



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA EN MANEJO Y
CONSERVACIÓN DEL MEDIO AMBIENTE

COMPARACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS
EN ECOSISTEMAS CONTRASTANTES DE CUENCAS
HIDROGRÁFICAS EN LOS CANTONES PUYANGO Y
PUYO, ECUADOR



*TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE
INGENIERA EN MANEJO Y CONSERVACIÓN DEL
MEDIO AMBIENTE*

AUTORA

Lourdes Tamara Maita Fernández

DIRECTOR

Biol. Alejandro Zury Rojas Mg, Sc.

ECUADOR – LOJA

2017


CERTIFICACIÓN

Biol. Alejandro Zury Rojas, Mg. Sc.
DIRECTOR DE TESIS

En calidad de Director de la tesis titulada **COMPARACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN ECOSISTEMAS CONTRASTANTES DE CUENCAS HIDROGRÁFICAS EN LOS CANTONES PUYANGO Y PUYO, ECUADOR**, de autoría de la señorita egresada de la Carrera de Ingeniería en Manejo y Conservación del Medio Ambiente, **Lourdes Tamara Maita Fernández**, certifico que la investigación ha concluido dentro del cronograma aprobado, por lo que autorizo se continúe con el trámite de graduación.

Loja, diciembre del 2016

Atentamente,



Biol. Alejandro Zury Rojas Mg. Sc.
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICACIÓN

En calidad de Tribunal Calificador de la tesis titulada **COMPARACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN ECOSISTEMAS CONTRASTANTES DE CUENCAS HIDROGRÁFICAS EN LOS CANTONES PUYANGO Y PUYO, ECUADOR**, de autoría de la señorita egresada de la Carrera de Ingeniería en Manejo y Conservación del Medio Ambiente, **Lourdes Tamara Maita Fernández**, certificamos que se han incorporado al trabajo final de tesis todas las sugerencias efectuadas por sus miembros.

Por lo tanto autorizamos la publicación y difusión de la tesis.

APROBADA

Loja, 30 de marzo del 2017

Atentamente,

Ing. Aurita Gonzaga Figueroa, Mg. Sc.

.....
PRESIDENTA DEL TRIBUNAL

Ing. Diana Ochoa Cordillo, Mg. Sc.

.....
VOCAL DEL TRIBUNAL

Ing. Santiago Garcia Matailo, Mg. Sc.

.....
VOCAL DEL TRIBUNAL

AUTORÍA

Yo **Lourdes Tamara Maita Fernández** declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autora: Lourdes Tamara Maita Fernández

C.I. 1104697337

Fecha: 30 de marzo del 2017

Firma:



CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO

Yo, Lourdes Tamara Maita Fernández declaro ser autora de la tesis titulada **COMPARACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN ECOSISTEMAS CONTRASTANTES DE CUENCAS HIDROGRÁFICAS EN LOS CANTONES PUYANGO Y PUYO, ECUADOR**, como requisito a optar al grado de: Ingeniera en Manejo y Conservación del Medio Ambiente, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en le Repositorio Digital Institucional, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 30 días del mes de marzo del 2017, firma la autora.



Lourdes Tamara Maita Fernández
C.I.: 1104697337

Dirección: Tebaida Baja, Loja, Ecuador.
Correo electrónico: tamar.maita@gmail.com – lu.tamys@gmail.com
Teléfono: 0992936080

Director de tesis: Biol. Alejandro Zury Rojas, Mg. Sc.
Tribunal: Ing. Aurita Gonzaga Figueroa, Mg. Sc.
Ing. Diana Ochoa Gordillo, Mg. Sc.
Ing. Santiago García Matailo, Mg. Sc.

AGRADECIMIENTO

“La vida en la tierra se hace un placer junto a tu naturaleza”

Las palabras que describen mi más sincero agradecimiento se plasman en este espacio. A la Universidad Nacional de Loja, a la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, a la Carrera de Ingeniería en Manejo y Conservación del Medio Ambiente y a todos los docentes que compartieron sus conocimientos y experiencias para mi formación, siendo claves para mi desenvolvimiento profesional.

Gracias al Dr. Roldan Torres y al Centro de Biotecnología donde se desarrolló el presente proyecto de investigación, quién de manera desinteresada me brindo sugerencias y su orientación en la elaboración de este proyecto, y de manera especial, dando mi gratitud al director de tesis, Biol. Alejandro Zury Rojas por sus aportes y sugerencias brindadas a los largo de este trabajo.

Durante mi formación encontré amigos y compañeros que me ayudaron a superar mis metas con sus críticas y sugerencias, contribuyendo de una u otra manera para el logro de este trabajo.

Finalmente y de forma especial, gracias a dios, a mi familia y amigos por el apoyo incondicional y las enseñanzas de vida.

Tamara

DEDICATORIA

“Ni yo ni otro ninguno puede recorrer este camino en tu lugar; Tú, sólo tú, debes recorrerlo no es largo, está a tu alcance” W. Whitman.

He llegado a la primera parte de mi destino, esa pequeña alegría por los logros que vamos construyendo a lo largo de nuestra vida, lo cierto es que se llevaron a cabo gracias a mi familia, por ello el desarrollo de la presente investigación y mi logro profesional está dedicados a mi papá Rolando y mi mamá Beatriz, que fueron los pilares fundamentales, supieron apoyarme en cada decisión y me inspiraron a ser mejor persona.

A mis hermanas Eliana, Paola y a mi hermano Diego Gabriel, por su paciencia y comprensión, los quiero tanto y estaremos brindándonos apoyo para cumplir cada una de nuestras metas. A mi hermano Diego Rolando quien bendice y cuida de mí, siempre te voy querer.

El privilegio de contar con dos personitas que alegraron mi vida con sus ocurrencias y cariño, a mis sobrinos Andresito y Luisanita, los quiero mucho.

Ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado, son mi vida y mi fortaleza.

