua residual	Sin tratamiento	$10^3 - 10^7$	$10^4 - 10^6$	$10^4 - 10^5$
	Con tratamiento	$10^3 - 10^5$	$10^2 - 10^4$	$5 \times 10^1 - 10^4$

Adaptado de Jebri et al. (2017)

1.1.4. Metagenómica

La metagenómica se basa en el estudio de los genomas de una población de microorganismos tomada directamente del ambiente, la cual no necesita ser aislada o cultivada mediante técnicas de cultivo, dando lugar al descubrimiento de una desconocida diversidad microbiana en suelos, aguas, muestras intestinales de invertebrados y vertebrados (Chu et al., 2018); y con ello a la creación de librerías de datos que pueden ser utilizados en referencia a las aproximaciones funcionales o por sus secuencias de ADN (G. Chen et al., 2022).

1.1.4.1. Metabarcoding de ADN

Para el análisis de comunidades microbianas se emplean técnicas metagenómicas, clasificándose en dos; amplicón dirigido, el cual se enfoca en uno o varios genes marcadores que exponen la composición y diversidad del microbiota (*metabarcoding de ADN*); y la metagenómica *shotgun* (Salleh et al., 2022). *Metabarcoding de ADN* se basa en la amplificación por PCR de genes marcadores taxonómicos, conocidos como códigos de barras de ADN, que poseen una longitud entre 100 a 600 pb (Francioli et al., 2021); además, son lo suficientemente variables para la identificación taxonómica profunda, y a la vez, estén flanqueados por regiones conservadas para cubrir la gama de taxones, por lo que, la combinación de la secuenciación de alto rendimiento (HTS) con código de barras se conoce como “*DNA metabarcode*” (Bukin et al., 2019).

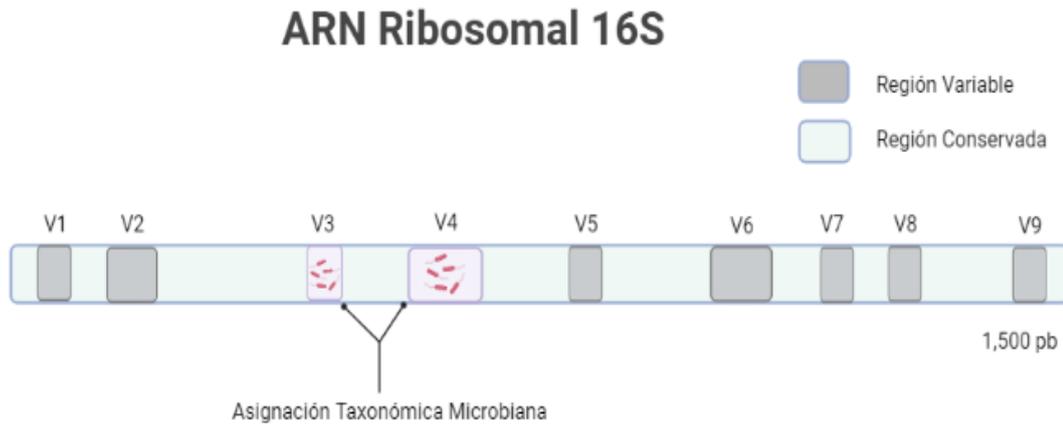
La longitud relativamente pequeña de los marcadores no siempre permite la identificación a nivel de especie, de modo que, se usan enfoques alternativos como la metagenómica unicelular o el aislamiento mediante cultivo, para así discriminar las especies microbianas (Balzan et al., 2020). A pesar de esta condición, *metabarcoding de ADN* se ha considerado como un método rentable, repetible y eficaz para evaluar la biodiversidad de las comunidades microbianas, así como su abundancia en el medioambiente (Haidău et al., 2022). Los elementos que han sido empleados como genes marcadores son las subunidades de proteína ribosómica, subunidades ARN polimerasa y los factores de elongación. Por consecuencia, se efectúa la secuenciación filogénica de los amplicones dirigidos, para bacteria y *Archaea* se utiliza la subunidad ribosomal *16S rRNA*; mientras que, para eucariotas el *18S rRNA*, y hongos las regiones espaciador transcrito ribosomal (ITS) (Francioli et al., 2021).

El gen ribosomal *16S rRNA* se encuentra en todos los organismos y está constituido por nueve regiones hipervariables flanqueadas por regiones conservadas; siendo estas específicas a nivel de género y especie (Bukin et al., 2019). Por lo que, es considerado

como un óptimo marcador molecular en la identificación a nivel de especie de las poblaciones microbianas presentes en diferentes muestras (Salleh et al., 2022).

Figura 3

Regiones variables y conservadas del ARN Ribosomal 16S



Adaptado de Park et al. (2021)

Para estudios de los microorganismos del tracto gastrointestinal se han cubiertos regiones como V1, V2, V3, V4, V8, V9, V1-V3, V3-V4, V4-V5, V6-V7 del *16S rRNA*; sin embargo, las regiones V1-V3 y V1-V4 se realizan en bacterias (Zemb et al., 2020). Las regiones V3-V4 muestran dos ventajas en la asignación taxonómica microbiana, exponen una mayor heterogeneidad de nucleótidos, lo que permite obtener una mayor resolución para diferenciar entre especies microbianas debido a su gran variabilidad (Onywera & Meiring, 2020); además de que poseen un gran número de secuencias referentes a las regiones hipervariables en la base de datos, simplificando la asignación taxonómica (Bukin et al., 2019).

1.1.4.2. Técnica de secuenciación Illumina

Para *metabarcoding ADN* se ha empleado secuenciación de próxima generación, de la cual se destaca Illumina por el impacto que ha generado en la ecología microbiana, abarcando hasta el 90% de los datos generados a nivel global, gracias a su nivel de precisión y rendimiento en comparación con otras técnicas como la pirosecuenciación 454 y su bajo costo de aplicación (**Ma et al., 2015; Nelson et al., 2014; Valentini et al., 2016**). Illumina se basa en la preparación de librerías, generación de clústeres, secuenciación mediante nucleótidos marcados con fluoróforos y el análisis de las secuencias generadas (reads), lo cual ha ayudado en la evaluación de comunidades microbianas, dado que se genera una correlación entre microorganismos con los diferentes factores ambientales; cuando se trabaja con muestras de aguas (**Francioli et al., 2021; Yan et al., 2021**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Monitorear las comunidades microbianas de la cuenca del río Cutuchi utilizando *metabarcoding 16S rRNA* e indicadores microbianos tradicionales.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar indicadores microbiológicos de contaminación fecal tradicionales por técnicas basadas en cultivo.
- Analizar las secuencias de *metabarcoding 16S rRNA* utilizando herramientas bioinformáticas.
- Contrastar los niveles de contaminación biológica por técnicas basadas en cultivo y las abundancias de los taxones microbianos detectadas por *metabarcoding*.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Tabla 3

Equipos de Laboratorio empleados

EQUIPOS	CANTIDAD
Balanza analítica	1
Autoclave	1
Cabina de flujo Laminar Bioseguridad 2	1
Estufa +5°C – 120°C	1
Nevera (4°C)	1
Mechero Bunsen	1
Congelador (-20°C)	1
Ultracongeladora	1
Incubadora	1
Vortex	1
Baño María	1
Microcentrífuga	1
Potenciómetro	1
Microondas	1
Turbidímetro	1
Bomba al vacío	1
Sistema de filtración	1

Tabla 4*Materiales de laboratorio empleados*

MATERIALES	CANTIDAD
Espátula	1
Frascos de tapa azul	8
Vaso de precipitación de 500 mL	3
Juego de micropipetas	1
Gradilla	1
Puntas de micropipetas	1
Tubos de microcentrífuga	500
Cajas mono Petri desechables	3000
Asa de inoculación	3
Asa de Digralsky	50
Tubos de ensayo con tapa	50
Viales de cropreservación	250
Pipetas 10 mL	5
Probeta 1000 mL	1
Pera de succión	2
Filtro Syringe Filters de 0,22 µm	100
Jeringuillas	100
Bandas pH	100
Termómetro	1

Tabla 5*Reactivos de laboratorio empleados*

REACTIVOS	CANTIDAD
Agar Plate Count	500 g
Agar Chromocult	500 g
Agar Mac Conkey	500 g
Caldo Luria Bertani	500 g
Ceftriaxona y tetraciclina	1 g
Peptona	500 g
Extracto de levadura	500 g
Cloruro Sódico	300 g
Extracto de carne	500 g
Buffer fosfato salino (PBS)	500 g
Carbonato Sódico	500 g
Cloruro de Magnesio	500 g
Cloruro de Calcio	500g
Agar-Agar	500 g
Agua bidestilada	5 L
Glicerol	1 L
Agua destilada estéril	5 L
Etanol al 96%	3 L
Alcohol al 70%	5L
Enzima proteinasa K	10 mL
QIAamp DNA Blood mini kit	1 unidad

Tabla 6*Insumos y materiales de escritorio empleados*

INSUMOS Y MATERIALES	CANTIDAD
Termo para transporte	1
Rotulador	1
Fundas Ziploc	25
Cofias	1
Frascos de orina	100
Guantes	3 cajas x 50 unidades
Mascarillas KN95	3 cajas x 50 unidades
Cinta testigo de esterilización	1 rollo
Papel aluminio	1 rollos
Cinta para etiquetar	1 rollo
Jabón líquido para platos	1
Jabón líquido	1
Gel antibacterial	1 frasco
Encendedor	1
Cloro	1 galón
Hojas de papel bond A4	500
Curitas para cerrar heridas	1 caja
Computadora	1
Impresora	1
Esferos	3 unidades
Cuaderno cosido	1
Regla	1
Ficha de muestras	40
Cámara fotográfica	1

2.2. Métodos

2.2.1. Muestreo y transporte

Para la recolección de muestras se realizaron según el protocolo detallado por la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2226:2013 (INEN, 2013). Se utilizó un recipiente de polietileno de alta densidad (balde), el cual fue sujetado con una cuerda e introducido en el río a una profundidad entre 10 – 20 cm desde la superficie. Se recolectó un volumen aproximado de 1000 mL en intervalos de 10 min y se transfirió a envases de análisis estériles. Para cada punto de muestreo (Tabla 7) se registraron observaciones como pH, temperatura de la muestra y del ambiente. Los envases con las muestras se guardaron en bolsas ziploc y éstas a su vez en una caja isotérmica, manteniendo una temperatura de 4°C hasta llegar al laboratorio.

Tabla 7

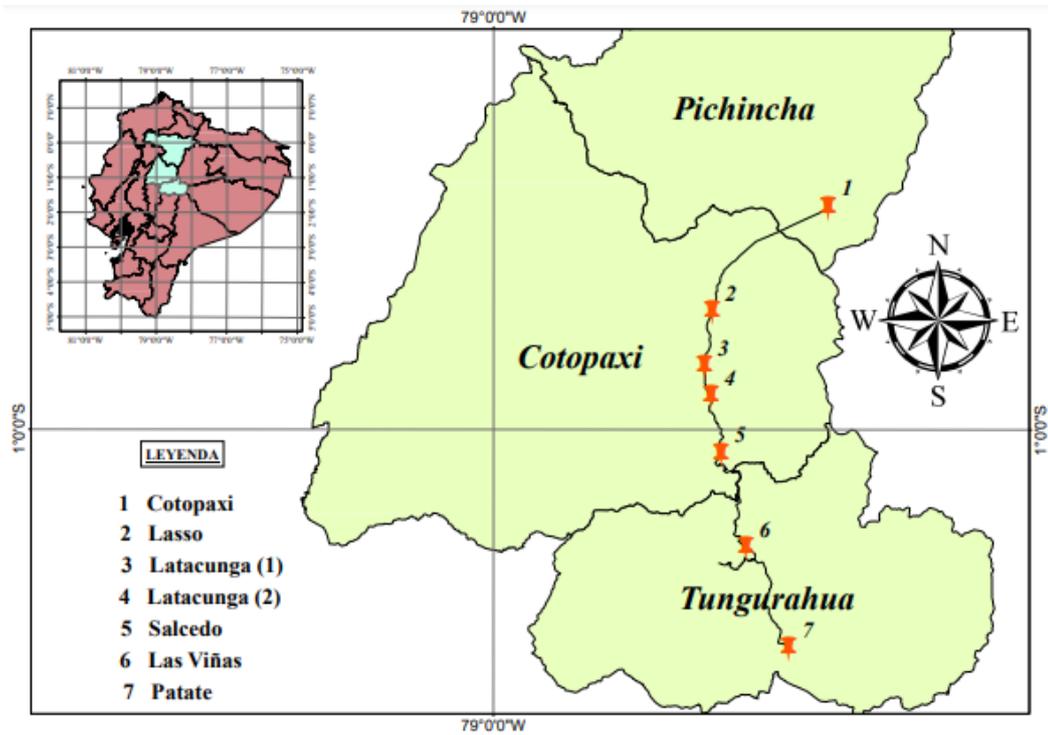
Codificación y distribución de los puntos de recolección

Número	Ubicación Geográfica	Codificación	Localidad	Cantón	Provincia
1	0°36'12.0"S 78°24'29.6"W	Cotopaxi	Parque Nacional Cotopaxi	Latacunga	Cotopaxi
2	0°47'31.0"S 78°36'48.1"W	Lasso	Parroquia Lasso	Latacunga	Cotopaxi
3	0°53'23.5"S 78°37'35.0"W	Latacunga 1	Centro de Rehabilitación Social	Latacunga	Cotopaxi
4	0°56'34.9"S 78°36'53.4"W	Latacunga 2	Parroquia Eloy Alfaro	Latacunga	Cotopaxi
5	1°02'42.3"S 78°35'49.2"W	Salcedo	Barrio Augusto Dávalos	Salcedo	Cotopaxi
6	1°06'01.8"S 78°36'58.1"W	Las Viñas	Puente San Vicente	Ambato	Tungurahua
7	1°20'46.1"S 78°30'08.1"W	Patate	Caserío la Merced	Patate	Tungurahua

Fuente: Autoría propia

Figura 4

Ubicación geográfica de los puntos de recolección estudiados



Fuente: Autoría propia

Nota: El 1er. lugar está localizado en el volcán Cotopaxi y es caracterizado por aguas limpias. El 2do. lugar se ubica en Lasso, cerca de Novacero. El 3ro se encuentra en la zona inicia de la ciudad de Latacunga con alta influencia de ciudadanos. El 4to. se halla en la zona cercana al Hospital IEES. El 5to. se centra en Salcedo, cercano a un camal de la ciudad. El 6to. se localiza en las Viñas, entre los cantones de Ambato y Píllaro. El 7mo. se halla entre el cantón Patate y Baños, zona terminal del río Cutuchi.

2.2.2. Filtración

Las muestras líquidas fueron prefiltradas mediante filtros de 45 μm de diámetro de poro, recuperando así la biomasa microbiana. El volumen a filtrar dependió de la densidad de las partículas presentes en el agua, cuyo rango varió entre 100 mL a 1000 mL. El filtró fue resuspendido en caldo LB y concentrado hasta un volumen de 500 μL para la posterior extracción de DNA (Calero-Cáceres et al., 2017).

2.2.3. Protocolo de Extracción de ADN

Para la extracción del ADN bacteriana de muestras líquidas se empleó el protocolo del kit comercial ZymoBIOMICS DNA kit a base de columnas para muestras de agua (ZymoBIOMICS, 2022).

2.2.4. Metabarcoding 16S rRNA

El servicio de amplificación, preparación de librerías, y secuenciación se contrató a la empresa Biosequence, y se basó en el flujograma propuesto por la empresa Illumina (Illumina, 2017). Se basó en la amplificación de la región V3-V4 del rRNA 16S (420 pb) con una profundidad de 20.000 x. Las secuencias crudas fueron depositadas en un Bioproject de la base de datos del NCBI para su posterior análisis.

2.2.5. Análisis bioinformático

El análisis de las secuencias se efectuó mediante el paquete Mothur 1.48.0, siguiendo el protocolo para secuencias generadas por la plataforma MiSeq (Kozich et al., 2013). Los diferentes archivos fastq obtenidos fueron ensamblados en contigs y filtrados mediante comandos Mothur con el objetivo de eliminar contigs que contengan errores de secuenciación, así como quimeras. En el caso de lecturas que no se lograron ensamblar los extremos, fueron eliminados en análisis posteriores (Sible et al., 2015).

Posterior a esto, las lecturas filtradas fueron comparadas con una copia de la base de datos SILVA para así determinar la taxonomía de cada lectura, con un umbral de corte (bootstrap) del 80% (Glöckner et al., 2017). Se empleó también el comando

cluster.split (taxlevel ¼ 4) para realizar el agrupamiento de OTU y finalmente, se creó archivos por lotes para agilizar el análisis (Sible et al., 2015).

2.2.6. Enumeración bacteriana

2.2.6.1. Coliformes totales y *E. coli*

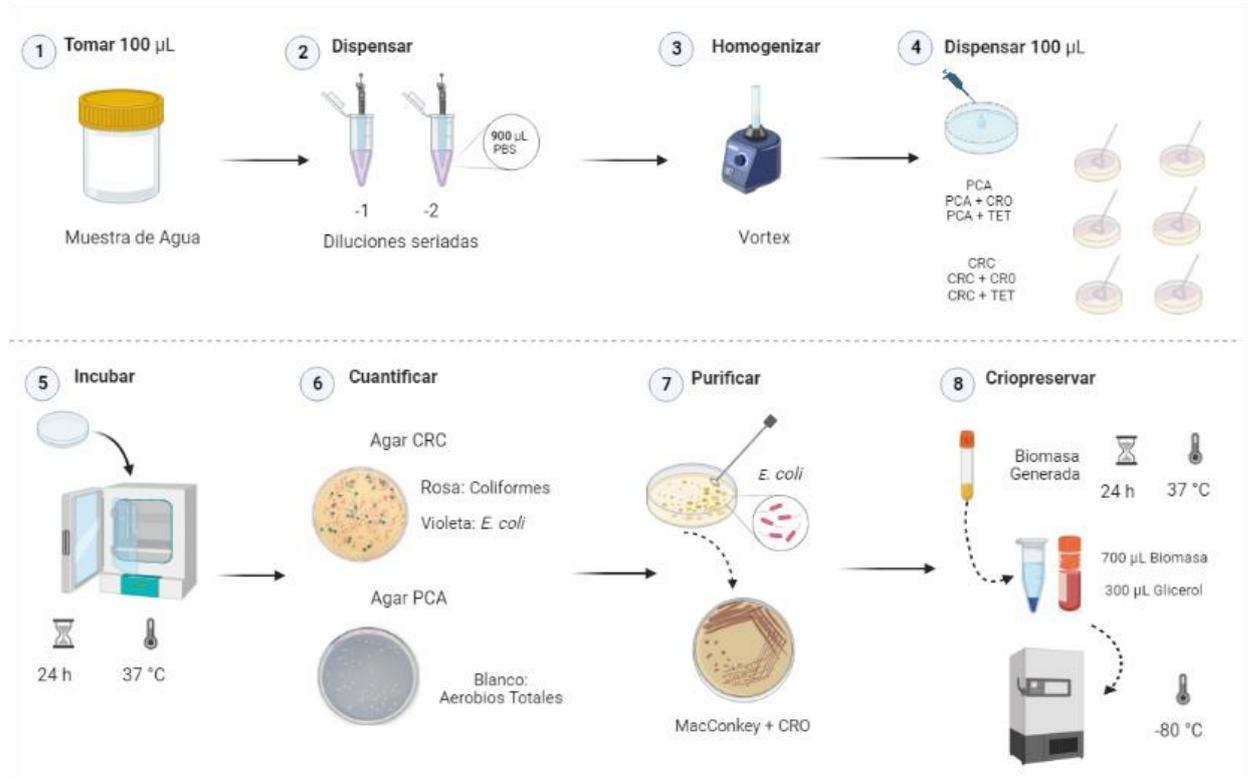
Para determinar la concentración de coliformes totales y *E. coli* se evaluó mediante el método ISO 9308:1-2014 (International Organization for Standardization, 2014). Para ello, se utilizó el agar Chromocult (CRC) en placas Petri.

Con las muestras recolectadas se preparó diluciones seriadas (1/10) en función de la carga estimada de microorganismos empleando PBS 1x. Una vez hecha la batería de diluciones, se realizó la siembra por extensión, para lo cual, se tomó 100 µL de la muestra diluida y se dispensó en Agar CRC suplementado con 5 µg/mL de ceftriaxona (CRO) y tetraciclina (TET) y no suplementado. Se llevó a incubación a 37°C por 24 h

La presencia de coliformes totales y *E. coli* se evaluó mediante el viraje de color de las colonias. El agar CRC cuenta con dos sustratos Salmon-GAL y X-glucurónido, los cuales son escindiros por las enzimas β-D-galactosidasa y a β-D-glucuronidasa. La primera enzima es característica de las bacterias coliformes, la cual escinde Salmon-GAL, ocasionando una tonalidad rojo asalmonado. *E. coli*, por su parte, cuenta con las dos enzimas descritas, mismas que rompen a los sustratos dando lugar a colonias de color azul oscuro y violeta. Las bacterias que toman una tonalidad incolora o turquesa son designadas como bacterias no coliformes (Merck Millipore, 2022). Los coliformes totales es el resultado de la sumatoria de los coliformes y *E. coli* detectados.

Figura 5

Protocolo de siembra y cuantificación en placa de Coliformes y E. coli



Fuente: Autoría propia

El recuento de colonias de *E. coli* y Coliformes totales se informaron como Unidades Formadoras de Colonia en 100 mL (UFC/100 mL). La ecuación que se empleó se detalla a continuación:

Ecuación 1

$$\frac{UFC}{100 \text{ mL}} = \frac{N \times F}{A} \times 100$$

Donde:

N = Número total de colonias contadas en caja

A = Volumen inoculado en mL

F = Factor de dilución

2.2.6.2. Aerobios totales

Para la determinación de la presencia de Aerobios totales de las muestras de agua se siguió el protocolo expuesto anteriormente respecto a la cuantificación de Coliformes totales y *E. coli*, sin embargo, se empleó el Agar Plate Count (PCA) en placas Petri y el método de filtración de membrana de acuerdo al método ISO 9308:1-2014 (**International Organization for Standardization, 2014**). Para el recuento de Aerobios totales se tuvo un mínimo de 30 colonias y un máximo de 300 colonias para la dilución seleccionada.

2.2.6.3. Colifagos somáticos

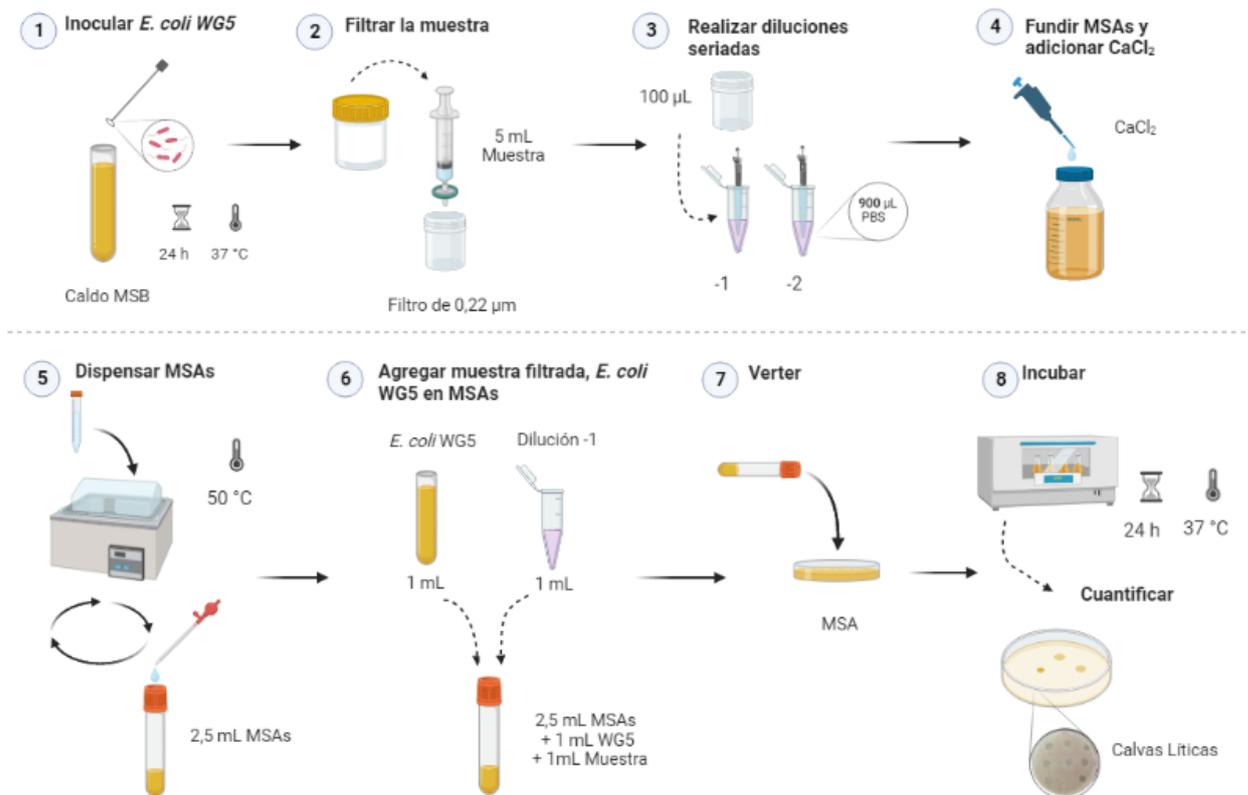
La metodología de aislamiento de bacteriófagos se basó en una adaptación de la norma de calidad del agua, detección y enumeración de colifagos, ISO 10705-3:2001 (**International Organization for Standardization, 2000**). Para lo cual, se utilizó caldo modificado de Scholten (MSB), agar de Sholten semisólido (MSAs) y agar modificado de Scholten (MSA).

Las muestras líquidas fueron previamente homogenizadas con PBS 1x en una dilución 1/10 mediante agitación vertical a 900 osc/min o magnética, a temperatura ambiente por 30 min. Las muestras se centrifugaron a 3000 g por 5 min y se recolectó el sobrenadante. Con filtros de baja absorción proteica de diámetro de 0,22 µm se filtraron las muestras y se procedió a realizar diluciones seriadas con PBS 1x. Posteriormente, se inoculó *E. coli* WG5 en MSB y se dejó en incubación a 37°C. Se fundió el MSAs y se adicionó cloruro de calcio (CaCl₂) (300 µL en 50 mL de MSAs). En tubos estériles con tapa de 10 mL se dispensó 2,5 mL de MSAs y se colocaron en baño térmico a 45°C.

De forma continua, se verificó el crecimiento de la cepa de *E. coli* WG5 a través de la medición de la densidad óptica y procedió a titular en valores de DO_{600} entre 0,3 y 0,5. Para la siembra en placa, en los tubos con MSAs, se añadió 1 mL de la muestra y 1 mL de la cepa, se agitó cuidadosamente y se vertió sobre la placa de agar MSA correspondiente. Con precaución, se homogenizó la placa y se dejó enfriar en una superficie llana. Finalmente, se incubó a 37°C durante 24 horas.

Figura 6

Protocolo de siembra de bacteriófagos somáticos



Fuente: Autoría propia

Nota: Se realizó un control de cepa (1 mL de cultivo y 2,5 mL de MSAs), control de PBS (1 mL de cultivo, 1 mL de solvente y 2,5 mL de MSAs) y un control positivo de colifagos somáticos (Φ X174) (1 mL de cultivo, 1 mL de control y 2,5 mL de MSAs).

2.2.7. Análisis estadístico

Se aplicaron las pruebas de UniFrac ponderado y Unifrac no ponderado, para así determinar si dos o más comunidades poseen la misma estructura. La canalización y la función clasificadora de los OTUs más representativos se aplicó para asignar identidades con un umbral de confianza del 95% utilizando el software EzBiocloud (**Yoon et al., 2017**). Finalmente, se construyó un árbol filogenético neighbor-joining en el programa HemI 2.0 (**Ning et al., 2022**).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Abundancia Relativa de Indicadores de Contaminación Fecal mediante conteo en placa

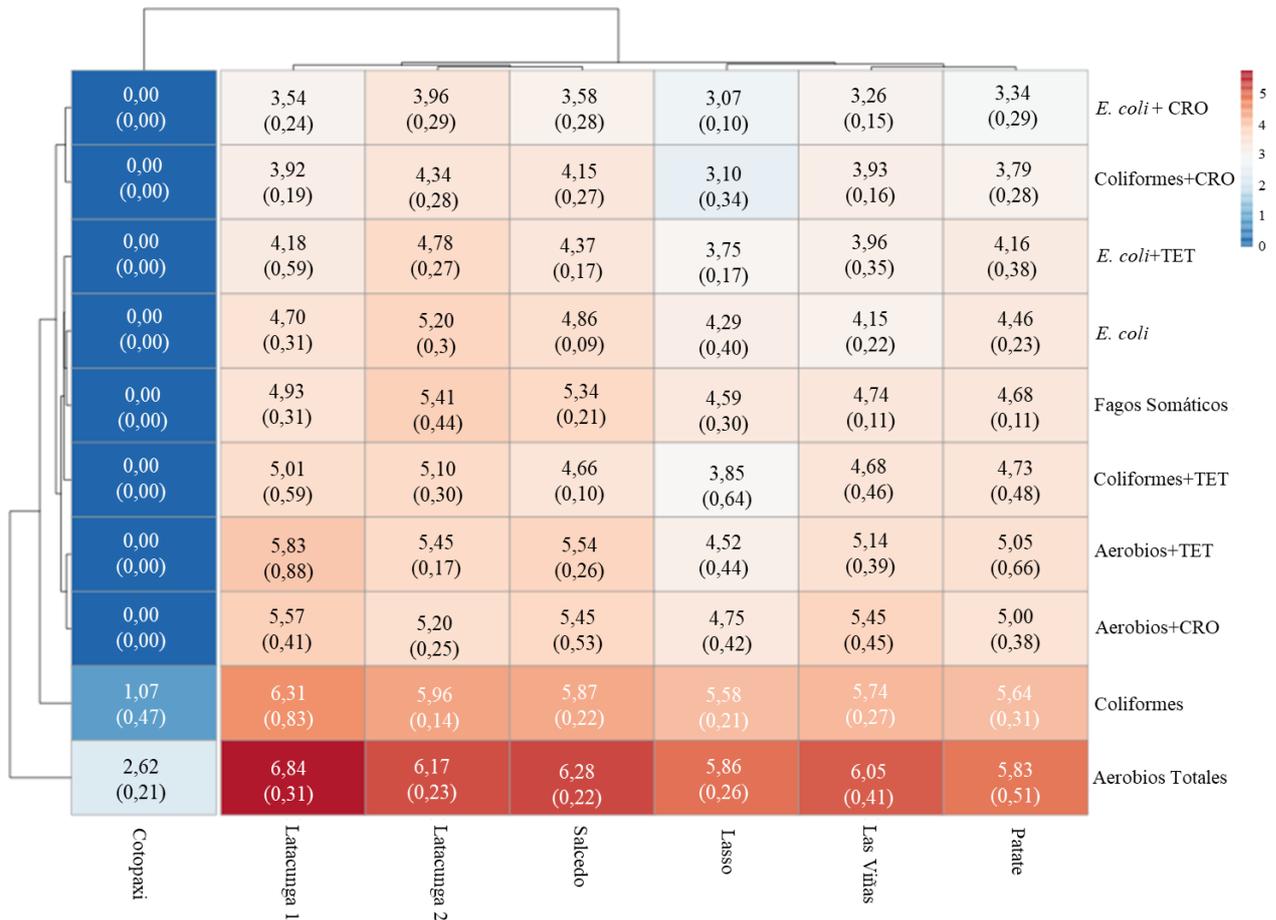
Las muestras de agua provenientes del río Cutuchi fueron tomadas en el año 2022, entre los meses de agosto y diciembre, en las provincias de Cotopaxi y Tungurahua (Tabla 7). Cada punto fue analizado por quintuplicado (una muestra por mes). Para cada punto de muestreo, se cuantificaron los indicadores bacteriológicos de aerobios totales, coliformes totales y *E. coli*; así como aerobios totales, coliformes totales y *E. coli* resistentes a CRO y TET (5 µg/mL). Los resultados de los promedios de cuantificación y sus desviaciones estándar se detallan en la Figura 7, expresados como log₁₀ UFC/100 mL para los indicadores bacterianos y log₁₀ UFP/100 mL para los colifagos somáticos. A partir de un análisis de varianza, con un intervalo de confianza del 95 %, se evidenció una variación en la abundancia de indicadores de contaminación fecal entre los diferentes puntos de muestreo, demostrando que los puntos Lasso, Latacunga 1, Latacunga 2, Salcedo, Las Viñas y Patate, contienen cantidades significativas de los indicadores de contaminación fecal.

La concentración de los indicadores bacteriológicos de los puntos Lasso, Latacunga 1, Latacunga 2, Salcedo, Las Viñas y Patate, superan el límite máximo permitido de coliformes totales y fecales detallados en el Texto Unificado de Legislación Secundaria, Medio Ambiente del Ecuador (TULSMA), así como en la Agencia de Protección Medio Ambiental (EPA) y en la Agencia Europea del Medio Ambiente (EEA) (Tabla 1). Las mayores abundancias bacterianas fueron evidenciadas en los puntos Latacunga 1, Latacunga 2 y Salcedo, pertenecientes a la ciudad de Latacunga y Salcedo, cuyas concentraciones oscilaban en el orden de 5 - 6 log₁₀ UFC/100 mL

para coliformes totales y 4 - 5 log₁₀ UFC/100 mL *E. coli*; mientras que, la menor en el punto Cotopaxi en el orden de 2 log₁₀ UFC/100 mL para coliformes totales y 0 log₁₀ UFC/100 mL para *E.coli*.

Figura 7

Heatmap de la abundancia relativa de conteo en placa. Los valores detallados corresponden al promedio de la cuantificación microbiana expresados como log₁₀ UFC/100 mL y log₁₀ UFP/100 mL para fagos somáticos. Los valores detallados entre paréntesis () representan la desviación estándar de los datos obtenidos



Fuente: Autoría propia

Latacunga 2 es el punto de muestreo con mayor concentración de indicadores de contaminación fecal. Se ubica en el sector Hospital del IESS, a 60 Km del punto Cotopaxi. Al comparar la abundancia de los indicadores de contaminación fecal de la

muestra tomada en el punto Cotopaxi, se evidencia un incremento significativo a lo largo de la trayectoria; en tres logaritmos para coliformes y en cinco para *E. coli*. Los altos niveles de estos indicadores ($> 4 \log_{10}$ UFC/100 mL) encontrados en este afluente se hallan en el mismo rango de otros arroyos y ríos afectados por aguas servidas (**Reynolds et al., 2020**). De modo que, este incremento es causado por la descarga de aguas residuales no tratadas provenientes de la ciudad de Latacunga y de las parroquias aledañas, alimentado también por el desecho de aguas industriales, urbanas, hospitalarias, entre otras; las cuales afectan de forma directa a las densidades bacterias del río Cutuchi.