ÍNDICE GENERAL

PORTADA	i
CERTIFICACIÓN DIRECTOR DE TESIS	ii
CERTIFICACIÓN TRIBUNAL DE GRADO	iii
AUTORÍA	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE GENERAL	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
1 INTRODUCCIÓN	4
2 REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Cuenca Hidrográfica	6
2.2 Comunidades Bacterianas	6
2.2.1 Comunidades bacterianas en ecosistemas terrestres y acuáticos	7
2.2.2 Importancia estudios de comunidades bacterianas	8
2.3 Genética bacteriana	9
2.3.1 Estructura del genoma bacteriano	10
2.4 Caracterización de Comunidades Bacterianas	10
2.4.1 Caracterización fenotípica, morfológica - cultural o tradicional	10
2.4.2 Morfología celular y su importancia	16
2.4.3 Caracterización genotípica o molecular	17
2.4.4 Análisis del 16S ARNr.....	18
3 MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Área de Estudio	20
3.1.1 Ubicación política y geográfica	20
3.2 Materiales.....	22
3.3 Metodología	23
3.3.1 Cuantificación y caracterización morfo-cultural de comunidades bacterianas	23
3.3.2 Comparación comunidades bacterianas obtenidas en cada localidad de estudio, según la cuantificación y características morfo culturales.	23

3.3.3	Identificación molecular de aislados bacterianos obtenidos, resultantes de la variabilidad morfo-cultural y análisis filogenético de las mismas.	24
3.3.4	Amplificación de los genes de la región 16S ARNr	24
4	RESULTADOS	26
4.1	Cuantificar y caracterizar morfo-culturalmente las comunidades bacterianas de las muestras de agua de Puyango (Loja-Sierra) y Puyo (Pastaza-Amazónia) respectivamente.....	26
4.1.1	Toma de muestras de agua y sedimentos	26
4.1.2	Diluciones seriadas cuantitativas	26
4.1.3	Siembra en cajas Petri, cuantificación y diversidad de colonias bacterianas..	26
4.1.4	Análisis morfo cultural de los aislados bacterianos	28
4.1.5	Cuantificación de las comunidades bacterianas.....	29
4.1.6	Caracterización morfo-cultural comunidad bacterianas	36
4.2	Comparación comunidades bacterianas obtenidas en cada localidad de estudio, según la cuantificación y las características morfo-culturales.	43
4.2.1	Comparación de comunidades bacterianas en base a la cinética de crecimiento.....	43
4.2.2	Comparación de comunidades bacterianas en base a la caracterización morfo-cultural	45
4.3	Identificación molecular de los aislados bacterianos obtenidos y determinación de las relaciones filogenéticas, resultantes de la variabilidad morfo-cultural.	48
5	DISCUSIÓN	50
5.1	Cuantificación y caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas de las muestras de agua Puyango (Loja-Sierra) y Puyo (Pastaza-Amazonia) respectivamente.	50
5.1.1	Cuantificación de las comunidades bacterianas.....	50
5.1.2	Morfología de las colonias bacterianas	52
5.2	Comparación de las comunidades bacterianas obtenidas en cada localidad de estudio, según la cuantificación y las características morfo-culturales.	54
5.3	Identificación molecular de los aislados bacterianos obtenidos y determinación de las relaciones filogenéticas, resultantes de la variabilidad morfo-cultural.	56
6	CONCLUSIONES	58
7	RECOMENDACIONES	59
8	BIBLIOGRAFÍA	60
9	ANEXOS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Bacterias presentes en el agua	8
Tabla 2	Materiales y reactivos	22
Tabla 3	Caracterización morfo cultural de comunidades bacterianas de muestras de agua en la microcuenca Puyo	37
Tabla 4	Caracterización morfo cultural de comunidades bacterianas de muestras de agua en la microcuenca Puyango.....	38
Tabla 5	Caracterización morfo cultural de comunidades bacterianas de muestras de sedimentos en la microcuenca Puyo	39
Tabla 6	Caracterización morfo cultural de comunidades bacterianas de muestras de sedimentos en la microcuenca Puyo	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Árbol filogénico de bacteria. Construido a partir de las secuencias del RNA ribosómico 16S. 17 grupos principales de Bacteria. Datos obtenidos de la base de datos del proyecto de secuenciación del ribosoma.....	7
Figura 2	Tinción simple.....	11
Figura 3	Tinción de Gram, Tinción de Ziehl-Neelsen, etc.	11
Figura 4	Pasos tinción de Gram, diferenciación bacterias Gram positiva y negativa	12
Figura 5	Pared celular de bacterias Gram positiva y negativo	13
Figura 6	(A) <i>Bacillus anthracis</i> (Gram Positivo); (A) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram Negativo).....	13
Figura 7	Apariencia del crecimiento bacteriano, sembrado en Agar Nutriente donde: (A) Crecimiento filiforme, (B) Equinulado, (C) barbado, (D) difuso, (E) arborescente y (F) rizoides.....	14
Figura 8	Descripción macroscópica realizada en colonias creciendo sobre Agar Nutritivo, donde se aprecia la forma.	15
Figura 9	Formas celulares representativas de diferentes morfologías en procariontes.	16
Figura 10	Ubicación del área de estudio “Microcuenca Chinchal”, cuenca del río Puyango.....	20
Figura 11	Ubicación del área de estudio “Arroyos dentro de la Universidad Estatal Amazónica” cuenca del río Puyo	21
Figura 12	Extracción del ADN de comunidades bacterianas mediante protocolo de extracción Charge Switch gDNA Mini Bacteria Kit y amplificación de la subregión 16S rRNA, en base al fotodocumentador.	25
Figura 13	Esquematación del procedimiento para realizar las diluciones cuantitativas.....	27
Figura 14	Cuantificación y caracterización de las comunidades bacterianas en base a sus crecimiento bacteriano y características fenotípicas	28
Figura 15	Bacterias teñidas, tinción de Gram y observación de la tinción en el microscopio	29
Figura 16	Cinética de la cuantificación de comunidades bacterianas en muestras de aguas para 24, 48 y 168 horas después de cultivadas en medio Agar Nutritivo. A: río A-Puyo, B: río B-Puyo, C: río LA-Puyango, D: río CH-Puyango. Letras desiguales entre las muestras difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. Errores estándares A: 0.24, B: 1.99, C: 1.05, D: 1.09.....	31
Figura 17	Cinética de la cuantificación de comunidades bacterianas en muestras de sedimentos para 24, 48 y 168 horas después de cultivadas en medio Agar	

	Nutritivo. A: río A-Puyo, B: río B-Puyo, C: río LA-Puyango, D: río CH-Puyango. Letras desiguales entre las muestras difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. Errores estándares A: 4.18, B: 7.41, C: 1.46, D: 1.62.....	33
Figura 18	Comportamiento de las comunidades bacterianas por río en las localidades de Puyo y Puyango a las 24, 48 y 168 horas. A: muestras de aguas, B: muestras de sedimentos. Letras desiguales en cada grupo de columnas difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. Errores estándares A- 24 h: 0.42, 48 h: 1.27, 168 h: 0.86; B- 24 h: 1.53, 48 h: 3.36, 168 h: 3.56.	35
Figura 19	Tinción de Gram identificados en la microcuenca del río Puyo. (A) Coco Gram positivo; (B) Bacillus corto Gram positivo; (C) Bacillus corto Gram negativo; (D) Estreptococos Gram positivo; (E) Coco gram positivo agrupado en racimos; (F) Bacillus Gram negativo.....	41
Figura 20	Tinción de Gram identificados en la microcuenca del río Puyango. (A) Bacillus Gram positivo; (B) Bacillus largo Gram positivo; (C) Sarcinas coco Gram positivo; (D) Bacillus corto Gram positivo; (E) Bacillus corto Gram negativo; (F) Sarcinas Gram positivo; (G) Micrococos Gram positivo; (H) Bacillus Gram negativo; (I) Coco Gram positivo	42
Figura 21	Cuantificación total de comunidades bacterianas por ríos en Puyo y Puyango. A: muestras de aguas, B: muestras de sedimentos. Letras desiguales en cada grupo de columnas difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. Errores estándares A- Puyo: 1.25, Puyango: 9.50; B- Puyo: 11.03, Puyango: 3.67.....	43
Figura 22	Cuantificación total de comunidades bacterianas por muestras de agua y sedimentos en Puyo y Puyango. Letras desiguales en cada grupo de columnas difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. Errores estándares Agua: 2.03, Sedimentos: 6.19	44
Figura 23	Comparación caracterización morfológica y cultural muestras de agua....	46
Figura 24	Comparación caracterización morfológica y cultural muestras de agua....	47
Figura 25	Electroforesis en gel de agarosa obtenidos mediante PCR del ADN de las bacterias de las muestras de agua y sedimentos extraídos de las microcuencas ubicadas en Puyo y Puyango.....	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Conteo de las UFC g sedimento-1, Puyo.....	66
Anexo 2	Conteo de las UFC ml-1 de agua, Puyo.....	67
Anexo 3	Conteo de las UFC g sedimento ⁻¹ , Puyango	68
Anexo 4	Conteo de las UFC ml-1 de agua, Puyango	69
Anexo 5	Caracterización morfológica de las colonias bacterianas obtenidas de los aislamientos en muestras de agua de la cuenca Puyo	70
Anexo 6	Caracterización morfológica de las colonias bacterianas obtenidas de los aislamientos en muestras de agua de la cuenca Puyango	71
Anexo 7	Caracterización morfológica de las colonias bacterianas obtenidas de los aislamientos en muestras de sedimentos de la cuenca Puyo.....	72
Anexo 8	Caracterización morfológica de las colonias bacterianas obtenidas de los aislamientos en muestras de sedimentos cuenca Puyango	73

**COMPARACIÓN DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN
ECOSISTEMAS CONTRASTANTES DE CUENCAS
HIDROGRÁFICAS EN LOS CANTONES PUYANGO Y
PUYO, ECUADOR**

RESUMEN

En este estudio se determinó la composición de las comunidades bacterianas en dos ecosistemas contrastantes del Ecuador, ubicados en la cuenca hidrográfica Puyango situado al sur del Ecuador representando un ecosistema degradado, y la cuenca del Puyo dentro de la UEA en la amazonia, la cual presenta característica de ser un ecosistema en estado de conservación. Es por ello que se tuvo como objetivo caracterizar y comparar comunidades bacterianas en muestras de agua y sedimentos, presentando diferencias en los microorganismos encontrados en cada lugar de muestreo, permitiendo evaluar su estado natural. Los resultados obtenidos permitieron evidenciar la cinética de crecimiento de las unidades formadoras de colonias (UFC), la cual en ambos ecosistemas presentaron un crecimiento asincrónico por la diferencia del ciclo celular, estableciendo su fase de crecimiento dentro de las 24 y 72 horas, determinando así la mayor composición de la comunidad bacteriana y su mayor variabilidad presentes en muestras de sedimentos, en ambas zonas de estudio, además sus características morfológicas permitieron identificar el tipo de microorganismo, presentado en su mayoría microorganismos *Bacillus* corto Gram positivo, y sus características singulares identificaron miembros de género *Bacillus*, *Coco*, *Micrococo*, *Spirillum* y *Sarcinas*. Posteriormente se logró la amplificación de los genes de la subregión 16S rRN. No obstante no se logró identificar la especie de cada aislado debido a la falta de insumos para la secuenciación molecular en la secuenciación del ADN.

ABSTRACT

This study determined the composition of bacterial communities in two contrasting ecosystems of Ecuador, located in the Puyango basin located to the south of Ecuador representing a degraded ecosystem, and the Puyo basin within the UEA in the Amazon, which presents Characteristic of being an ecosystem in a state of conservation. For this reason, the objective was to characterize and compare bacterial communities in water and sediment samples, presenting differences in the microorganisms found at each sampling site, allowing the evaluation of their natural state. The results obtained allowed to show the growth kinetics of the colony forming units (UFC), which in both ecosystems showed an asynchronous growth due to the difference in the cell cycle, establishing its growth phase within 24 and 72 hours, thus determining The greater composition of the bacterial community and its greater variability present in sediment samples, in both study areas, in addition their morphological characteristics allowed to identify the type of microorganism, presented mostly Gram-positive *Bacillus* microorganisms, and their unique characteristics identified members Of genus *Bacillus*, *Coco*, *Micrococo*, *Spirillum* and *Sarcinas*. Subsequently the amplification of the genes of the subregion 16S rRN was achieved. However, it was not possible to identify the species of each isolate due to the lack of inputs for molecular sequencing in DNA sequencing.

1 INTRODUCCIÓN

La protección de los recursos hídricos es un tema que día a día cobra mayor importancia (Umaña Gómez, 2002). Por lo tanto el agua forma parte de todos los procesos naturales de la tierra, teniendo impacto en todos los aspectos de la vida. Cada organismo depende del agua, convirtiéndose en el eje primordial del desarrollo de la sociedad, y parte integral del medio ambiente, resultando imprescindible para el buen funcionamiento de la biosfera (Mejía, 2005; UNESCO, 2007).

Los estudios realizados en cuencas hidrográficas son una herramienta muy importante para comprender y evaluar el equilibrio que existe entre el medio ambiente y el ser humano. Considerado como un sistema biofísico que drena agua, sedimentos y nutrientes de un punto en un canal de arroyo o un río, definida por los límites topográficos. Una de sus características fundamentales es que en su territorio se producen la interacción e interdependencia entre los sistemas físico y bióticos (Cordero, 2013; Brooks *et al.*, 2012), además existe una gran diversidad biológica, paisajística, cultural y prioritariamente por su capacidad de retención y regulación de agua (Cortés *et al.*, 2007).

Ecuador es un país caracterizado por la heterogeneidad de su territorio y de su población. Con pocas características en común, la población ecuatoriana se distribuye espacialmente en forma desproporcionada ocasionando mucha presión sobre los recursos naturales en algunas zonas, mientras que en otras prácticamente no existe población activa (Cachipiendo, 2007).

Determinar el estado en que se encuentra un río o quebrada es un proceso necesario para protegerlo o restaurarlo por lo que es fundamental conocer su estado actual, particularmente cuando no se conocen las condiciones a las que ha estado expuesto o si ha estado sujeto por largo tiempo a perturbaciones antropogénicas (Villa, 2011).