Asimismo, es necesario considerar el efecto del factor de dilución. La descarga de aguas contaminadas con alta concentración bacteriana, al medio acuático, ocasiona una rápida reducción de estas densidades microbiológicas, la cual aumenta a medida que se aleja del foco de descarga (**Soueidan et al., 2021**). Sin embargo, esta tendencia no se observa a lo largo del río Cutuchi, tomando como referencia la Figura 7, en el cual se observa concentraciones bacterianas semejantes de coliformes y *E. coli* desde Latacunga 1 hasta Patate. Por lo que, las altas densidades de estos indicadores se traducen a la presencia de una múltiple red de puntos de descarga de aguas residuales a lo largo de la cuenca del río, resultando irrelevante la disminución o aumento del caudal.

La concentración de los indicadores de concentración fecal, *E. coli* y coliformes totales, presentes en las muestras de agua tomadas del río Cutuchi, sector hospital del IEES, son semejantes a las expuestas por **Mero (2018)** y **Mendoza (2019)**, quienes explican que en esta zona se identificó cantidades significativas bacterianas en el orden de $5 \log_{10}$ UFC/100 mL de *E. coli* y coliformes totales; siendo concentraciones semejantes a las detectadas en aguas residuales a nivel global (**Akiba et al., 2015; Truchado et al., 2021; Zhang et al., 2020**).

Se evaluó también el fenotipo de resistencia de los indicadores de contaminación fecal a TET y CRO. TET forma parte de los medicamentos veterinarios ampliamente utilizados a nivel global (Dai et al., 2019). En 1950, fue aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) como aditivo para alimentos de animales, convirtiéndose en uno de los productos con mayor consumo en la industria ganadera y agrícola para promover el rápido crecimiento (Kovalakova et al., 2020). Desafortunadamente, por su continuo uso, el nivel de contaminación de tetraciclinas a nivel global ha alcanzado incluso a ambientes prístinos, como los casquetes polares o aguas subterráneas, siendo evidenciado en varios países de América, Europa y Asia (Proia et al., 2018). En Estados Unidos y Rumania, se reportó la contaminación de afluentes por la descarga de desechos residuales sin previo tratamiento de granjas porcinas, detectando concentraciones de 500 ng/L de TET (Szekeres et al., 2018). En los indicadores microbiológicos evaluados en el río Cutuchi se detectaron elevados niveles de resistencia a este antibiótico en los puntos muestreados con evidencia de actividad antropogénica, observándose porcentajes de resistencia en aerobios totales que van desde el 5.8% en el punto Lasso, hasta el 30.6% en Latacunga 1; para coliformes totales, desde el 2.6% en Latacunga 1 (previo al ingreso de la ciudad) hasta el 16.1% en Latacunga 2 (núcleo urbano, presencia de hospitales en la ribera); y de *E. coli* desde el 23.6% en Lasso, hasta el 74.0% en Las Viñas. Considerando las características específicas de cada punto muestreado, es necesaria una evaluación detallada de los orígenes de la contaminación específica, la cual puede estar influenciada por diferentes estresores; como por ejemplo, las descargas de agua residual hospitalaria que pueden influir directamente en el resistoma microbiano de los cuerpos de agua receptores (Esposito et al., 2021; Popa et al., 2021), la capacidad de depuración limitada que presentan ciertas estaciones de agua residual (Uluseker et al., 2021), o bien, de la escasez de sistemas de depuración en entornos rurales en general (Shin et al., 2021).

Un patrón similar de resultados fue observado para los microorganismos con fenotipo de resistencia a CRO. La resistencia de *E. coli* a CRO (antibiótico β -lactámico) está dada por las enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales destruyen el enlace amida del anillo β -lactámico, modificando así la estructura molecular del

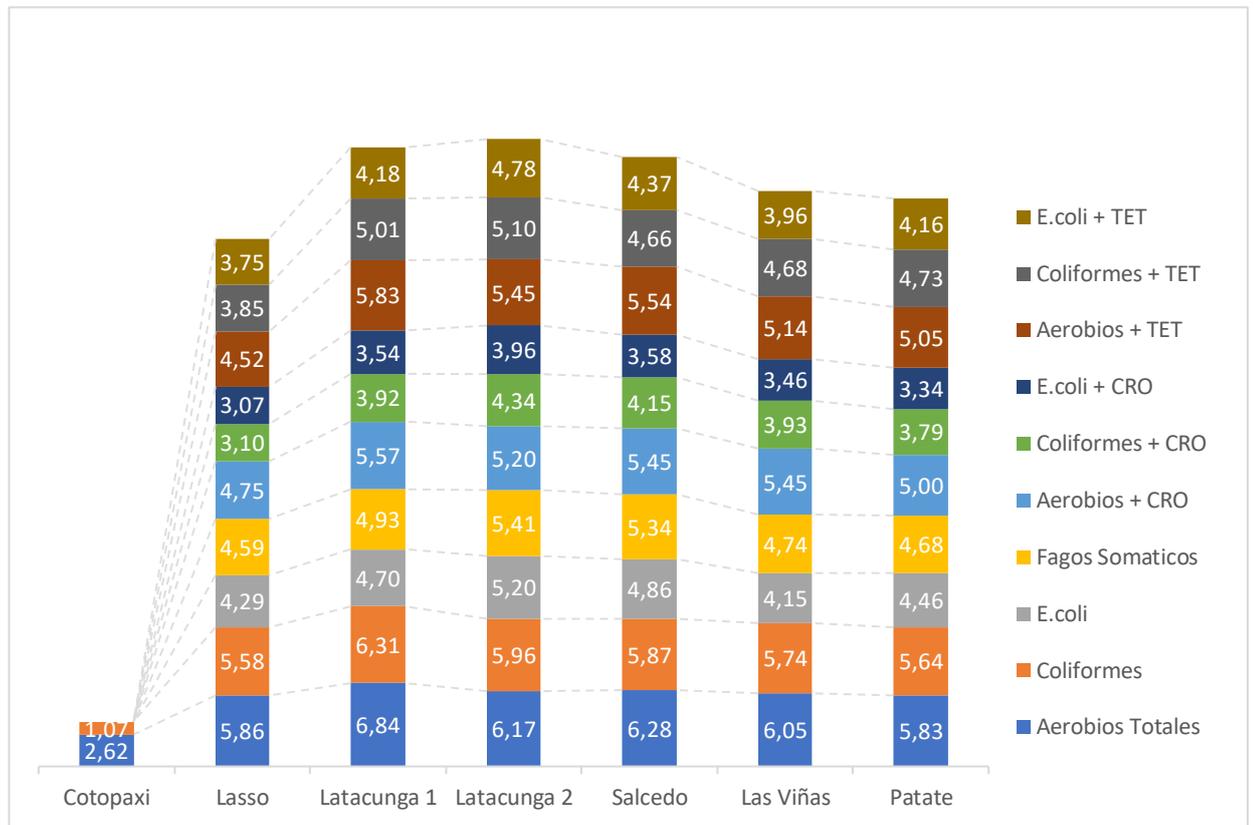
antibiótico e inactivando al mismo (**Tamma et al., 2022**). A nivel mundial, se ha descrito la elevada presencia de enterobacterias productoras de las β -lactamasas en ambientes acuáticos contaminados por la actividad antropogénica, como las descargas de aguas residuales urbanas, industriales, hospitalarias, así como por el impacto de la producción agropecuaria (**Aristizábal-Hoyos et al., 2019; Calero-Cáceres, Marti, et al., 2022**). En las aguas del río Cutuchi, se observan porcentajes de resistencia en aerobios totales que van desde el 5.9% de resistencia en Latacunga 1, hasta el 26.9% en Las Viñas; para coliformes totales, desde el 0.1% en Latacunga 1, hasta el 2.8% en Latacunga 2; y para *E. coli*, 4.7% en Lasso hasta el 19.5% en Las Viñas. Considerando los elevados niveles de resistencia a CRO detectados en el punto Las Viñas, es necesaria la evaluación en específico de los orígenes de estos aislamientos. En el año 2018, en el punto Latacunga 2, se detectó la presencia de aislamientos de *E. coli* resistentes a CRO y portadores del gen *mcr-1*, el cual presenta una diseminación emergente y otorga resistencia a colistina, considerado una de las últimas opciones terapéuticas frente a microorganismos multirresistentes (**Calero-Cáceres, Tadesse, et al., 2022**). Considerando los niveles de contaminación microbiológica en este punto, no se evidencia una mejora en los indicadores durante estos años. Se realizará una investigación complementaria para contrastar la presencia de mecanismos de resistencia emergentes en los microorganismos recuperados en estos puntos, los cuales se encuentran disponibles en un banco de cepas.

Los bacteriófagos al igual que las bacterias indicadoras de contaminación fecal son usadas como herramienta para evaluar la calidad del agua por su alta especificidad (**McMinn et al., 2017**). Los colifagos somáticos son abundantes en aguas residuales por lo que son ampliamente estudiados y aplicados por varios países europeos y americanos como marcos regulatorios en el monitoreo de aguas superficiales y subterráneas (**Jofre et al., 2016**). En países europeos, en donde existen marcos regulatorios que regulan las descargas de agua residual, las densidades de los colifagos somáticos en aguas superficiales y agua de mar ronda los 1-3 log₁₀ UFP/100 mL (**Jofre et al., 2021**). En países asiáticos como Malasia y Japón, se han detectado niveles similares en aguas costeras y ríos (**Poopipattana et al., 2021**). En países como España, Colombia y Argentina, se ha evaluado la densidad de colifagos somáticos en aguas superficiales, estimando una concentración promedio de 3 log₁₀ UFP/100 mL (**Chacón**

et al., 2020). En el caso del río Cutuchi, se ha detectado niveles superiores de colifagos somáticos a los detallados en aguas superiores, alcanzado un orden superior a $5 \log_{10}$ UFP/100 mL; evidenciando una similitud en concentración a valores obtenidos en aguas residuales sin tratar, en los cuales se presenta una concentración mayor a $5 \log_{10}$ UFP/100 mL (Ballesté et al., 2022; Fitzmorris-Brisolara et al., 2022; Kelmer et al., 2023).

Figura 8

Abundancia relativa de los puntos muestreados mediante conteo en placa



Fuente: Autoría propia

3.2. Abundancia relativa mediante *Metabarcoding 16S rRNA*

3.2.1. Filo

La técnica de *metabarcoding 16S rRNA* produjo un promedio de 182,740 lecturas de alta calidad. Se descartó las secuencias de baja calidad y se obtuvo un total de 13,141 unidades taxonómicas operativas (OTUs) (Tabla 8), de los cuales el 96,99% corresponden a filos bacterianos, el 1,64% a otros filos y un 1,17% no pudo ser clasificado (Figura 9). El índice de diversidad alfa de las muestras basado en las OTUs se evaluó mediante el software Mothur 1.48.0, incluidos los índices de Chao1 y Shannon. Chao1 mide la riqueza de especies y estima el número de taxones que se hallan en la muestra; mientras que Shannon en la diversidad de especies.

Se observan diferentes tendencias en riqueza y diversidad según el punto de muestreo. El índice de Chao1 fue mayor en Las Viñas (7814.83), seguido de Salcedo (5451.04), en los cuales revelan una gran riqueza de especies. Por su parte, el índice de Shannon presenta una gran diversidad en todas las muestras del río Cutuchi, con valores que oscilan entre 4.98 y 6.43, observando que en el punto Las Viñas se evidencia la mayor abundancia de especies bacterianas y taxones raros. Los valores de Shannon y Chao1 obtenidos en el río Cutuchi se relacionan a los descritos en el río Fenghe en China; en donde se observa un aumento de la diversidad microbiana desde la cabecera hasta la cuenca baja por el alto grado de contaminación antropogénica que afecta al afluente (Lu et al., 2016).

Además, la estructura de las comunidades bacterias se analizó utilizando las pruebas de UniFrac no ponderadas (sensibles a taxones raros) y ponderadas (sensible a la abundancia de taxones), los cuales demostraron que la pertenencia a la comunidad y la abundancia relativa de OTU eran significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre las muestras tomadas de los siete puntos (Anexo 11 y 12).

Tabla 8*Índices de diversidad en los puntos muestreados*

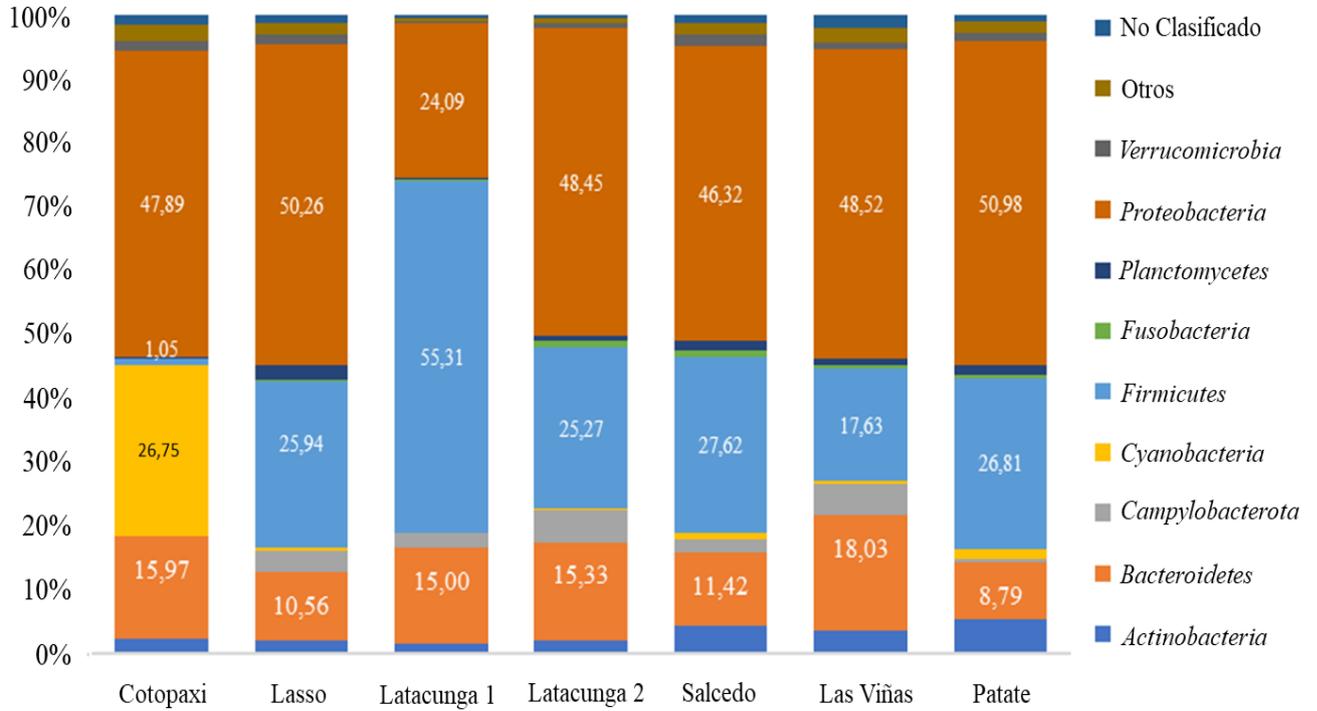
Muestra	Locación	Coordenadas	Fecha muestreo	OTUs	Shannon (diversity)	Chao1 (richness)
1	Cotopaxi	0°36'12.0"S 78°24'29.6"W	1/08/2023	1013,00	4,98	3414,33
2	Lasso	0°47'31.0"S 78°36'48.1"W	1/08/2023	1157,51	5,50	3397,44
3	Latacunga 1	0°53'23.5"S 78°37'35.0"W	1/08/2023	914,17	5,28	2633,15
4	Latacunga 2	0°56'34.9"S 78°36'53.4"W	1/08/2023	1009,92	5,51	2886,46
5	Salcedo	1°02'42.3"S 78°35'49.2"W	1/08/2023	1438,95	5,89	5451,04
6	Las Viñas	1°06'01.8"S 78°36'58.1"W	1/08/2023	1809,29	6,43	7814,83
7	Patate	1°20'46.1"S 78°30'08.1"W	1/08/2023	1060,51	5,37	2872,38

Fuente: Autoría propia

El análisis de las OTUs permitió clasificar a la abundancia bacteriana en 9 filos principales (Figura 10). Se observa una clara diferenciación de abundancia, en especial en la muestra proveniente de la zona de origen del río. A medida que el río se conduce a través zonas agrícolas, ganaderas y con población humana, se observa una modificación en la abundancia de determinados filos. En general, se observa mayor presencia de *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*, en comparación de *Campylobacterota*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*.

Figura 9

Abundancia relativa a nivel de filogenia obtenida mediante metabarcoding 16S rRNA



Fuente: Autoría propia

Los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* prevalecen en mayor abundancia en los puntos muestreados. Mientras que, los filos *Campylobacterota*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*, se hallan en menor abundancia (Figura 10). Estos filos bacterianos han sido identificados y aislados del tracto gastrointestinal (GIT) de humanos y animales, al igual que de ambientes acuáticos y sedimentos (Bahk et al., 2020; Mo et al., 2022; Peyrat et al., 2008; Rizzatti et al., 2017; Shu et al., 2011; Xianbiao et al., 2019).

El origen del río Cutuchi (laguna los Manantiales) se encuentra ubicado al norte del parque nacional Cotopaxi y al estar dentro de una reserva protegida, no presenta actividades agrícolas, ganaderas ni industriales. En este punto se observa tres filos

representativos *Proteobacteria* (47,80 %), *Cyanobacteria* (26,75 %) y *Bacteroidetes* (15,97 %). La abundancia de *Cyanobacteria* en este punto es significativamente superior a comparación de los restantes, los cuales no superan el 1,75 %. *Cyanobacteria* se desarrolla en ambientes acuáticos con alto contenido de nutrientes/elementos (hierro, azufre, potasio, calcio y magnesio); y es considerado como indicador de contaminación antropogénica, ya que sus densidades disminuyen en presencia de compuestos sulfatados y nitrogenados (**Monteagudo & Moreno, 2016**), los cuales son comúnmente aplicados en actividades agrícolas e industriales, la cual es evidente desde la zona de Lasso hasta Patate (último punto evaluado).

Lasso se ubica a 39 Km del parque nacional Cotopaxi y a pesar de ser una pequeña comunidad, cuenta con una alta actividad agrícola e industrial. Similarmente, se puede hablar del punto Latacunga 1 y 2, las cuales se ubican en la ciudad de Latacunga. Estos tres puntos geográficos, al formar parte de las afueras y centro de la ciudad, cuentan con una elevada densidad de industrias (ganaderas, avícolas, siderúrgicas, etc.), mercados, camales, hospitales, escuelas, entre otros. En estos tres puntos, los filos que prevalecen son *Proteobacteria* (40,95 %), *Firmicutes* (35,50 %), y *Bacteroidetes* (13,63 %), los cuales son, a su vez los principales miembros bacterianos en muestras fecales humanas (**Garrido Godoy et al., 2020**). Para los puntos siguientes, Salcedo, Las Viñas y Patate, se observa un patrón similar al de los puntos mencionados con anterioridad, en donde la mayor abundancia de los mismos 3 filos reportados. La abundancia de estos taxones se mantiene en valores similares, en donde, *Proteobacteria* reporta un rango de 46,32 % - 50,98 %, *Firmicutes* entre 17,63 % - 27,62 % y *Bacteroidetes* de 8,79 % - 18,03 %.

En un estudio realizado por **Stoeck et al. (2018)** detectó valores similares a los obtenidos en esta investigación, sin embargo, las muestras fueron tomadas de aguas residuales sin tratar, reportando valores de los taxones más abundantes, en los cuales *Proteobacteria* presenta el 56 %, *Firmicutes* el 13,6 % y *Bacteroidetes* un 24,5 %, explicando que estas comunidades microbianas presentes en estas muestras derivan de las heces de humanos y animales, además se sugieren que estos filos bacterianos

pueden sobrevivir a diferentes entornos. De modo que, la alta concentración de estos filos bacterianos en el río Cutuchi puede ser ocasionada por el alto impacto de actividades humanas ubicadas en las inmediaciones al río, además de la falta de PTARs funcionales, demostrando mediante los datos obtenidos que las muestras de agua tomadas en estos puntos se asemejan más a aguas residuales sin tratar que afluentes de río.

Al igual que los filos de mayor abundancia, los de menor abundancia (*Campylobacterota*, *Fusobacteria*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*) han sido descritos en diferentes fuentes ambientales como en aguas residuales, sedimentos, suelos y GTI; los cuales han sido considerados como aquellos microorganismos que residen de forma común en aguas servidas sin tratar. En todos los puntos del río Cutuchi, la densidad de estas comunidades es inferior al 8% de la abundancia relativa total. **Tiwari et al. (2021)** explican que las bajas densidades bacterianas, no poseen una gran influencia en la estructura de las comunidades en general.

3.2.2. Especie

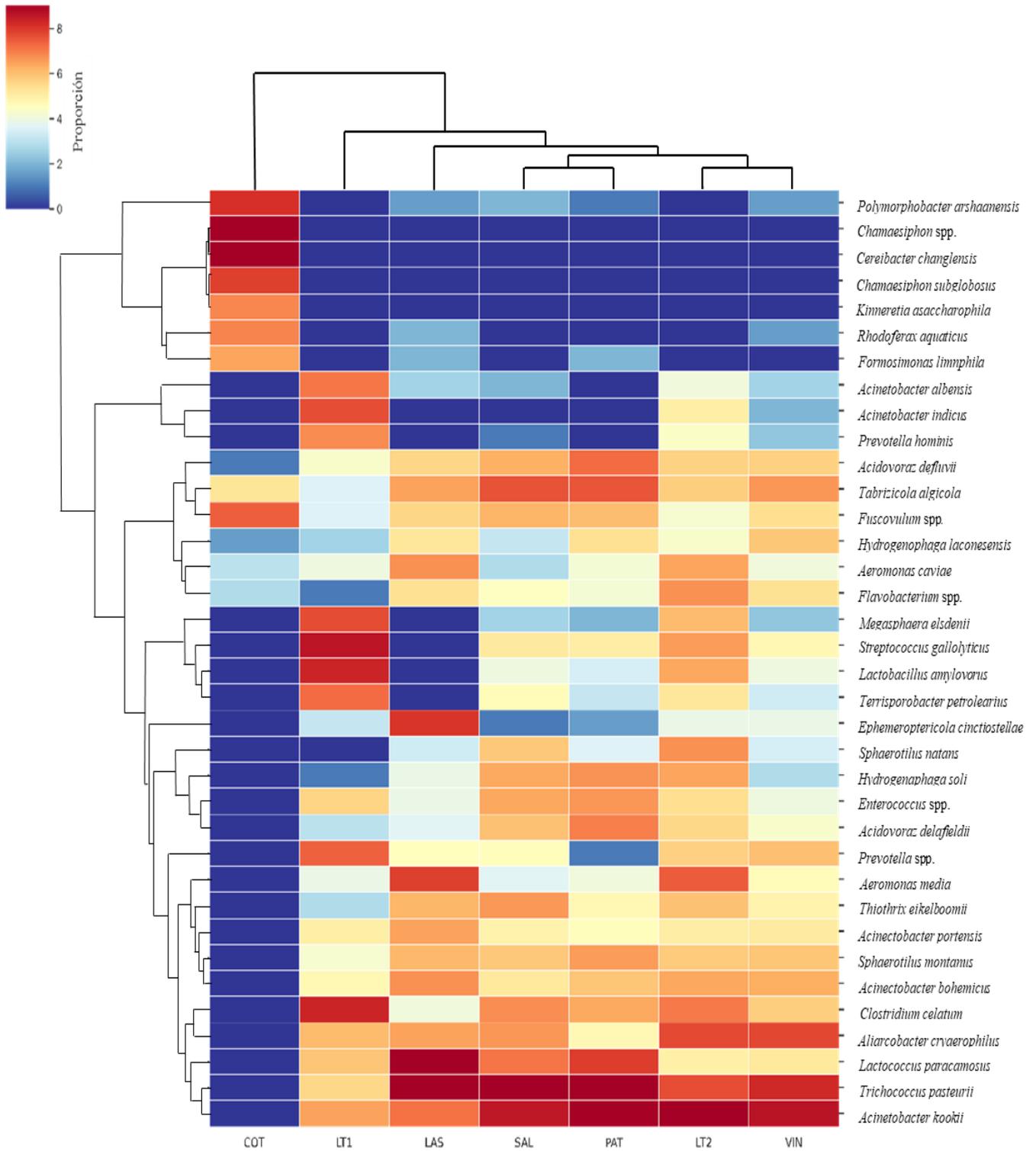
Alrededor de 36 especies bacterianas fueron diferenciadas (Figura 10) a lo largo del río Cutuchi, de las cuales, 13 son las más abundantes en los siete puntos de muestreo. En el punto de Cotopaxi, se observa una mayor presencia de *Polymorphobacter arshaanensis*, *Cereibacter changlensis* y *Chamaesiphon subglobosus*, pertenecientes al filo de *Proteobacteria* y *Cyanobacteria*. Estas especies bacterianas se han encontrado de forma común de aguas dulces, lagos, estuarios y arroyos que no han sufrido ningún tipo de contaminación antropogénica (**W. M. Chen et al., 2017; Gomila et al., 2010; Hameed et al., 2020; Kurmayer et al., 2018; Li et al., 2020; Phurbu et al., 2020**).

En los puntos de Lasso y Latacunga 1, se observa la aparición de nuevas especies a comparación al primer punto, con una alta abundancia de *Ephemeropterocola cintiostellae*, *Aeromonas media*, *Lactococcus paracamosus*, *Trichococcus pasteurii*, *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus gallolyticus*, *Lactobacillus amylovorus* y *Clostridium celatum*. Las cuatro primeras especies han sido aisladas e identificadas en aguas residuales y lodos de digestores anaeróbicos de industrias alimentarias **(Dhanapala et al., 2021; Kim et al., 2019)**; en donde estas bacterias son usadas para los procesos de fermentación **(Parshina et al., 2019; Yerlikaya, 2019)**. Sin embargo, esta abundancia microbiana difiere en comparación a Latacunga 1, en el cual, se observa un decrecimiento de estas bacterias, y un incremento de bacterias fecales. En este sentido, *Streptococcus gallolyticus*, *Clostridium celatum* y *Megasphaera elsdenii* son patógenos oportunistas que han sido aislados en el GIT de humanos y animales, que puede causar infecciones sistémicas y enfermedades diarreicas **(Khiabani et al., 2022; Sheikh et al., 2020; Yoshikawa et al., 2018)**.

En los puntos Latacunga 2, Salcedo, Las Viñas y Patate, se observa un patrón similar de las especies con mayor abundancia, destacando *Trichococcus pasteurii*, *Acinetobacter kookii*, *Lactococcus paracamosus* y *Aliarcobacter cryaerophilus*. De estas, *A. cryaerophilus* está incluida en la lista de bacterias que presentan un riesgo grave para la salud debido a su asociación con bacteriemia en humanos y aborto, mastitis o diarrea en animales **(Pérez-Cataluña et al., 2018)**. Al igual que *A. cryaerophilus*, *A. kookii* representa una amenaza considerable para la medicina humana, ya que pueden ser las responsables de infecciones nosocomiales con resistencia a múltiples fármacos. Las enfermedades causadas por estas bacterias son tratadas con antibióticos β -lactámicos, fluoroquinolonas y macrólidos, sin embargo, en los últimos años se ha informado la resistencia a múltiples fármacos **(Jribi et al., 2020; Sciortino et al., 2021)**.

Figura 10

Heatmap de abundancia relativa a nivel de especie obtenida mediante metabarcoding 16S rRNA



Fuente: Autoría propia

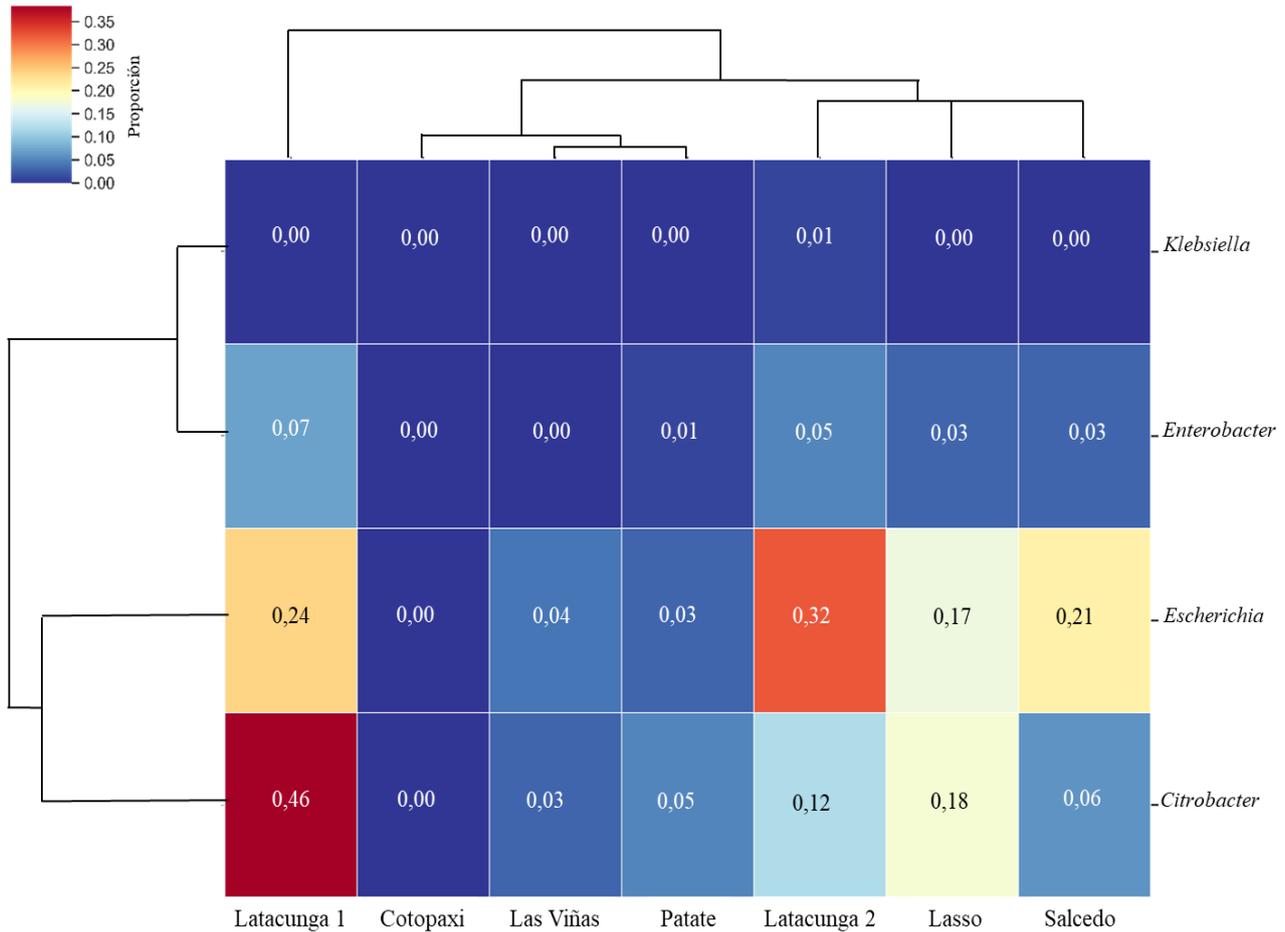
3.3. Metabarcoding 16S rRNA y Técnicas de Cultivo

En este contexto, en el presente estudio se identificaron a 9 filos bacterianos dominantes en las muestras de agua analizadas por medio de la técnica de *metabarcoding*, de los cuales *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* son los de mayor presencia, los cuales son hallados de forma común en el GIT de los humanos y animales, denotando un elevado impacto de descargas de aguas residuales en los puntos cercanos a los centros poblados **(Bahk et al., 2020)**.

Al analizar por separado las abundancias de los géneros indicadores de contaminación fecal tradicional (coliformes), los mismos fueron inferiores a 0,46% (Figura 11), es decir, la cantidad de secuencias de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Citrobacter* son relativamente mínimos en comparación con las obtenidas de los otros géneros bacterianos. Este resultado es plausible, considerando que los linajes bacterianos más grandes (más del 99%) en los sistemas ambientales acuáticos se encuentran en un estado VBNC y, por lo tanto, apenas se detectan utilizando técnicas basadas en cultivo **(Hemdan et al., 2019)**. Sin embargo, mediante técnicas de cultivo se observó una alta concentración de coliformes totales y *E. coli* (Figura 8), superando al límite máximo permitido por el TULSMA, EPA y EEA, evidenciando la elevada degradación de la calidad de agua del río Cutuchi.

Figura 11

Heatmap de los géneros indicadores de contaminación fecal tradicional obtenidos mediante metabarcoding 16S rRNA



Fuente: Autoría propia

De forma general, la aplicación de *metabarcoding 16S rRNA* permite conocer con detalle la composición y diversidad microbiana de las muestras, pero no la cuantificación precisa de la abundancia microbiana por unidad de volumen o peso de muestra (Pédron et al., 2020), considerando la necesidad de estandarizar protocolos de extracción y purificación de ADN, amplificación y secuenciación, así como los relacionados con los potenciales sesgos ocasionados por las limitaciones de la técnica, que discrimina a grupos taxonómicos raros no diferenciados, y la nula detección de la viabilidad celular (Boers et al., 2019). Por este motivo, es necesario contar con otros métodos como el de la cuantificación de indicadores microbianos tradicionales, o

ensayos de PCR cuantitativa (qPCR), los cuales pueden ser usados en conjunto con *metabarcoding* para obtener un panorama completo de las comunidades microbianas presentes en una muestra ambiental (**Shanks & Korajkic, 2020**).

Estas técnicas complementarias fueron aplicadas por **Betiku et al. (2021)**, quienes evaluaron la calidad de aguas recreativas. A través de la secuenciación de barras, identificaron 28 filos bacterianos, siendo los más abundantes *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Cyanobacteria*, los cuales son típicos en cuerpos de agua dulce. Además, no se detectó géneros indicadores de contaminación fecal como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Citrobacter*. Mediante conteo bacteriológico concluyeron que la calidad del agua es adecuada, ya que la concentración de coliformes totales y *E. coli* fue inferior al límite permitido en los estándares para aguas recreativas recomendados por la EPA. Concluyendo que, el nivel de contaminación por actividad humana es mínimo y no altera la calidad del agua.