Para conocer la calidad del agua es necesario analizar algunos parámetros, dentro de los que se incluyen la presencia de bacterias indicadoras del estado de los ecosistemas. Estas ayudan a comprender cómo las actividades humanas y otros factores bióticos influyen en el estado natural de una cuenca hidrográfica (Silva *et al.*, 2012). Según Bastardo *et al* (2007), la composición estructural y funcional de las comunidades bacterianas es el principal índice del estado de los ecosistemas y se caracterizan por una actividad

fisiológica alta y rápida respuesta a los cambios ambientales. Es por ello que la diversidad microbiológica disminuye en respuesta a perturbaciones o estrés ambiental.

Considerando que en el Ecuador son muy escasos los estudios relacionados con las comunidades bacterianas y la calidad microbiológica del agua, es paradójico que en una región mega-diversa, las investigaciones en este campo de la ecología sean sumamente escasas.

Es imprescindible estimular los esfuerzos encaminados a determinar la cuantificación, composición y estructura de las comunidades bacterianas de diversos ecosistemas, por esta razón la presente investigación se desarrolló con la finalidad de comparar las diferentes comunidades bacterianas presentes en ecosistemas contrastantes del Ecuador, la cual se desarrolló en la cuenca del río Puyo dentro de la Universidad Estatal Amazónica, localizada en Pastaza, en la amazonia ecuatoriana, y en la cuenca hidrográfica del río Puyango ubicada en el cantón Puyango, provincia de Loja, sierra ecuatoriana. El estudio contribuirá con el conocimiento de las comunidades bacterianas y la calidad del agua de estas áreas, por esta razón se plantearon los objetivos expuestos a continuación:

Objetivo General

Comparar comunidades bacterianas en muestras de agua de ecosistemas contrastantes de Puyango (Loja) y Puyo (Amazonía), según su cuantificación, características morfo-culturales e identificación genética.

Objetivos Específicos

- ∞ Cuantificar y caracterizar morfo-culturalmente las comunidades bacterianas de las muestras de agua de Puyango (Loja-Sierra) y Puyo (Pastaza-Amazonía) respectivamente.
- ∞ Comparar las comunidades bacterianas obtenidas en cada localidad de estudio, según la cuantificación y las características morfo-culturales.
- ∞ Análisis molecular de los aislados bacterianos resultantes de la variabilidad morfo-cultural, basado en el análisis filogenético de las mismas.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Cuenca Hidrográfica

Una cuenca hidrográfica es la unidad territorial natural que capta la precipitación, por donde transita el escurrimiento y la escorrentía hasta un punto de salida en el cauce principal, o sea es un área delimitada por una divisoria topográfica que drena a un cauce común (Brook, 1989 citado por FAO 1993), la cual brinda múltiples e importantes servicios relacionados con el agua, desde los servicios directos de provisión de bienes o productos hasta la provisión de servicios indirectos tales como los de regulación, de hábitat y servicios ecosistémico (Aguirre, 2011)

SEMARNAT (2013), define que una cuenca hidrográfica permite entender espacialmente el ciclo hidrológico, así como cuantificar e identificar los impactos acumulados de las actividades humanas o externalidades (sedimentos, contaminantes y nutrientes) a lo largo del sistema de corrientes o red hidrográfica, que afectan positiva o negativamente la calidad y cantidad del agua, la capacidad de adaptación de los ecosistemas y la calidad de vida de sus habitantes.

Las cuencas hidrográficas están siendo gravemente afectados por el impacto del cambio climático global, perturbando a grandes zonas geográficas y millones de personas en todo el mundo, especialmente en las cordilleras de América Central y América del Sur (Torres *et al.*, 2014). Los impactos que se presentan tienen que ver directamente con la vida y el sustento de las poblaciones humanas que dependen de él, donde se benefician de sus funciones en temas tan básicos como el abastecimiento de agua dulce (Hofstede *et al.*, 2014).

2.2 Comunidades Bacterianas

En la naturaleza, las células viven asociadas a otras en conjuntos llamados poblaciones, encontrándose en un determinado ambiente, denominado hábitat. Las poblaciones celulares raramente viven solas en la naturaleza, antes bien se relacionan con otras formando las llamadas comunidades microbianas, que pueden estar integradas por células libres en medios acuáticos, pero a menudo forman los llamados biofilms (Madigan *et al.*, 2014).

Los microorganismos son organismos vivos que nos son visibles a simple vista (Madigan *et al.*, 2014), siendo los seres más primitivos y numerosos que existen en la Tierra,

colonizan todo ambiente sea suelo, agua y aire, participando de forma vital en todos los ecosistemas y están en interacción continua con todos los seres vivos. Se agrupan en dos categorías: procariotas y eucariotas, en la primera están las archaeas y las bacterias, mientras que en la segunda se encuentran hongos, algas y protozoarios (Montaño *et al.*, 2010)

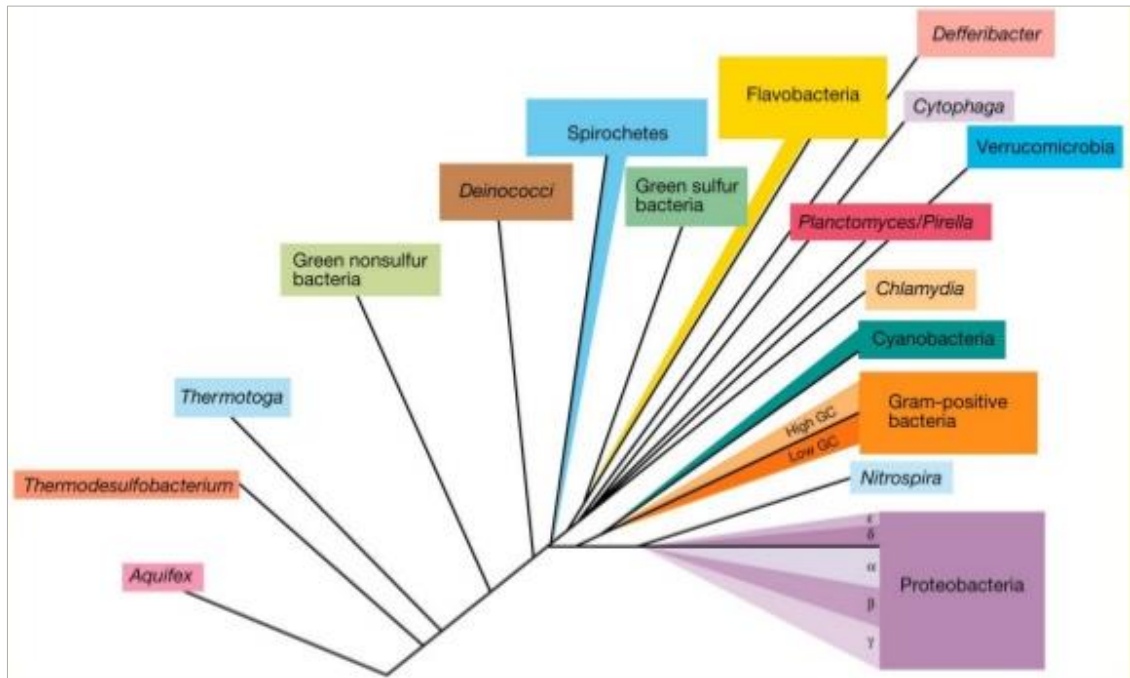


Figura 1 Árbol filogenético de bacteria. Construido a partir de las secuencias del RNA ribosómico 16S. 17 grupos principales de Bacteria. Datos obtenidos de la base de datos del proyecto de secuenciación del ribosoma.