El análisis de poblaciones cultivables permite el aislamiento y la identificación de bacterias específicas para la realización de estudios complementarios, obteniendo con ello una mirada profunda a ciertos microorganismos con fenotipos y genotipos de interés epidemiológico (**Betiku et al., 2021**). En el caso de los cuerpos de agua, se considera que representan una vía de diseminación y evolución de bacterias resistentes a antibióticos, y genes de resistencia a antibióticos, motivo por el cual su evaluación es prioritaria para una mejor comprensión de la emergencia de la resistencia antimicrobiana (**Domínguez et al., 2021**).

De acuerdo a la planificación del Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Latacunga, se estima una futura puesta en marcha de una PTAR, la cual servirá a aproximadamente 170.000 personas del cantón en mención (**GAD Latacunga, 2021**). Se espera que esta operación tenga un efecto positivo en la calidad general del agua del río Cutuchi, la cual representa el principal afluente del canal Latacunga Salcedo Ambato. El presente estudio puede ser utilizado como una línea base para la evaluación

de la eficiencia de la PTAR, desde un punto de vista de las poblaciones microbianas totales en los cuerpos de agua impactados por descargas de aguas residuales.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se cuantificó los indicadores microbiológicos de contaminación fecal tradicionales mediante técnicas basadas en cultivo, siendo el punto Latacunga 2 el de mayor concentración de indicadores fecales, con densidades que oscilan entre 5 - 6 log₁₀ UFC/100 mL para coliformes totales, 4 - 5 log₁₀ UFC/100 mL *E. coli* y 5 log₁₀ UFP/100 mL colifagos somáticos. Además, se cuantificaron indicadores fecales con fenotipo de resistencia a TET y CRO, mostrando resistencia de hasta el 74% de *E. coli* resistentes a TET, y más del 19.5 % de *E. coli* resistentes a CRO en puntos impactados por actividades antropogénicas.
- Se analizaron las secuencias obtenidas mediante *metabarcoding 16S rRNA* a través de herramientas bioinformáticas, obteniendo un total de 13,141 OTUs. De los cuales, el 96,99% corresponden a filos bacterianos, el 1,64% a otros filos y un 1,17% no pudo ser clasificado. Se determinaron los índices de diversidad alfa, Chao1 y Shannon, demostraron que en Las Viñas es el punto con mayor abundancia de especies bacterianas y taxones raros.
- Se contrastó los niveles de contaminación biológica basadas en cultivo con las abundancias de los taxones microbianos detectadas por *metabarcoding 16S rRNA*, demostrando que estas dos técnicas son complementarias entre sí para la evaluación de la calidad de agua, ya que proporcionan una imagen más completa de las comunidades bacterianas presentes en la muestra.
- Se evaluó la calidad del agua del río Cutuchi mediante indicadores microbianos tradicionales y *metabarcoding 16S rRNA*. Se detectó altas densidades de indicadores microbiológicos de contaminación fecal, así como taxones bacterianos propios del GIT de los humanos y animales, revelando una

degradación significativa en la calidad del agua del río Cutuchi, por el efecto de las descargas de aguas residuales a lo largo de su cuenca.

4.2. Recomendaciones

- Sugerir el uso de la presente investigación para evaluaciones de impacto ambiental relacionadas con la cuenca del río Cutuchi.
- Evaluar el perfil genotípico de los aislamientos de *E. coli* resistentes a ceftriaxona, para conocer la presencia de posibles genes de resistencia de interés clínico.
- Ampliar el número de zonas geográficas para futuros muestreos con el fin de monitorear el impacto de estas localidades en la variación de los niveles de bacterias indicadores de contaminación fecal.
- Realizar campañas de muestreo en cada punto geográfico cuando el caudal del río Cutuchi sea alto, medio y bajo, con el fin de identificar la variación de las comunidades bacterianas por el factor de dilución.

C. MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Akiba, M., Senba, H., Otagiri, H., Prabhasankar, V. P., Taniyasu, S., Yamashita, N., Lee, K. ichi, Yamamoto, T., Tsutsui, T., Ian Joshua, D., Balakrishna, K., Bairy, I., Iwata, T., Kusumoto, M., Kannan, K., & Guruge, K. S. (2015). Impact of wastewater from different sources on the prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in sewage treatment plants in South India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *115*, 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.018>
- An, X. L., Wang, J. Y., Pu, Q., Li, H., Pan, T., Li, H. Q., Pan, F. X., & Su, J. Q. (2020). High-throughput diagnosis of human pathogens and fecal contamination in marine recreational water. *Environmental Research*, *190*, 109982. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.109982>
- Aristizábal-Hoyos, A. M., Rodríguez, E. A., Arias, L., & Jiménez, J. N. (2019). High clonal diversity of multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Management*, *245*, 37–47. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2019.05.073>
- Bahk, Y. Y., Kim, H. S., Rhee, O. J., You, K. A., Bae, K. S., Lee, W., Kim, T. S., & Lee, S. S. (2020). Long-Term Monitoring of Noxious Bacteria for Construction of Assurance Management System of Water Resources in Natural Status of the Republic of Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.*, *30*(10), 1516–1524. <https://doi.org/10.4014/JMB.2004.04064>
- Ballesté, E., Blanch, A. R., Muniesa, M., García-Aljaro, C., Rodríguez-Rubio, L., Martín-Díaz, J., Pascual-Benito, M., & Jofre, J. (2022). Bacteriophages in sewage: abundance, roles, and applications. *FEMS Microbes*, *3*. <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtac009>

- Balzan, S., Carraro, L., Merlanti, R., Lucatello, L., Capolongo, F., Fontana, F., Novelli, E., Larini, I., Vitulo, N., & Cardazzo, B. (2020). Microbial metabarcoding highlights different bacterial and fungal populations in honey samples from local beekeepers and market in north-eastern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 334, 108806. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108806>
- Banco Mundial. (2015). *Brasil, Colombia y Perú, entre los que más agua tienen en el mundo*. Banco Mundial.
- Betiku, O. C., Sarjeant, K. C., Ngatia, L. W., Aghimien, M. O., Odewumi, C. O., & Latinwo, L. M. (2021). Evaluation of microbial diversity of three recreational water bodies using 16S rRNA metagenomic approach. *Science of The Total Environment*, 771, 144773. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.144773>
- Blanch, A. R., Lucena, F., Muniesa, M., & Jofre, J. (2020). Fast and easy methods for the detection of coliphages. *Journal of Microbiological Methods*, 173, 105940. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2020.105940>
- Boers, S. A., Jansen, R., & Hays, J. P. (2019). Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2019 38:6, 38(6), 1059–1070. <https://doi.org/10.1007/S10096-019-03520-3>
- Boretti, A., & Rosa, L. (2019). Reassessing the projections of the World Water Development Report. *Npj Clean Water* 2019 2:1, 2(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41545-019-0039-9>
- Bridle, H., Gilbride, K., Green, J., & Lee, S. (2021). Existing methods of detection. *Waterborne Pathogens*, 41–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64319-3.00003-4>
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. v., Bukin, S. v., Zakharenko, A. S., & Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data* 2019 6:1, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>

- Calderon, J. S., Verbyla, M. E., Gil, M., Pinongcos, F., Kinoshita, A. M., & Mladenov, N. (2022). Persistence of Fecal Indicators and Microbial Source Tracking Markers in Water Flushed from Riverbank Soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 233(3), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S11270-022-05542-8/FIGURES/3>
- Calero-Cáceres, W., Marti, E., Olivares-Pacheco, J., & Rodriguez-Rubio, L. (2022). Editorial: Antimicrobial Resistance in Aquatic Environments. *Frontiers in Microbiology*, 13(February), 1–3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.866268>
- Calero-Cáceres, W., Méndez, J., Martín-Díaz, J., & Muniesa, M. (2017). The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution*, 223, 384–394. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.035>
- Calero-Cáceres, W., Tadesse, D., Jaramillo, K., Villavicencio, X., Mero, E., Lalaleo, L., Welsh, C., Villacís, J. E., Quentin, E., Parra, H., Ramirez, M. S., Harries, A. D., & Balcázar, J. L. (2022). Characterization of the genetic structure of *mcr-1* gene among *Escherichia coli* isolates recovered from surface waters and sediments from Ecuador. *Science of The Total Environment*, 806, 150566. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150566>
- Chacón, L., Barrantes, K., Santamaría-Ulloa, C., Solano, M., Reyes, L., Taylor, L., Valiente, C., Symonds, E. M., & Achí, R. (2020). A somatic coliphage threshold approach to improve the management of activated sludge wastewater treatment plant effluents in resource-limited regions. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(17). <https://doi.org/10.1128/AEM.00616-20/ASSET/6AF220D5-9D79-4CA0-A14B-0E0A18DDB130/ASSETS/GRAPHIC/AEM.00616-20-F0004.JPEG>
- Chen, G., Bai, R., Zhang, Y., Zhao, B., & Xiao, Y. (2022). Application of metagenomics to biological wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 807, 150737. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.150737>
- Chen, W. M., Xie, P. B., Young, C. C., & Sheu, S. Y. (2017). *Formosimonas limnophila* gen. Nov., sp. nov., a new member of the family *Burkholderiaceae* isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and*

Evolutionary Microbiology, 67(1), 17–24.
<https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.001561/CITE/REFWORKS>

Chu, B. T. T., Petrovich, M. L., Chaudhary, A., Wright, D., Murphy, B., Wells, G., & Poretsky, R. (2018). Metagenomics reveals the impact of wastewater treatment plants on the dispersal of microorganisms and genes in aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(5). https://doi.org/10.1128/AEM.02168-17/SUPPL_FILE/ZAM005188357S1.PDF

Dagher, L. A., Hassan, J., Kharroubi, S., Jaafar, H., & Kassem, I. I. (2021). Nationwide Assessment of Water Quality in Rivers across Lebanon by Quantifying Fecal Indicators Densities and Profiling Antibiotic Resistance of *Escherichia coli*. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 883, 10(7), 883. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10070883>

Dai, Y., Liu, M., Li, J., Yang, S., Sun, Y., Sun, Q., Wang, W., Lu, L., Zhang, K., Xu, J., Zheng, W., Hu, Z., Yang, Y., Gao, Y., & Liu, Z. (2019). A review on pollution situation and treatment methods of tetracycline in groundwater. *Taylor & Francis*, 55(5), 1005–1021. <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1577445>

Dennehy, J. J., & Abedon, S. T. (2021). Phage Infection and Lysis. *Bacteriophages*, 341–383. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2_53

Devane, M., Dupont, P.-Y., Robson, B., Lin, S., Scholes, P., Wood, D., Weaver, L., Webster-Brown, J., & Gilpin, B. (2022). Mobilization of *Escherichia coli* and fecal source markers from decomposing cowpats. *Science of The Total Environment*, 853, 158509. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.158509>

Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(3), 125–138. <https://doi.org/10.1038/S41579-019-0311-5>

Domínguez, D. C., Chacón, L. M., & Wallace, D. (2021). Anthropogenic activities and the problem of antibiotic resistance in Latin America: A water issue. *Water (Switzerland)*, 13(19), 2693. <https://doi.org/10.3390/W13192693/S1>

- EEA. (2016). *European water policies and human health*.
<https://www.eea.europa.eu/publications/public-health-and-environmental-protection>
- Elbahnasawy, M. A., ElSayed, E. S. E., & Azzam, M. I. (2021). Newly isolated coliphages for bio-controlling multidrug-resistant *Escherichia coli* strains. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 16, 100542.
<https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2021.100542>
- EPA. (2022). *Regla revisada de coliformes totales y regla de coliformes totales / EPA de EE. UU.* EPA. <https://espanol.epa.gov/espanol/agua>
- Fitzmorris-Brisolara, K., Maal-Bared, R., Worley-Morse, T., Danley-Thomson, A., & Sobsey, M. (2022). Monitoring coliphages to reduce waterborne infectious disease transmission in the One Water framework. In *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (Vol. 240).
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.113921>
- Francioli, D., Lentendu, G., Lewin, S., & Kolb, S. (2021). DNA Metabarcoding for the Characterization of Terrestrial Microbiota Pitfalls and Solutions. *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 361, 9(2), 361.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9020361>
- GAD Latacunga. (2014). *Ordenanza para la descontaminación y protección de los ríos y afluentes hídricos del cantón Latacunga*.
<https://www.latacunga.gob.ec/fr/alcaldia.html?view=article&id=675&catid=85>
- GAD Latacunga. (2021). *Plan Maestro de Alcantarillado*.
<https://www.latacunga.gob.ec/es/plan-maestro-de-alcantarillado.html#>
- Garrido Godoy, R., Angela Marcondes, M., pessôa, R., nascimento, A., Russo Victor, J., José da Silva Duarte, A., Bianca clissa, patricia, & Saeed Sanabani, S. (2020). *Bacterial community composition and potential pathogens along the pinheiros River in the southeast of Brazil*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66386-y>
- Glöckner, F. O., Yilmaz, P., Quast, C., Gerken, J., Beccati, A., Ciuprina, A., Bruns, G., Yarza, P., Peplies, J., Westram, R., & Ludwig, W. (2017). 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. In

- Gomila, M., Pinhassi, J., Falsen, E., Moore, E. R. B., & Lalucat, J. (2010). *Kinneretia asaccharophila* gen. nov., sp. nov., isolated from a freshwater lake, a member of the *Rubrivivax* branch of the family *Comamonadaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*(4), 809–814. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.011478-0/CITE/REFWORKS>
- Haidău, C., Năstase-Bucur, R., Bulzu, P., Levei, E., Cadar, O., Mirea, I. C., Faur, L., Fruth, V., Atkinson, I., Constantin, S., & Moldovan, O. T. (2022). A 16S rRNA Gene-Based Metabarcoding of Phosphate-Rich Deposits in Muierilor Cave, South-Western Carpathians. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1699. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.877481/BIBTEX>
- Hameed, A., Shahina, M., Lin, S. Y., Chen, W. M., Hsu, Y. H., Lai, W. A., & Young, C. C. (2020). Description of *Gemmobacter aestuarii* sp. nov., isolated from estuarine surface water and reclassification of *Cereibacter changlensis* as *Gemmobacter changlensis*. *Archives of Microbiology*, *202*(5), 1035–1042. <https://doi.org/10.1007/S00203-020-01809-Y/FIGURES/1>
- Hamzah, A., Kipli, S., Ismail, S. R., Una, R., & Sarmani, S. (2011). Microbiological study in coastal water of Port Dickson, Malaysia. *Sains Malaysiana*, *40*(2).
- Hartinger, S. M., Medina-Pizzali, M. L., Salmon-Mulanovich, G., Larson, A. J., Pinedo-Bardales, M., Verastegui, H., Riberos, M., & Mäusezahl, D. (2021). Antimicrobial resistance in humans, animals, water and household environs in rural andean Perú: Exploring dissemination pathways through the one health lens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(9), 4604. <https://doi.org/10.3390/IJERPH18094604/S1>
- Hemdan, B. A., El-Liethy, M. A., ElMahdy, M. E. I., & EL-Taweel, G. E. (2019). Metagenomics analysis of bacterial structure communities within natural biofilm. *Heliyon*, *5*(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02271>
- Holcomb, D. A., & Stewart, J. R. (2020). Microbial Indicators of Fecal Pollution: Recent Progress and Challenges in Assessing Water Quality. *Current*

- Environmental Health Reports*, 7(3), 311–324. <https://doi.org/10.1007/s40572-020-00278-1>
- Hurst, E. C. J., Crawford, R. L., Garland, J. L., Lipson, D. A., Mills, A. L., & Linda, D. (2022). *Manual of Environmental Microbiology* (3rd ed.).
- Hussain, Q. A. (2019). Bacteria: the natural indicator of environmental pollution. *Freshwater Microbiology: Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems*, 393–420. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00010-4>
- Hyman, P., & Abedon, S. (2012). *Bacteriophages in Health and Disease: Bacteriophages in Health and Disease - P. Hyman, Paul Hyman and Stephen T. Abedon - Google Libros* (Vol. 1).
- Illumina. (2017). Illumina 16S Metagenomics Sequencing Workflow. *Illumina*, 12, 1–3.
- INEC. (2017). *Medición de los ODS. Indicadores de Agua, Saneamiento e Higiene (ASH) en Ecuador*. INEC.
https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Bibliotecas/Libros/AGUA,_SANEAMIENTO_e_HIGIENE.pdf
- INEN. (2013). *Norma técnica ecuatoriana. Calidad del Agua. Muestreo y diseño de los programas de muestreo*.
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2226-1.pdf>
- International Organization for Standardization. (2000). Calidad del agua - Detección y recuento de bacteriófagos. *Recuento de Colifagos Somáticos.*, 1–16.
- International Organization for Standardization. (2014). International Standard Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform. 2014, 2014.
- Jebri, S., Muniesa, M., & Jofre, J. (2017). General and host-associated bacteriophage indicators of fecal pollution. *Global Water Pathogen Project*.
<https://doi.org/10.14321/waterpathogens.7>
- Jofre, J. (2007). Chapter 11 Indicators of Waterborne Enteric Viruses. *Perspectives in Medical Virology*, 17, 227–249. [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(07\)17011-7](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(07)17011-7)