Fuente: Madigan *et al.*, 2003

2.2.1 Comunidades bacterianas en ecosistemas terrestres y acuáticos

La composición estructural y funcional de las comunidades bacterianas es el principal índice del estado de los ecosistemas y se caracterizan por una actividad fisiológica alta y rápida respuesta a los cambios ambientales (Bastardo *et al.*, 2007).

Los estudios a realizarse ya sea para la valoración de los bienes y servicios ambientales, así como para el entendimiento de la dinámica de los sistemas ecológicos, la necesidad del reconocimiento y descripción de los organismos que están implicados en los procesos ecosistémico, así como la estructura de sus comunidades y la naturaleza de sus interacciones constituye una prioridad (Sabater *et al.*, 2009).

El contenido bacteriano es muy variable dependiendo del tipo de agua, la concentración de sales inorgánicas, sustancias orgánicas, enturbiamiento, iluminación y temperatura

(Serrano, 2014). Se han llegado a describir 16 grupos de bacterias tanto estrictas como facultativas de los medios hídricos, los cuales se detallan a continuación. (Marín, 2003).

Tabla 1. Bacterias presentes en el agua

BACTERIAS DE FORMA SIMPLE (EUBACTERIAS)			
Cocos	Grampositivos	Aerobios	<i>Micrococcus, Paracoccus, Lampropedia</i>
		Anaerobios	<i>Sarcina</i>
Bacilos sin espora	Gramnegativos Heterótrofos	Aerobios	<i>Pseudomonas, Zooglea, Azotobacter, Methylomonas, Alcaligenes, Photobacterium</i>
		Anaerobios	<i>Fusobacterium</i>
	Gramnegativos Quimioautótrofos	Aerobios	<i>Nitrobacter, Thiobacillus</i>
Bacilos con espora	Grampositivos	Aerobios	<i>Bacillus, Clostridium</i>
		Anaerobios	<i>Desulmofaculatum</i>
Células curvas o espirales	Gramnegativos	Aerobias	<i>Vibrio, Bdellovibrio</i>
		Anaerobias	<i>Spirillum, Desulfovibrio</i>
BACTERIAS DE FORMA COMPLEJA			
Bacterias fototróficas	Bacterias púrpura Chromatiáceas	Aerobias	<i>Choromatium, Thiocustis, Thispirillum, Thiocapsa, ThidioctyibmThiopedia, Ectothiorhodospira</i>
Rhodospirilláceas		Microaerófilas	<i>Rhodospirillum, Rhodopseudomonas, Rhodomicrobium</i>
	Clorobacterias		
BACTERIAS DE FORMA SIMPLE (EUBACTERIAS)			
Rhodospirilláceas	Chlobiáceas	Anaerobias	<i>Chlorobium, Prosthecochloris, Pelodictyon, Clathrochloris</i>
Bacterias vaginadas		Aerobias	<i>Sphaerotilus, Laptothrix, Crenothrix</i>
Bacterias pediculadas		Aerobias	<i>Hyphomicrobium, Rhodomicrobium, Caulobacter, Gallionella, Nevskia</i>
Actinomicetos	Bacterias Corinneformes	Aerobios	<i>Corynebacterium, Arthrobacter</i>
	Actinomicetos genuinos		<i>Nocardia, Streptomyces, Actinoplanes</i>
Espiroquetas		Aerobias	<i>Spirochaeta, Cristispira, Treponema Leptosira</i>
		Anaerobias	
Myoplasmas			<i>Thermoplasma?, Metallogenium?</i>
	Bacterias reptantes Beggiatoáceas Cytophagáceas	Aerobias, Anerobias	<i>Beggiatoa, Thioploca Cytophaga, Sporocytophaga, Flexibacter, Flexithrix</i>
	Leucothricháceas		<i>Leucothrix, Thiothrix</i>

Fuente: Marín, 2003; Serrano, 2014.

2.2.2 Importancia estudios de comunidades bacterianas

Los ecosistemas colonizados por microorganismos son tan variados como la propia biodiversidad. Algunos colonizan las superficies externas e internas de los organismos

superiores, otros llevan una vida libre en el ambiente, incluso ambientes inhóspitos conocidos como ambientes extremos. Tal multiplicidad de ecosistemas eleva a cifras astronómicas el número de bacterias que pueden vivir en la Tierra, lo cual se calcula en 4 a 6×10^{30} (Rodríguez *et al.*, 2005)

Se estima que pueden existir 1.2×10^{29} microorganismos en hábitats acuáticos y hasta 3.5×10^{30} en la sub-superficie oceánica. Por tanto, por su alta abundancia y diversidad, los microorganismos marinos representan un recurso biológico de gran importancia. Las comunidades microbianas caracterizadas podrán servir como bioindicadores para monitoreo del estado de salud y estabilidad funcional de los organismos y el ecosistema marino (Cristancho, 2016).

El estudio de la diversidad de procariontes ha estado muy limitado por muchos años debido a las dificultades para caracterizar los microorganismos después de su aislamiento en cultivos puros y a la inhabilidad de aislar aquellos microorganismos no cultivables. (García-Martínez, 1999). Los géneros bacterianos descritos como habitantes autóctonos del medio marino se encuentran incluidos en distintos grupos filogenéticos y presentan características fenotípicas muy diversas. La mayor parte de las bacterias identificadas de muestras de aguas son bacterias Gram negativas, mientras que en los sedimentos aparece una mayor proporción de Gram positivas (Miravet, 2003).

2.3 Genética bacteriana

Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que existen en la Tierra, colonizan todo ambiente: suelo, agua y aire, participando de forma vital en todos los ecosistemas y están en interacción continua con las plantas, animales y personas. Considerándolos claves para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida sobre el planeta, pues participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos (Montaño *et al.*, 2010)

Para conocer la adaptación de las bacterias en diferentes condiciones ambientales es importante conocer las bases genéticas, su información, como realizan y regulan su expresión y que mecanismos de variación genética poseen (Betancor *et al.*, 2012).