- Jofre, J., Lucena, F., & Blanch, A. R. (2021). Coliphages as a complementary tool to improve the management of urban wastewater treatments and minimize health risks in receiving waters. *Water (Switzerland)*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/w13081110>
- Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A. R., & Muniesa, M. (2016). Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water (Switzerland)*, 8(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/w8050199>
- Jofre, J., Stewart, J. R., & Grabow, W. (2011). Phage Methods. *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*, 137–156. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9386-1_6
- Jribi, H., Sellami, H., Amor, S. B., Ducournau, A., Sifré, E., Benejat, L., Mégraud, F., & Gdoura, R. (2020). Occurrence and Antibiotic Resistance of *Arcobacter* Species Isolates from Poultry in Tunisia. *Journal of Food Protection*, 83(12), 2080–2086. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-056>
- Kapoor, R., Ebdon, J., Wadhwa, A., Chowdhury, G., Wang, Y., Raj, S. J., Siesel, C., Durry, S. E., Mairinger, W., Mukhopadhyay, A. K., Kanungo, S., Dutta, S., & Moe, C. L. (2021). Evaluation of Low-Cost Phage-Based Microbial Source Tracking Tools for Elucidating Human Fecal Contamination Pathways in Kolkata, India. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1112. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.673604/BIBTEX>
- Kelmer, G. A. R., Ramos, E. R., & Dias, E. H. O. (2023). Coliphages as viral indicators in municipal wastewater: A comparison between the ISO and the USEPA methods based on a systematic literature review. *Water Research*, 230, 119579. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2023.119579>
- Khan, F. M., & Gupta, R. (2020). *Escherichia coli* (*e. coli*) as an indicator of fecal contamination in groundwater: A review. *Environmental Science and Engineering*, 225–235. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45263-6_21/COVER
- Khiabani, S. A., Haghghat, S., Khosroshahi, H. T., Asgharzadeh, M., & Kafil, H. S. (2022). *Clostridium* species diversity in gut microbiota of patients with renal

- failure. *Microbial Pathogenesis*, 169, 105667.
<https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2022.105667>
- Kovalakova, P., Cizmas, L., McDonald, T. J., Marsalek, B., Feng, M., & Sharma, V. K. (2020). Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. *Chemosphere*, 251.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.126351>
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17).
<https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Holzinger, A., & Rott, E. (2018). Single colony genetic analysis of epilithic stream algae of the genus *Chamaesiphon* spp. *Hydrobiologia*, 811(1), 61–75. <https://doi.org/10.1007/S10750-017-3295-Z/FIGURES/6>
- Li, T., Zhuo, Y., Jin, C. Z., Wu, X., Ko, S. R., Jin, F. J., Ahn, C. Y., Oh, H. M., Lee, H. G., & Jin, L. (2020). Genomic insights into a novel species *Rhodoferax aquaticus* sp. nov., isolated from freshwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(8), 4653–4660.
<https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004325/CITE/REFWORKS>
- Lin, W., Ye, C., Guo, L., Hu, D., & Yu, X. (2020). Analysis of microbial contamination of household water purifiers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(10), 4533–4545. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10510-5>
- Lu, S., Sun, Y., Zhao, X., Wang, L., Ding, A., & Zhao, X. (2016). Sequencing Insights into Microbial Communities in the Water and Sediments of Fenghe River, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 71(1), 122–132.
<https://doi.org/10.1007/S00244-016-0277-5/FIGURES/8>
- Ma, Q., Qu, Y., Shen, W., Zhang, Z., Wang, J., Liu, Z., Li, D., Li, H., & Zhou, J. (2015). Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants

- in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Bioresource Technology*, 179, 436–443. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.12.041>
- Martín-Díaz, J., Lucena, F., Blanch, A. R., & Jofre, J. (2020). Review: Indicator bacteriophages in sludge, biosolids, sediments and soils. *Environmental Research*, 182. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.109133>
- McMinn, B. R., Ashbolt, N. J., & Korajkic, A. (2017). Bacteriophages as indicators of fecal pollution and enteric virus removal. *Letters in Applied Microbiology*, 65(1), 11–26. <https://doi.org/10.1111/LAM.12736>
- Mellahi, D., Zerdoumi, R., & Chaib, A. (2021). Control strategies to improve the low water quality of Souk-Ahras city. *Heliyon*, 7(7), e07606. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E07606>
- Mendoza, I. (2019). *Presencia de enterobacterias portadoras de genes de resistencia a antibióticos emergentes procedentes de aguas de riego y superficiales del Ecuador, año 2019*. Universidad Técnica de Ambato.
- Merck Millipore. (2022). *Chromocult® Agar para coliformes*.
- Mero, E. (2018). *Presencia de genes de resistencia a antibióticos emergentes en aislados de Escherichia coli procedentes de aguas superficiales y sedimentos del río Cutuchi y canal Latacunga-Salcedo-Ambato*. Universidad Técnica de Ambato.
- Mo, R., Liu, Y., Chen, Y., Mao, Y., & Gao, B. (2022). *Evolutionary Principles of Bacterial Signaling Capacity and Complexity*. <https://doi.org/10.1128/mbio.00764-22>
- Momba, M., Ebdon, J., Kamika, I., & Verbyla, M. (2019). Using indicators to assess microbial treatment and disinfection efficacy. *Global Water Pathogen Project*, 3–15. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.9>
- Monteagudo, L., & Moreno, J. L. (2016). Benthic freshwater *Cyanobacteria* as indicators of anthropogenic pressures. *Ecological Indicators*, 67, 693–702. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.03.035>

- Nappier, S. P., Liguori, K., Ichida, A. M., Stewart, J. R., & Jones, K. R. (2020). Antibiotic Resistance in Recreational Waters: State of the Science. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, Vol. 17, Page 8034, 17(21), 8034. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17218034>
- Nelson, M. C., Morrison, H. G., Benjamino, J., Grim, S. L., & Graf, J. (2014). Analysis, Optimization and Verification of Illumina-Generated 16S rRNA Gene Amplicon Surveys. *PLOS ONE*, 9(4), e94249. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0094249>
- Ning, W., Wei, Y., Gao, L., Han, C., Gou, Y., Fu, S., Liu, D., Zhang, C., Huang, X., Wu, S., Peng, D., Wang, C., & Xue, Y. (2022). HemI 2.0: an online service for heatmap illustration. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W405–W411. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC480>
- Niyoyitungiye, L., Giri, A., & Ndayisenga, M. (2020). Assessment of Coliforms Bacteria Contamination in Lake Tanganyika as Bioindicators of Recreational and Drinking Water Quality. *South Asian Journal of Research in Microbiology*, 9–16. <https://doi.org/10.9734/SAJRM/2020/V6I330150>
- Oliver, J. C., Paula, R. A. de O., & Veiga, S. M. O. M. (2021). Chemical and bacteriological analysis of the water from drinking fountains located in a Higher Education Institution. *Research, Society and Development*, 10(2), e8010212145–e8010212145. <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I2.12145>
- OMS. (2022). *Saneamiento. Organización Mundial de la Salud*. OMS. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sanitation>
- ONU. (2018). *Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM)*. ONU. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/millennium-development-goals-\(mdgs\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/millennium-development-goals-(mdgs))
- ONU. (2021). *Clean Water and Sanitation - Sustainable Development Goals*. ONU. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/water-and-sanitation/>
- ONU. (2022). Agua | Naciones Unidas. ONU. <https://www.un.org/es/global-issues/water>

- Onywera, H., & Meiring, T. L. (2020). Comparative analyses of Ion Torrent V4 and Illumina V3-V4 16S rRNA gene metabarcoding methods for characterization of cervical microbiota: taxonomic and functional profiling. *Scientific African*, 7, e00278. <https://doi.org/10.1016/J.SCIAF.2020.E00278>
- OPS. (2022). *Agua y Saneamiento - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*.
- Palacios, C. (2018). Distribución de coliformes fecales en el área marina de la costa ecuatoriana en las provincias de Esmeraldas y Manabí. *2018*, 18, 59–65.
- Park, C., Kim, S. B., Choi, S. H., & Kim, S. (2021). Comparison of 16S rRNA Gene Based microbial profiling using five Next-Generation Sequencers and various primers. *Frontiers in Microbiology*, 12, 3013. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.715500/BIBTEX>
- Pascual-Benito, M., Jorba-Plassa, A., Casas-Mangas, R., Blanch, A. R., & Martín-Díaz, J. (2022). Comparison of methods for the enumeration of coliphages in 100 mL water samples. *Science of The Total Environment*, 838, 156381. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.156381>
- Pédrón, J., Guyon, L., Lecomte, A., Blottière, L., Chandeysson, C., Rochelle-Newall, E., Raynaud, X., Berge, O., & Barny, M. A. (2020). Comparison of Environmental and Culture-Derived Bacterial Communities through 16S Metabarcoding: A Powerful Tool to Assess Media Selectivity and Detect Rare Taxa. *Microorganisms*, 8(8), 1–17. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8081129>
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, A. L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2018). Revisiting the Taxonomy of the Genus *Arcobacter*: Getting Order from the Chaos. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02077>
- Peyrat, M. B., Soumet, C., Maris, P., & Sanders, P. (2008). Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination.

International Journal of Food Microbiology, 124(2), 188–194.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.03.030>

Phurbu, D., Liu, Z. X., Liu, H. C., Lhamo, Y., Yangzom, P., Li, A. H., & Zhou, Y. G. (2020). *Polymorphobacter arshaanensis* sp. nov., containing the photosynthetic gene *puf ML*, isolated from a volcanic lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(2), 1093–1098.
<https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.003880>

PNUMA. (2022). *PNUMA / Agenda 2030 en América Latina y el Caribe*.

Poopipattana, C., Suzuki, M., & Furumai, H. (2021). Impact of long-duration CSO events under different tidal change conditions on distribution of microbial indicators and PPCPs in Sumida River estuary of Tokyo Bay, Japan. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(6).
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-11046-x>

Price, R. G., Wildeboer, D., Price, R. G., & Wildeboer, D. (2017). *E. coli* as an Indicator of Contamination and Health Risk in environmental waters. In *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications* (1st ed., Vol. 1). IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/67330>

Proia, L., Adriana, A., Jessica, S., Carles, B., Marinella, F., Marta, L., Luis, B. J., & Servais, P. (2018). Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. *Chemosphere*, 206, 70–82.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.04.163>

Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., Kidd, K. A., MacCormack, T. J., Olden, J. D., Ormerod, S. J., Smol, J. P., Taylor, W. W., Tockner, K., Vermaire, J. C., Dudgeon, D., & Cooke, S. J. (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*, 94(3), 849–873.
<https://doi.org/10.1111/BRV.12480>

Reynolds, L. J., Sala-Comorera, L., Martin, N. A., Nolan, T. M., Stephens, J. H., Gitto, A., O'Hare, G. M. P., O'Sullivan, J. J., & Meijer, W. G. (2020). Correlation

between antimicrobial resistance and fecal contamination in small urban streams and bathing waters. *Science of The Total Environment*, 739, 140242. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140242>

Salazar-Llorente, E., Morales, M., Sornoza, I., Mariduena-Zavala, M. G., Gu, G., Nou, X., Ortiz, J., Maldonado-Alvarado, P., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2021). Microbiological quality of High-Demand food from three major Cities in Ecuador. *Journal of Food Protection*, 84(1), 128–138. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-271>

Salleh, M. H. M., Esa, Y., Ngalimat, M. S., & Chen, P. N. (2022). Fecal *DNA metabarcoding* reveals novel bacterial community patterns of critically endangered Southern River Terrapin, *Batagur affinis*. *PeerJ*, 10. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.12970>

Santo Domingo, J. W., Ashbolt, N. J., & Rice, E. W. (2019). Drinking Water. *Encyclopedia of Microbiology*, 63–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02247-9>

Sciortino, S., Arculeo, P., Alio, V., Cardamone, C., Nicastro, L., Arculeo, M., Alduina, R., & Costa, A. (2021). Occurrence and Antimicrobial Resistance of *Arcobacter* spp. Recovered from Aquatic Environments. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10030288>

Shanks, O. C., & Korajkic, A. (2020). Microbial source tracking: characterization of human fecal pollution in environmental waters with HF183 quantitative real-time PCR. *Microbial Forensics*, 71–87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815379-6.00006-4>

Sheikh, A. F., Masjedi Zadeh, A. R., Saki, M., Khani, P., Hashemi, S. J., Shahin Zadeh, S., & Dastoorpoor, M. (2020). Detection of *Streptococcus gallolyticus* in colorectal cancer and inflammatory bowel disease patients compared to control group in southwest of Iran. *Molecular Biology Reports*, 47(11), 8361–8365. <https://doi.org/10.1007/S11033-020-05807-7/TABLES/2>

Shu, Q., Jiao, N., Xu, G., & Shen, Z. (2011). Variation of abundance of *Planctomycetes* in typical aquatic environments of the China seas. *African Journal of*

Microbiology Research, 5(29), 5208–5214.
<https://doi.org/10.5897/AJMR11.1041>

Sible, E., Cooper, A., Malki, K., Bruder, K., Hatzopoulos, T., Watkins, S. C., & Putonti, C. (2015). Assessment of microbial populations within Chicago area nearshore waters and interfaces with river systems. *Data in Brief*, 5, 305–308.
<https://doi.org/10.1016/J.DIB.2015.09.004>

Silva, N. da, Taniwaki, M. H., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Okazaki, M. M., & Gomes, R. A. R. (2019). Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual. In *Institute of Food Technology*.

Soueidan, J., Warren, A., Pearson, M., & Montie, E. W. (2021). A changing estuary: Understanding historical patterns in salinity and fecal coliform levels in the May River, SC. *Marine Pollution Bulletin*, 168, 112384.
<https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2021.112384>

Srikullabutr, S., Sattasathuchana, P., Kerdsin, A., & Thengchaisri, N. (2021). Prevalence of coliform bacterial contamination in cat drinking water in households in Thailand. *Veterinary World*, 14(3), 721.
<https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2021.721-726>

Stoeck, T., Pan, H., Dully, V., Forster, D., & Jung, T. (2018). Towards an eDNA metabarcoding based performance indicator for fullscale municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 144, 322–331.
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2018.07.051>

Szekeres, E., Chiriac, C. M., Baricz, A., Szőke-Nagy, T., Lung, I., Soran, M. L., Rudi, K., Dragos, N., & Coman, C. (2018). Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 236, 734–744. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2018.01.107>

Tamma, P. D., Komarow, L., Ge, L., Garcia-Diaz, J., Herc, E. S., Doi, Y., Arias, C. A., Albin, O., Saade, E., Miller, L. G., Jacob, J. T., Satlin, M. J., Krsak, M., Huskins, W. C., Dhar, S., Shelburne, S. A., Hill, C., Baum, K. R., Bhojani, M., ... Group, for the A. R. L. (2022). Clinical Impact of Ceftriaxone Resistance in

Escherichia coli Bloodstream Infections: A Multicenter Prospective Cohort Study. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(11).
<https://doi.org/10.1093/OFID/OFAC572>

Tiwari, A., Hokajärvi, A. M., Domingo, J. S., Elk, M., Jayaprakash, B., Ryu, H., Siponen, S., Vepsäläinen, A., Kauppinen, A., Puurunen, O., Artimo, A., Perkola, N., Huttula, T., Miettinen, I. T., & Pitkänen, T. (2021). Bacterial diversity and predicted enzymatic function in a multipurpose surface water system – from wastewater effluent discharges to drinking water production. *Environmental Microbiomes*, 16(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S40793-021-00379-W/FIGURES/6>

Toribio-Avedillo, D., Blanch, A. R., Muniesa, M., & Rodríguez-Rubio, L. (2021). Bacteriophages as Fecal Pollution Indicators. *Viruses 2021*, Vol. 13, Page 1089, 13(6), 1089. <https://doi.org/10.3390/V13061089>

Toribio-Avedillo, D., Díaz, J. M., Jofre, J., Blanch, A. R., & Muniesa, M. (2019). New approach for the simultaneous detection of somatic coliphages and F-specific RNA coliphages as indicators of fecal pollution. *Science of The Total Environment*, 655, 263–272. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.11.198>

Truchado, P., Gil, M. I., López, C., Garre, A., López-Aragón, R. F., Böhme, K., & Allende, A. (2021). New standards at European Union level on water reuse for agricultural irrigation: Are the Spanish wastewater treatment plants ready to produce and distribute reclaimed water within the minimum quality requirements? *International Journal of Food Microbiology*, 356(January 2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109352>

TULSMA. (2017). *Texto Unificado de Legislación Secundaria de Medio Ambiente*.

UNESCO. (2022). *El desafío mundial de la calidad del agua y los ODS*. UNESCO. <https://es.unesco.org/sdgs>

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J. M., ...

- Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental *DNA metabarcoding*. *Molecular Ecology*, 25(4), 929–942. <https://doi.org/10.1111/MEC.13428>
- Vinueza, D., Ochoa-Herrera, V., Maurice, L., Tamayo, E., Mejía, L., Tejera, E., & Machado, A. (2021). Determining the microbial and chemical contamination in Ecuador's main rivers. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96926-z>
- Wan, X., Hendrix, H., Skurnik, M., & Lavigne, R. (2021). Phage-based target discovery and its exploitation towards novel antibacterial molecules. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2020.08.015>
- Wang, Z., Xiao, G., Zhou, N., Qi, W., Han, L., Ruan, Y., Guo, D., & Zhou, H. (2015). Comparison of two methods for detection of fecal indicator bacteria used in water quality monitoring of the Three Gorges Reservoir. *Journal of Environmental Sciences*, 38, 42–51. <https://doi.org/10.1016/J.JES.2015.04.029>
- WWF. (2022). *Actividades que amenazan la salud de los ríos / WWF*.
- Xianbiao, L., Dengzhou, G., Kaijun, L., & Xiaofei, L. (2019). Bacterial community shifts driven by nitrogen pollution in river sediments of a highly urbanized City. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(20). <https://doi.org/10.3390/IJERPH16203794>
- Yan, W., Wang, N., Wei, D., Liang, C., Chen, X., Liu, L., & Shi, J. (2021). Bacterial community compositions and nitrogen metabolism function in a cattle farm wastewater treatment plant revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Environmental Science and Pollution Research 2021 28:30*, 28(30), 40895–40907. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-13570-W>
- Yassi, A., Kjellström, T., de Kok, T., & Guidotti, T. L. (2002). Salud Ambiental Básica. *Organización Mundial de La Salud*. <http://www.rolac.unep.mx>
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of *16S rRNA* gene

sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>

Yoshikawa, S., Araoka, R., Kajihara, Y., Ito, T., Miyamoto, H., & Kodama, H. (2018). Valerate production by *Megasphaera elsdenii* isolated from pig feces. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(5), 519–524. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2017.12.016>

Zapata, D., Oleas, N. H., Páez-Vacas, M., & Tobes, I. (2021). Water Quality Assessment of the Cutuchi River Basin (Ecuador): A Review of Technical Documents. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 690(1), 012058. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/690/1/012058>

Zemb, O., Achard, C. S., Hamelin, J., de Almeida, M. L., Gabinaud, B., Cauquil, L., Verschuren, L. M. G., & Godon, J. J. (2020). Absolute quantitation of microbes using *16S rRNA gene metabarcoding*: A rapid normalization of relative abundances by quantitative PCR targeting a *16S rRNA* gene spike-in standard. *MicrobiologyOpen*, 9(3). <https://doi.org/10.1002/MBO3.977>

Zhang, L., Ma, X., Luo, L., Hu, N., Duan, J., Tang, Z., Zhong, R., & Li, Y. (2020). The prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase producing bacteria from hospital sewage, treated effluents and receiving rivers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph17041183>

ZymoBIOMICS. (2022). *ZymoBIOMICS Microbial Community Standard*.

ANEXOS

Anexo 1

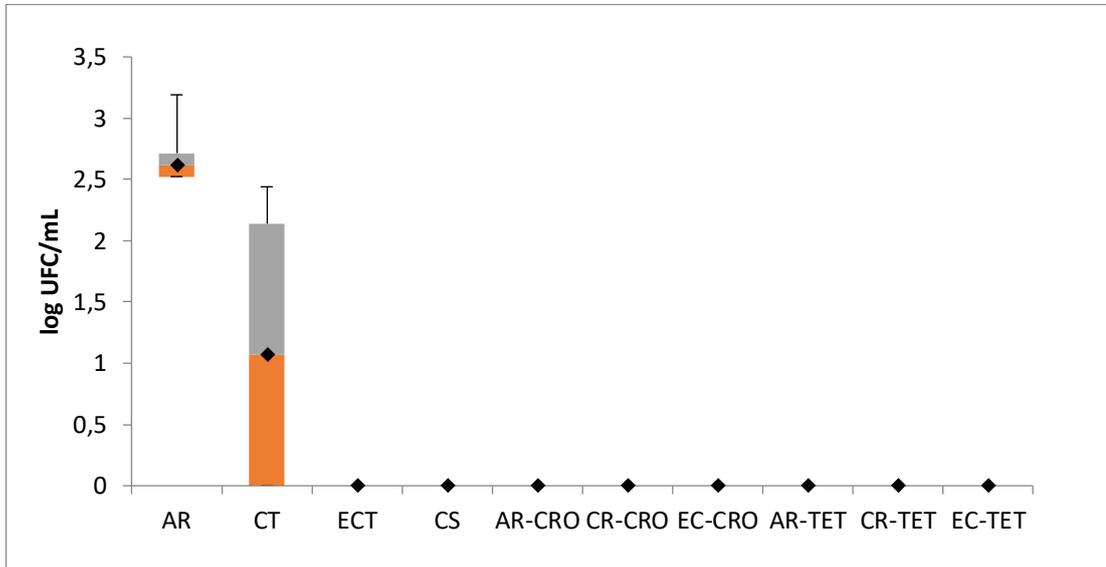
Concentración (UFC/100mL) de los indicadores microbianos de contaminación fecal obtenidos en los muestreos realizados

	Punto de muestreo	Indicadores microbianos																	
		E. coli total		Coliformes totales		Aerobios totales total		E. coli R (CRO)		Coliformes R (CRO)		Aerobios R (CRO)		E. coli R (TET)		Coliformes R (TET)		Aerobios R (TET)	
		UFC/100 mL	SD	UFC/100 mL	SD	UFC/100 mL	SD	UFC/100 mL	SD	UFC/100 mL	SD	UFC/100 mL	SD	UFC/100 mL	SD	UFC/100 mL	SD	UFC/100 mL	SD
Agosto	L-RC-PN1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,33E+02	5,77E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	L-RC-PL2	2,30E+04	2,65E+03	4,47E+05	5,51E+04	1,39E+06	8,89E+04	1,00E+03	0,00E+00	1,33E+03	5,77E+02	4,17E+04	3,79E+03	8,33E+03	1,53E+03	1,17E+04	2,89E+03	2,23E+04	3,51E+03
	L-RC-PR3	2,70E+04	3,61E+03	6,17E+06	6,43E+05	6,67E+06	7,23E+05	1,67E+03	7,23E+05	5,67E+03	1,53E+03	1,27E+05	7,02E+03	5,67E+03	1,53E+03	7,80E+04	4,58E+03	1,18E+05	9,54E+03
	L-RC-PE4	1,62E+05	1,05E+04	8,67E+05	4,73E+04	1,15E+06	4,04E+04	9,00E+03	4,36E+03	1,70E+04	3,61E+03	1,20E+05	4,36E+03	5,00E+04	4,58E+03	9,63E+04	2,08E+03	1,80E+05	2,52E+03
	S-RC-PA5	1,03E+05	9,29E+03	1,80E+06	6,43E+04	2,79E+06	8,54E+04	1,10E+04	3,61E+03	3,73E+04	2,52E+03	1,51E+06	2,58E+05	1,20E+04	1,00E+03	3,40E+04	1,73E+03	6,77E+05	3,51E+04
	A-RC-PV6	2,40E+04	4,00E+03	1,32E+06	6,00E+04	2,73E+06	5,51E+05	3,00E+03	2,00E+03	1,00E+04	4,36E+03	3,60E+05	2,00E+04	1,70E+04	2,65E+03	4,87E+04	3,51E+03	1,69E+05	6,66E+03
	P-RC-PM7	4,13E+04	2,31E+03	5,27E+05	2,08E+04	8,80E+05	8,72E+04	3,33E+03	2,08E+03	1,03E+04	2,08E+03	1,28E+05	2,31E+03	1,57E+04	1,53E+03	4,47E+04	2,52E+03	2,43E+04	4,73E+03
Septiembre	L-RC-PN1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,33E+02	5,77E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	L-RC-PL2	4,70E+04	6,08E+03	2,40E+05	5,57E+03	5,33E+05	1,43E+05	0,00E+00	0,00E+00	3,33E+02	5,77E+02	1,27E+05	3,00E+03	3,00E+03	1,73E+03	4,67E+03	3,21E+03	1,15E+05	3,79E+03
	L-RC-PR3	5,73E+04	4,51E+03	7,83E+05	3,21E+04	7,87E+06	4,51E+05	2,67E+03	5,77E+02	5,00E+03	2,65E+03	1,50E+05	3,46E+03	1,90E+04	3,61E+03	3,20E+04	2,65E+03	1,06E+05	4,62E+03
	L-RC-PE4	1,98E+05	5,29E+03	1,06E+06	5,57E+04	2,28E+06	4,36E+04	1,07E+04	3,51E+03	2,50E+04	2,00E+03	3,27E+05	2,52E+04	1,39E+05	7,02E+03	3,67E+05	2,52E+04	1,83E+05	9,61E+03
	S-RC-PA5	5,77E+04	2,08E+03	6,63E+05	2,52E+04	1,89E+06	5,69E+04	2,00E+03	1,00E+03	1,90E+04	3,61E+03	4,27E+05	3,06E+04	2,60E+04	2,65E+03	4,47E+04	4,73E+03	1,37E+05	8,72E+03
	A-RC-PV6	2,07E+04	3,79E+03	2,55E+05	1,32E+04	6,27E+05	1,53E+05	4,00E+03	2,00E+03	8,00E+03	1,73E+03	5,90E+04	2,65E+03	4,67E+03	2,31E+03	1,00E+04	2,65E+03	3,33E+04	3,06E+03
	P-RC-PM7	2,57E+04	1,53E+03	1,73E+05	5,57E+03	1,01E+06	2,00E+04	2,00E+03	2,00E+03	4,00E+03	2,65E+03	3,37E+04	3,79E+03	5,67E+03	2,89E+03	1,13E+04	4,93E+03	2,50E+04	2,65E+03
Octubre	L-RC-PN1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,33E+02	5,77E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	L-RC-PL2	3,27E+04	7,37E+03	2,22E+05	5,29E+03	1,47E+06	1,72E+05	1,33E+03	1,53E+03	2,00E+03	2,00E+03	1,60E+05	7,37E+03	7,33E+03	1,53E+03	2,40E+04	0,00E+00	1,60E+04	4,58E+03
	L-RC-PR3	8,63E+04	3,21E+03	3,13E+07	1,53E+06	2,10E+07	4,36E+05	7,33E+03	1,53E+03	1,33E+04	5,77E+02	1,15E+06	1,28E+05	3,87E+04	3,51E+03	5,57E+05	3,51E+04	3,77E+05	2,08E+04
	L-RC-PE4	7,23E+04	1,00E+04	6,37E+05	5,03E+04	1,07E+06	5,69E+04	5,67E+03	1,15E+03	1,50E+04	3,46E+03	1,33E+05	4,73E+03	2,87E+04	3,51E+03	5,73E+04	4,93E+03	3,97E+05	5,51E+04
	S-RC-PA5	8,90E+04	1,65E+04	5,80E+05	3,00E+04	2,91E+06	1,62E+05	3,00E+03	2,00E+03	8,00E+03	1,00E+03	9,00E+04	3,61E+03	2,53E+04	5,69E+03	4,13E+04	3,79E+03	4,57E+05	2,08E+04
	A-RC-PV6	1,20E+04	1,73E+03	3,57E+05	3,06E+04	2,77E+05	4,73E+04	1,67E+03	1,15E+03	5,67E+03	3,06E+03	9,83E+05	1,00E+05	3,33E+03	1,53E+03	3,33E+04	4,93E+03	2,41E+05	7,23E+03

	P-RC-PM7	2,43E+04	3,79E+03	2,90E+05	6,66E+03	8,47E+04	9,71E+03	1,00E+03	1,00E+03	3,67E+03	7,55E+04	1,20E+05	9,29E+03	8,00E+03	0,00E+00	5,10E+04	5,00E+03	7,80E+05	7,55E+04
Noviembre	L-RC-PN1	0,00E+00	0,00E+00	3,33E+02	5,77E+02	1,00E+03	1,73E+03	0,00E+00											
	L-RC-PL2	1,80E+04	5,57E+03	6,67E+05	4,73E+04	5,00E+05	3,46E+04	1,67E+03	2,89E+03	2,33E+03	2,31E+03	4,80E+04	4,00E+03	5,33E+03	1,15E+03	2,10E+04	3,46E+03	7,87E+04	3,06E+03
	L-RC-PR3	1,09E+05	7,94E+03	9,37E+05	3,06E+04	3,67E+06	1,15E+05	4,00E+03	2,00E+03	1,23E+04	1,53E+03	7,77E+05	7,64E+04	7,13E+04	2,89E+03	3,20E+05	2,65E+04	8,80E+06	7,00E+05
	L-RC-PE4	9,10E+04	5,29E+03	7,10E+05	8,66E+04	8,13E+05	7,09E+04	4,33E+03	2,52E+03	1,20E+04	2,65E+03	7,90E+04	4,36E+03	4,47E+04	4,93E+03	1,36E+05	4,04E+03	3,60E+05	2,65E+04
	S-RC-PA5	6,63E+04	2,31E+03	5,70E+05	4,00E+04	8,53E+05	5,51E+04	3,00E+03	2,65E+03	1,00E+04	1,73E+03	8,23E+04	1,01E+04	2,50E+04	2,00E+03	6,20E+04	4,36E+03	3,60E+05	2,65E+04
	A-RC-PV6	6,67E+03	2,08E+03	6,93E+05	1,53E+04	1,38E+06	5,57E+04	3,67E+03	1,53E+03	1,43E+04	4,73E+03	2,14E+05	5,00E+03	1,13E+04	2,52E+03	1,15E+05	2,08E+03	3,43E+05	3,51E+04
	P-RC-PM7	1,40E+04	2,00E+03	5,20E+05	2,65E+04	1,25E+06	1,02E+05	1,33E+03	1,15E+03	4,00E+03	2,00E+03	3,33E+05	2,52E+04	1,63E+04	2,52E+03	8,80E+04	4,36E+03	2,94E+05	2,08E+03
	L-RC-PN1	0,00E+00	0,00E+00	6,67E+02	5,77E+02	6,67E+02	1,15E+03	0,00E+00											
Diciembre	L-RC-PL2	4,33E+03	1,53E+03	5,00E+05	4,36E+04	4,53E+05	5,86E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,47E+04	2,08E+03	0,00E+00	0,00E+00	6,67E+02	5,77E+02	1,20E+04	1,73E+03
	L-RC-PR3	2,17E+04	4,16E+03	2,50E+05	4,58E+04	3,77E+06	4,04E+05	4,00E+03	3,61E+03	9,00E+03	4,36E+03	4,37E+05	4,51E+04	2,67E+03	2,08E+03	2,67E+04	1,15E+04	4,33E+05	1,15E+05
	L-RC-PE4	4,37E+05	2,31E+04	1,49E+06	4,16E+04	2,92E+06	4,36E+04	2,50E+04	4,58E+03	6,17E+04	5,69E+03	2,40E+05	4,04E+03	8,37E+04	4,73E+03	1,15E+05	4,04E+03	3,43E+05	4,04E+04
	S-RC-PA5	6,60E+04	5,00E+03	5,53E+05	6,11E+04	1,92E+06	3,21E+04	4,00E+03	1,73E+03	1,03E+04	3,51E+03	3,80E+05	2,00E+04	3,23E+04	4,04E+03	4,93E+04	4,51E+03	3,40E+05	4,36E+04
	A-RC-PV6	1,37E+04	4,16E+03	5,73E+05	3,21E+04	2,17E+06	4,36E+04	2,67E+03	5,77E+02	6,67E+03	3,51E+03	3,80E+05	4,00E+04	2,07E+04	4,04E+03	1,39E+05	4,00E+03	1,08E+05	7,51E+03
	P-RC-PM7	5,37E+04	4,73E+03	1,20E+06	4,04E+04	1,54E+06	4,58E+04	5,33E+03	3,06E+03	1,50E+04	4,36E+03	5,67E+04	2,08E+04	5,70E+04	4,36E+03	2,15E+05	4,93E+03	1,27E+05	2,08E+04