2.3.1 Estructura del genoma bacteriano

Toda la información genética es esencial para la vida de la célula bacteriana, está contenida en una única molécula de ADN de doble cadena, circular y covalentemente cerrado, a la que podemos referirnos como cromosoma bacteriano (Betancor et al, 2012).

En términos bioquímicos, la composición y estructura de los ácidos nucleicos bacterianos, es la misma que para cualquier célula. La variación entre los distintos nucleótidos que conforman la cadena de ácido nucleico, está dada por sus bases nitrogenadas, que en el caso del ADN son Adenina (A), Timinia (T), Citocina (C) y Guanina (G), y en el caso del ARN en vez de T se encuentra el Uracilo (U). A y G se denominan bases puricas o purinas, mientras que T, U y C se denominan bases pirimidinicas o piirimidinas. De esta manera, una cadena o hebra de ácido nucleico, tendrá una estructura primaria determinada por la secuencia de las bases que la componen (Betancor *et al.*, 2012).

2.4 Caracterización de Comunidades Bacterianas

La morfología colonial, es una característica indispensable a tener en cuenta en el aislamiento primario de una bacteria, y en la cual se debe considerar el borde y la elevación de la misma. Es importante apreciar la consistencia y la textura de la masa celular, pues también son características distintivas. Así como, también la pigmentación de la colonia, las películas continuas de crecimiento (bacterias mótilas), colonias lisas (generalmente virulentas), o colonias rugosas (generalmente avirulentas) (Rojas, 2011).

2.4.1 Caracterización fenotípica, morfológica - cultural o tradicional

La caracterización fenotípica o expresión del genotipo, es útil para diferenciar entre taxones tanto a nivel de filo como de especie y subespecie. Mediante esta caracterización se describen las características de la colonia, características morfológicas y características de tinción (Díaz Cárdenas, 2011)

Para la identificación de los organismos procariotas se utiliza la tinción, este proceso consiste en que las moléculas de un colorante se adsorben a una superficie. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la observación en microscopio óptico. Dado que las bacterias son casi incoloras, no presentan contraste con el medio en el cual se encuentran suspendidas y no pueden observarse claramente sin algún tratamiento previo (Santambrosio *et al.*, 2009).

De acuerdo a la reacción que ocurre, existen diferentes tipos de tinción:

a) **Tinción simple:** El colorante utilizado sirve solo para denotar la morfología celular, como se diferencia a continuación:

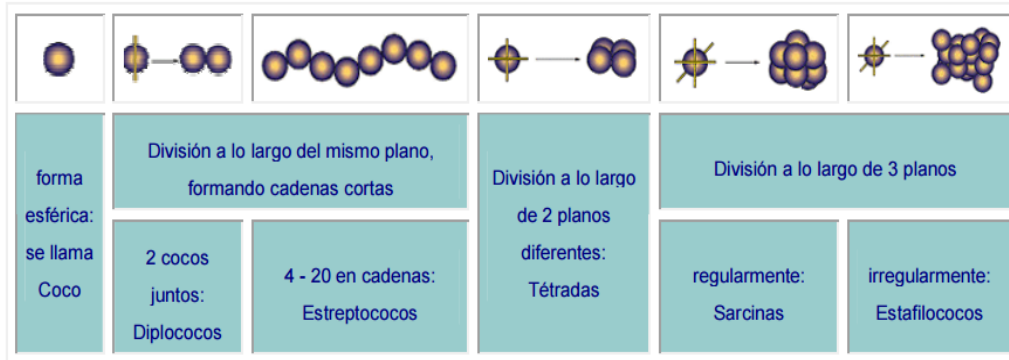


Figura 2 Tinción simple
Fuente: Santambrosio *et al.*, (2009)

b) **Tinción diferencial:** El colorante utilizado pone de manifiesto diferencias entre células bacterianas o entre partes de una misma célula. Estas técnicas utilizan más de un colorante o bien ciertos reactivos complementarios para la tinción.

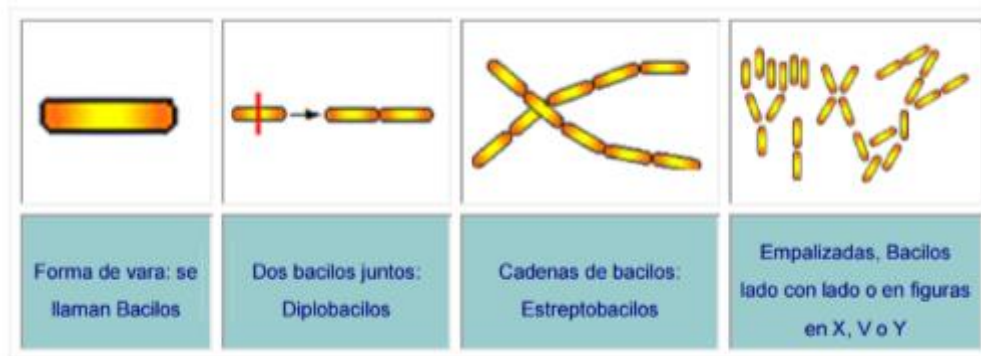


Figura 3 Tinción de Gram, Tinción de Ziehl-Neelsen, etc.
Fuente: Santambrosio *et al.*, (2009)

Se puede utilizar colorantes para teñir las células y aumentar así su contraste facilitando su observación. Los colorantes son compuestos orgánicos y cada tipo de colorante tiene afinidad por determinados componentes celulares. Entre los colorante catiónicos se pueden citar el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina. Dado que las superficies celulares están, por lo general, cargadas negativamente, estos colorantes se combinan con estructuras de la superficie de las células (Madigan *et al.*, 2014)

La tinción diferencial es muy importante y ampliamente usada en bacteriología es la denominada tinción de Gram (figura 4). Dependiendo de los resultados de esta tinción, las bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos Gram positivas y Gram negativas.

Su diferencia se debe a la estructura de la pared celular de las bacterias, de tal modo que el alcohol es capaz de decolorar las células Gram negativas pero no las Gram positivas (Madigan *et al.*, 2014).