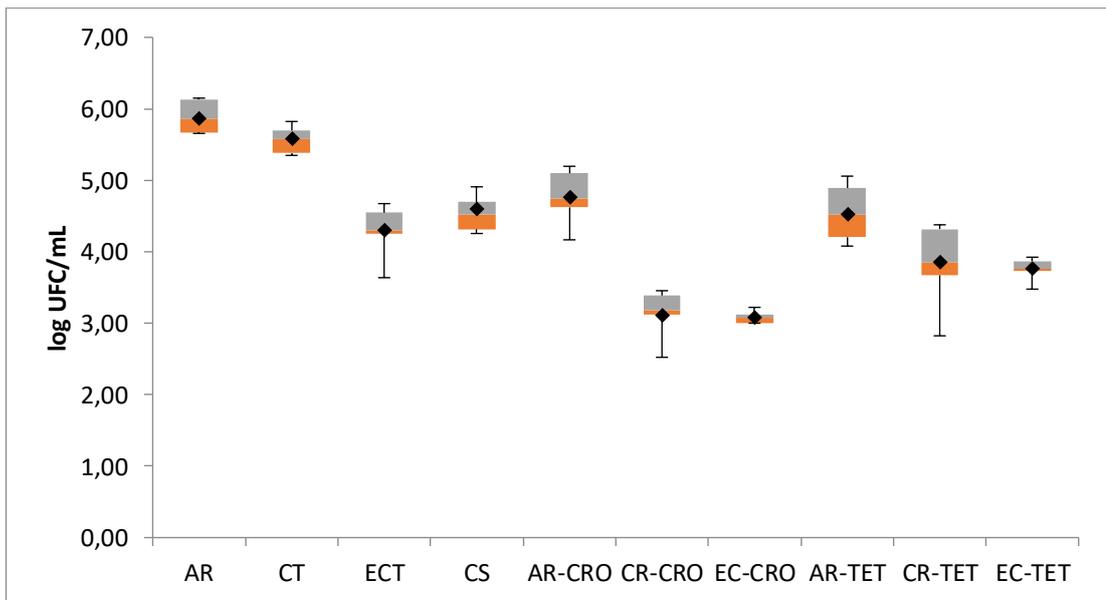
Anexo 2

Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Cotopaxi



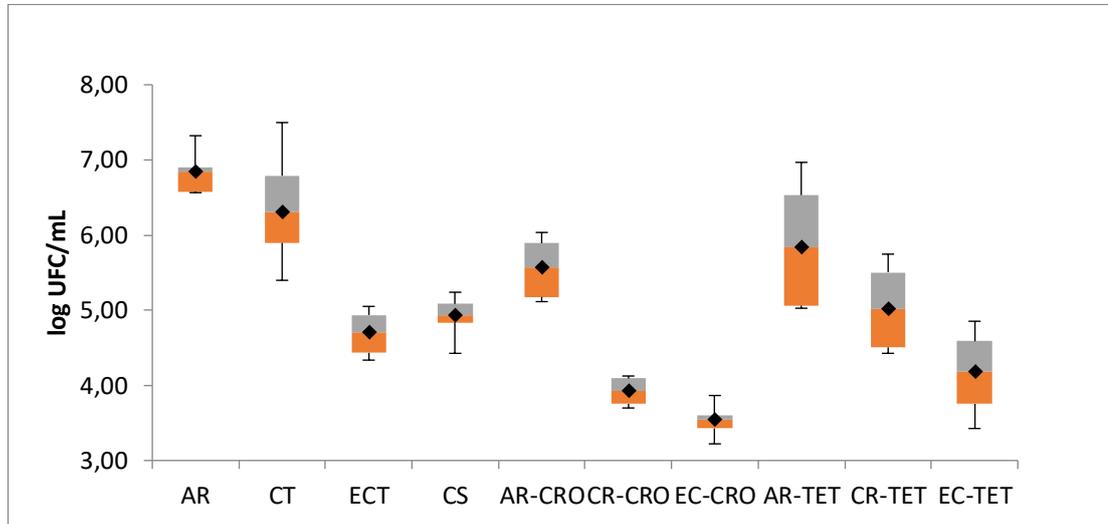
Anexo 3

Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Lasso



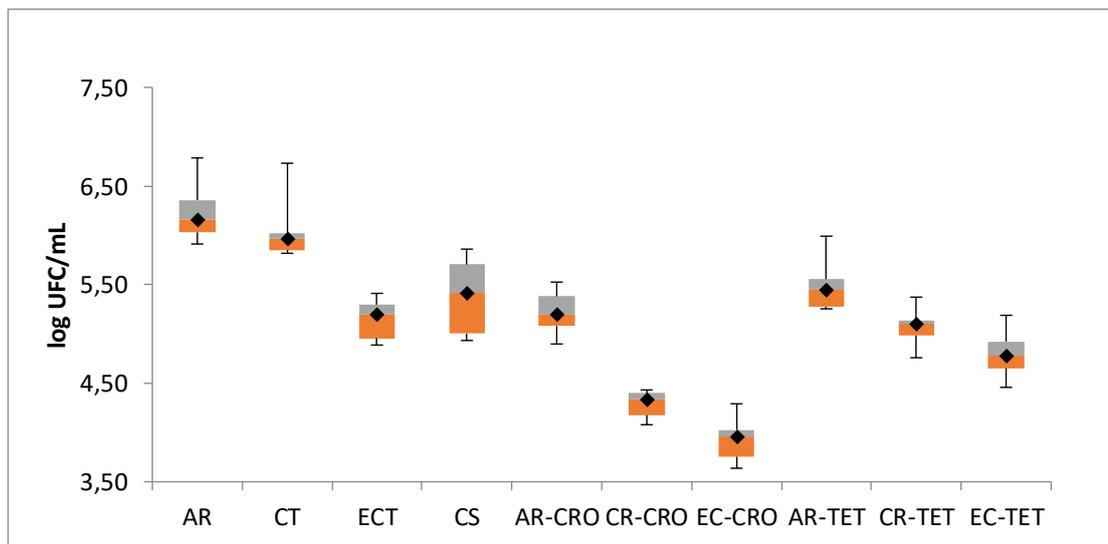
Anexo 4

Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Latacunga 1



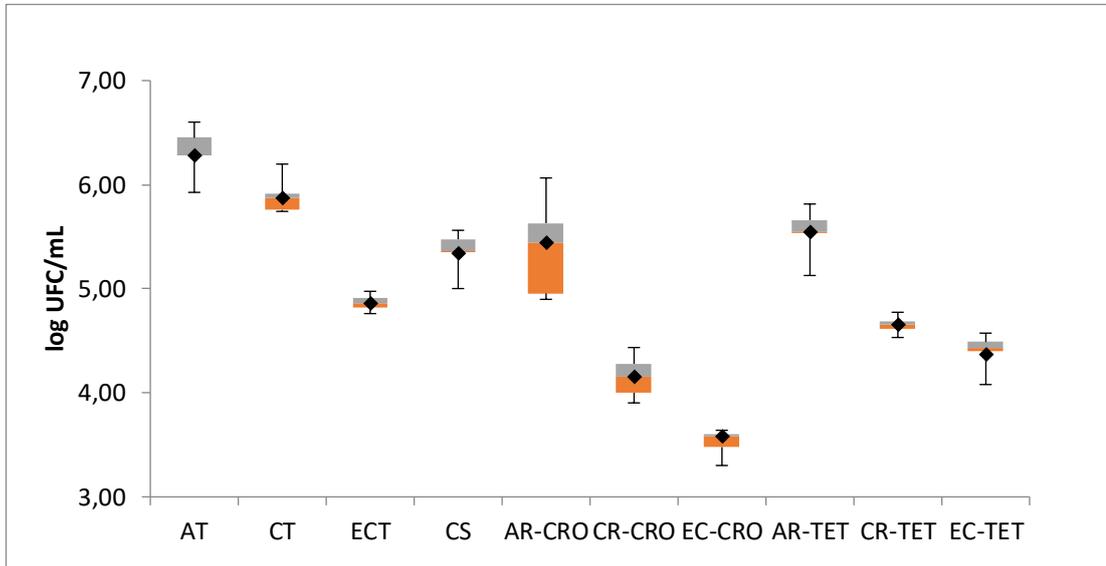
Anexo 5

Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Latacunga 2



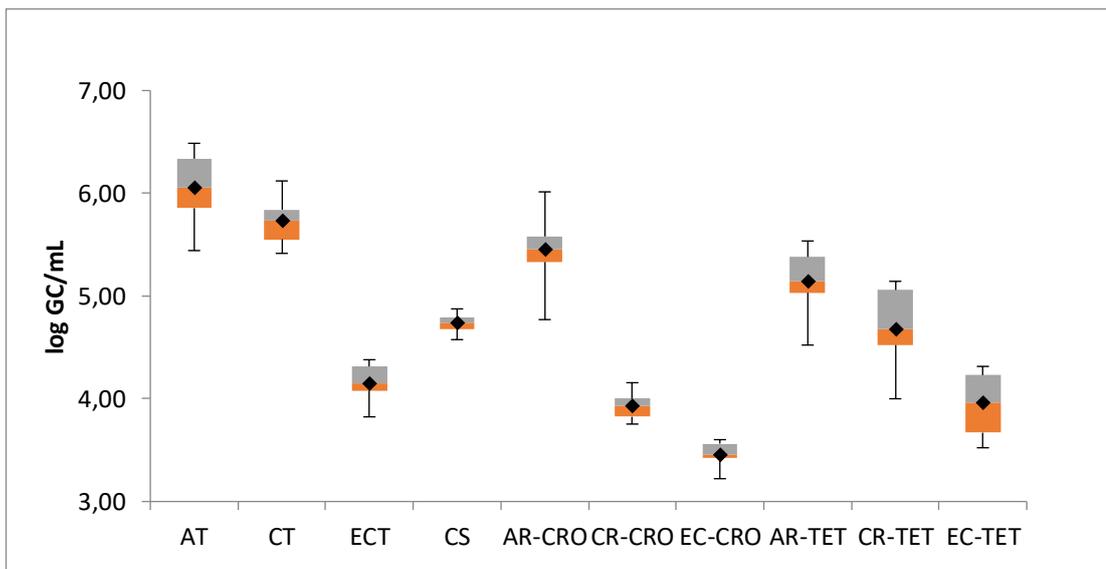
Anexo 6

Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Salcedo



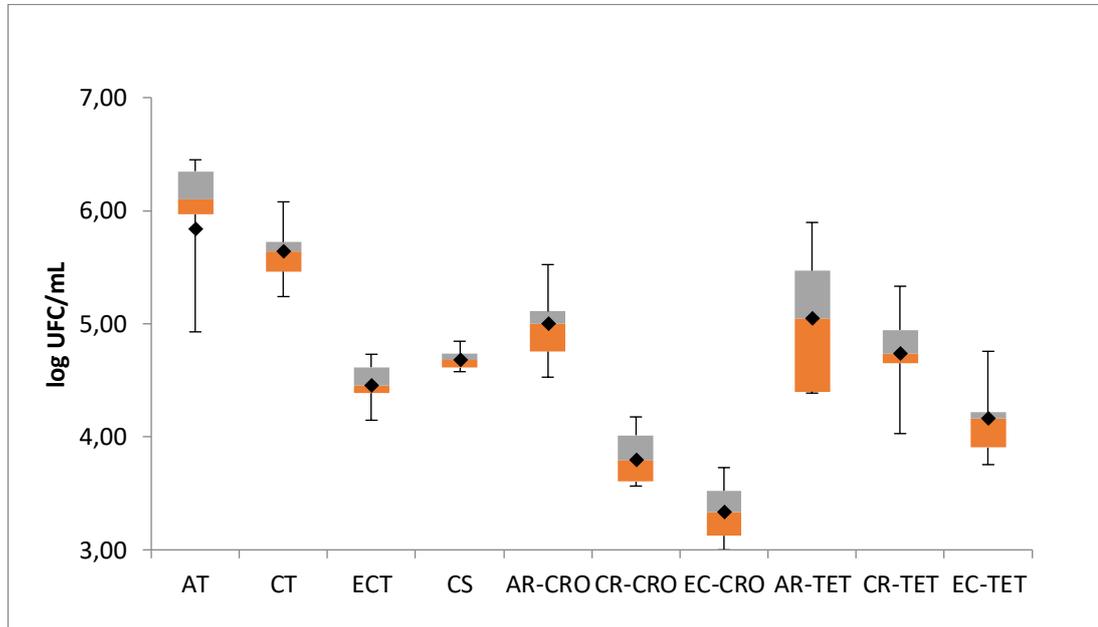
Anexo 7

Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Las Viñas



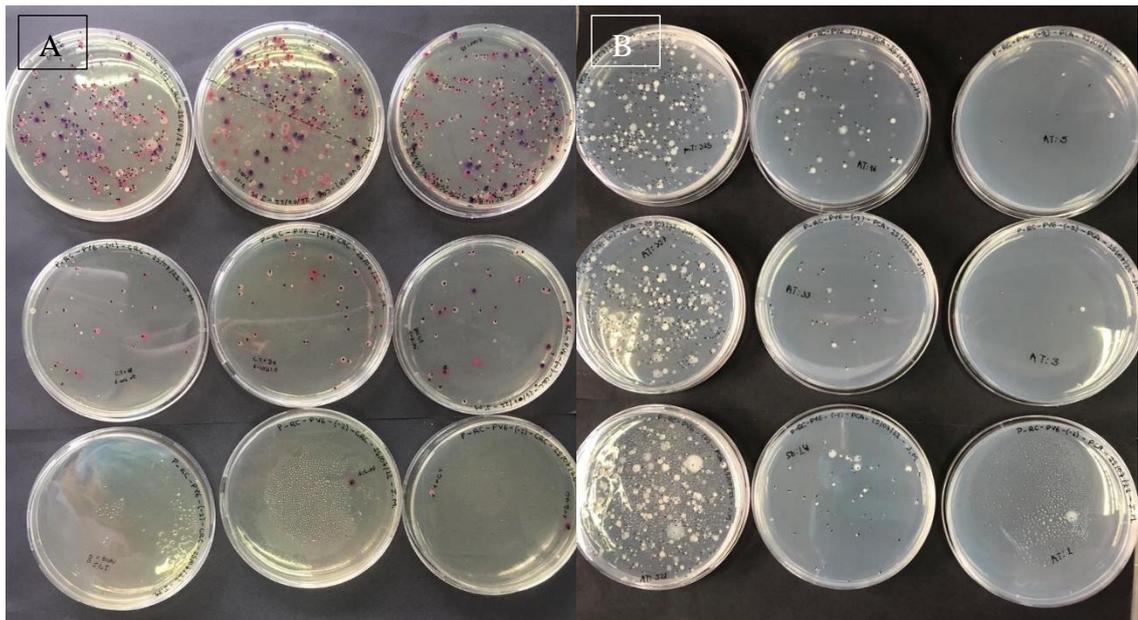
Anexo 8

Diagrama de caja de la concentración (\log_{10} UFC/mL) de indicadores fecales con y sin resistencia a CRO y TET en el punto Patate



Anexo 9

Cultivo de los indicadores microbianos fecales del punto Las Viñas. A) Medio Chromocult. B) Medio PCA



Análisis de varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABUNDANCIA RELATIVA	70	0,98	0,97	7,50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	217,15	15	14,48	146,54	<0,0001
PUNTO DE MUESTREO			175,48	6	29,25 296,05 <0,0001
INDICADORES DE CONTAMINACIÓN			41,67	9	4,63 46,86 <0,0001
Error	5,33	54	0,10		
Total	222,49	69			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,43043

Error: 0,0988 gl: 54

PUNTO DE MUESTREO	Mediasn	E.E.
Cotopaxi	0,37 10	0,10 A
Lasso	4,34 10	0,10 B
Patate	4,67 10	0,10 B C
Las-Viñas	4,73 10	0,10 B C D
Salcedo	5,01 10	0,10 C D
Latacunga-1	5,08 10	0,10 C D
Latacunga-2	5,16 10	0,10 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,55429

Error: 0,0988 gl: 54

INDICADORES DE CONTAMINACIÓN				Mediasn	E.E.		
E.coli-CRO	2,99	7	0,12	A			
Coliformes-CRO	3,32	7	0,12	A	B		
E.coli-TET	3,60	7	0,12		B	C	
E.coli	3,95	7	0,12		C	D	
Coliformes-TET	4,01	7	0,12			C	D
Fagos-Somaticos	4,24	7	0,12				D
Aerobios-CRO	4,49	7	0,12				D
Aerobios-TET	4,50	7	0,12				D
Coliformes	5,17	7	0,12				E
Aerobios-Totales	5,67	7	0,12				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Pruebas Unifrac ponderada y no ponderada

Anexo 10

Tabla de los valores obtenidos de la prueba Unifrac ponderada (WSig)

Tree#	Groups	WScore	WSig
1	Lasso - Latacunga 1	0,087394	<0.0010
1	Lasso – Latacunga 2	0,062268	0,837
1	Latacunga 1 - Latacunga 2	0,088788	0,267
1	Lasso - Salcedo	0,053656	0,981
1	Latacunga 1 - Salcedo	0,127789	<0.0010
1	Latacunga 2 - Salcedo	0,068213	0,973
1	Lasso - Patate	0,058681	0,927
1	Latacunga 1 - Patate	0,148561	0,003
1	Latacunga 2 - Patate	0,077616	0,39
1	Salcedo - Patate	0,050689	1
1	Lasso - Cotopaxi	0,106984	<0.0010
1	Latacunga 1 - Cotopaxi	0,224516	<0.0010
1	Latacunga 2 - Cotopaxi	0,138757	<0.0010
1	Salcedo - Cotopaxi	0,170313	<0.0010
1	Patate - Cotopaxi	0,268117	<0.0010
1	Lasso – Las Viñas	0,061576	0,246
1	Latacunga 1 – Las Viñas	0,084447	<0.0010
1	Latacunga 2 – Las Viñas	0,044928	1
1	Salcedo – Las Viñas	0,047352	0,817
1	Patate – Las Viñas	0,052138	0,982
1	Cotopaxi – Las Viñas	0,098392	<0.0010

Anexo 11*Tabla de los valores obtenidos de la prueba Unifrac no ponderada (UWSig)*

Tree#	Groups	UWScore	UWSig
1	Lasso - Latacunga 1	0,852436	<0.0010
1	Lasso – Latacunga 2	0,808638	<0.0010
1	Latacunga 1 - Latacunga 2	0,815164	<0.0010
1	Lasso - Salcedo	0,832385	<0.0010
1	Latacunga 1 - Salcedo	0,869221	<0.0010
1	Latacunga 2 - Salcedo	0,822487	<0.0010
1	Lasso - Patate	0,809332	<0.0010
1	Latacunga 1 - Patate	0,857623	<0.0010
1	Latacunga 2 - Patate	0,808229	<0.0010
1	Salcedo - Patate	0,806364	<0.0010
1	Lasso - Cotopaxi	0,915405	<0.0010
1	Latacunga 1 - Cotopaxi	0,933271	<0.0010
1	Latacunga 2 - Cotopaxi	0,924316	<0.0010
1	Salcedo - Cotopaxi	0,937611	<0.0010
1	Patate - Cotopaxi	0,92317	<0.0010
1	Lasso – Las Viñas	0,832788	<0.0010
1	Latacunga 1 – Las Viñas	0,867612	<0.0010
1	Latacunga 2 – Las Viñas	0,831295	<0.0010
1	Salcedo – Las Viñas	0,843642	<0.0010
1	Patate – Las Viñas	0,83876	<0.0010
1	Cotopaxi – Las Viñas	0,930673	<0.0010