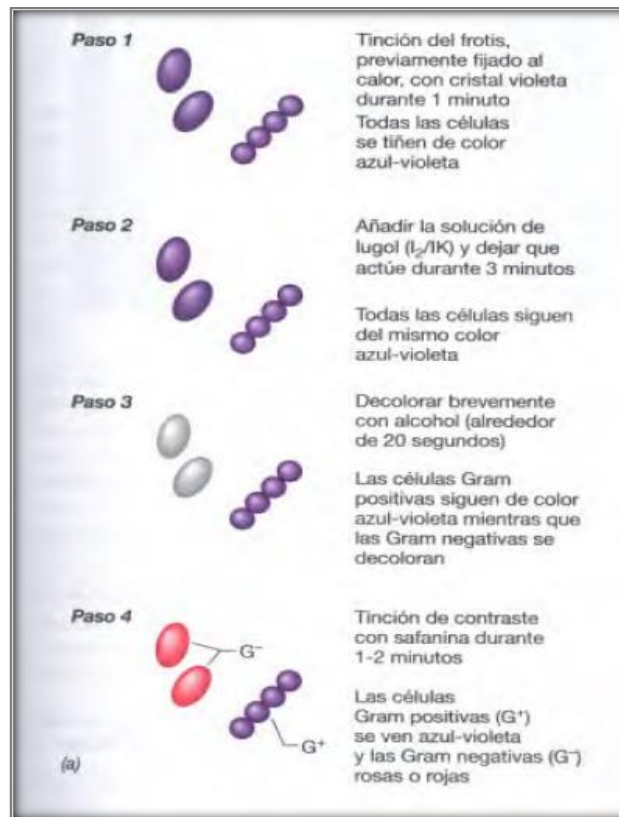


Figura 4 Pasos tinción de Gram, diferenciación bacterias Gram positiva y negativa
Fuente: Madigan *et al.*, 2003

La pared de la célula Gram positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, 80% y 90% de la pared de la célula Gram positiva es peptidoglicano. La pared de la célula Gram negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas (figura 5). Sólo 10% - 20% de la pared de la célula Gram-negativa es peptidoglicano (Santambrosio *et al.*, 2009).

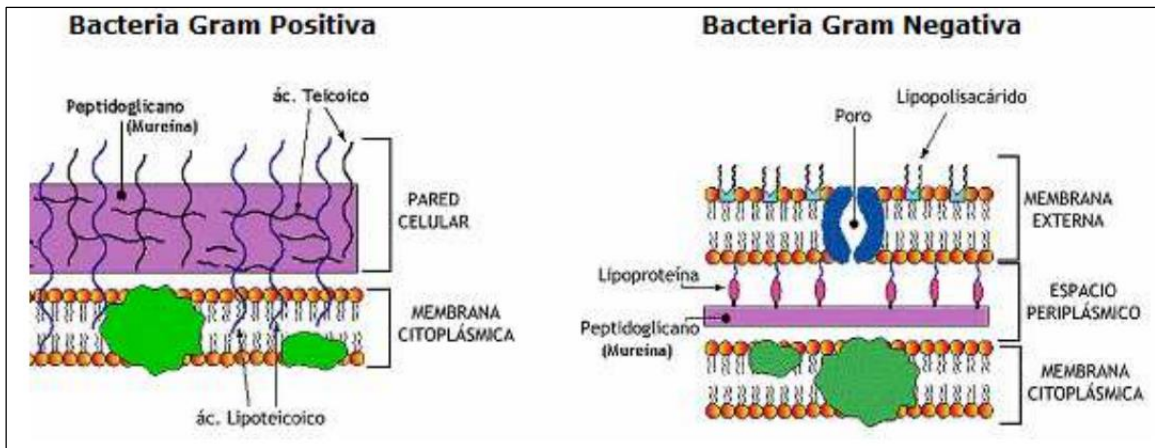


Figura 5 Pared celular de bacterias Gram positiva y negativo

Fuente: Santambrosio *et al.*, (2009)

Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen azules (Santambrosio *et al.*, 2009).

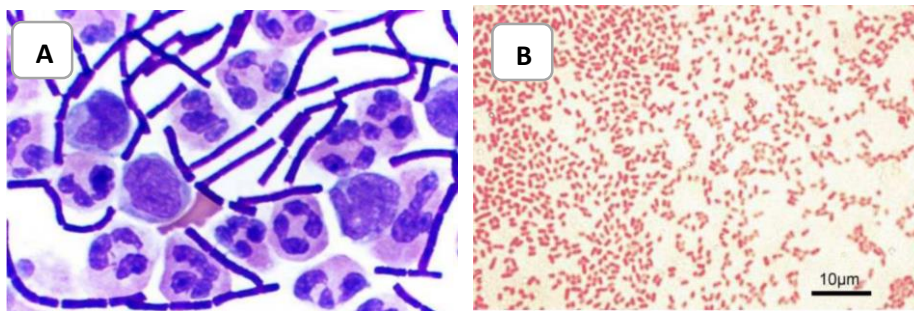


Figura 6 (A) *Bacillus anthracis* (Gram Positivo); (A) *Pseudomonas aeruginosa* (Gram Negativo)

➤ **Caracterización del crecimiento sobre Agar Nutriente**

Los cultivos en este medio se evalúan de la siguiente manera:

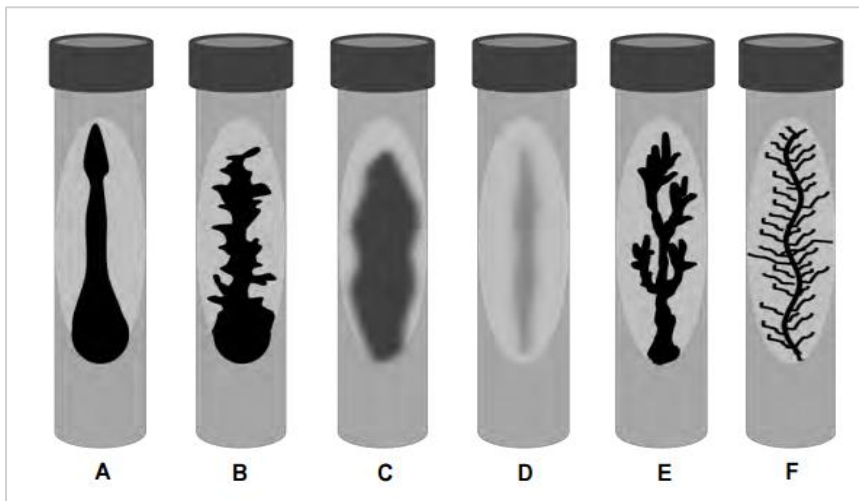


Figura 7 Apariencia del crecimiento bacteriano, sembrado en Agar Nutriente donde: (A) Crecimiento filiforme, (B) Equinulado, (C) barbado, (D) difuso, (E) arborescente y (F) rizoide.

Fuente: Rojas Triviño, 2011

- **Apariencia:** La apariencia del crecimiento de la siembra en una sola línea sobre la superficie del agar inclinado se designa de la siguiente forma:
- **Filiforme:** crecimiento en forma de hilo con bordes lisos continuos.
- **Equinulado:** crecimiento en forma de hilo con bordes irregulares continuos.
- **Barbado:** colonias semi-confluentes o no confluentes.
- **Difuso:** crecimiento difuso y reducido.
- **Arborescente:** crecimiento en forma de árbol.
- **Rizoide:** crecimiento en forma de raíz.

➤ **Caracterización del crecimiento de placas de Agar Nutritivo**

La descripción se realiza sobre las colonias formadas (agrupamiento bacteriano originado por el crecimiento y observable macroscópicamente), de forma aislada y se evalúa de la siguiente manera:

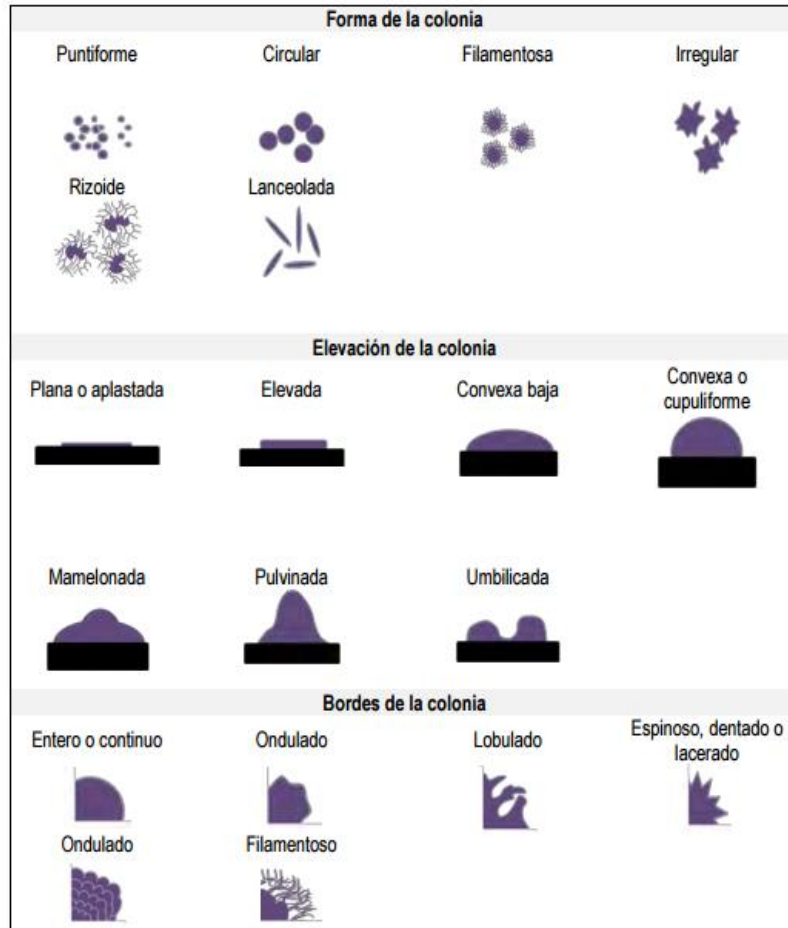


Figura 8 Descripción macroscópica realizada en colonias creciendo sobre Agar Nutritivo, donde se aprecia la forma.

Fuente: Rojas, 2011

- **Forma:** Puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide y lanceolada.
- **Borde:** De borde regular (continuo), de borde irregular (ondulado, lobulado, espinoso/dentado/lacerado, ondulado y filamentoso).
- **Elevación:** Plana o aplastada (no elevación), elevada (convexa baja, convexa cupuliforme, mamelonada, pulvinada y umbilicada).
- **Aspecto:** Brillante, opaco y mate traslúcido.
- **Pigmento:** De diferente color.

2.4.2 Morfología celular y su importancia

El término morfología hace referencia a la forma de un organismo. Entre los procariotas se presentan varias morfologías y existen términos apropiados para describirlas (Madigan et al, 2003). La morfología de las colonias es un parámetro importante en el proceso de identificación bacteriana, siendo estas características, comunes en cada género bacteriano. Sin embargo, la morfología puede alterarse por el tiempo de incubación, composición del medio de cultivo (excesiva desecación o humedad), etc. Esta descripción es también aplicable a levaduras, debido a que estas presentan crecimientos típicos bacterianos (Rojas, 2011).

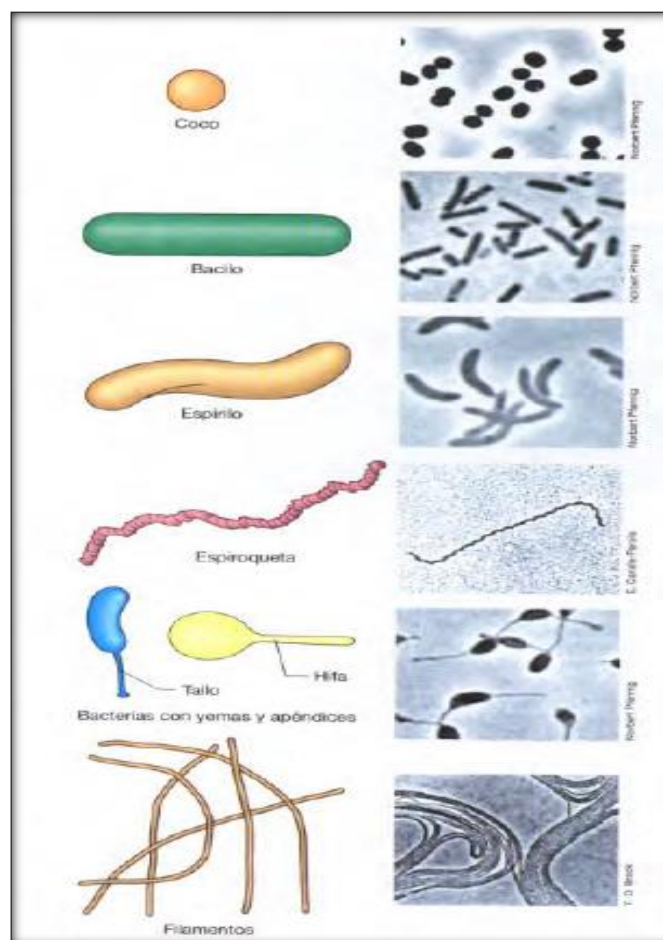


Figura 9 Formas celulares representativas de diferentes morfologías en procariotas.

Fuente: Madigan et al, 2003

La figura 9 indica algunas representaciones esquemáticas de morfologías bacterianas típicas junto con micrografía obtenidas por contraste de fases. A las bacterias con forma esférica u ovoide se les denomina cocos. A las bacterias con forma cilíndrica se les denomina bacilos. Algunos bacilos se curvan en forma espiral, y se llaman entonces espirilos. Las células de muchas procariotas se mantienen juntas después de la división

celular formando grupos, y estas asociaciones frecuentemente son características de diferentes organismos. Algunos cocos o bacilos pueden formar largas cadenas. En otras ocasiones, los cocos pueden formar finas capas de células, estructuras tridimensionales cúbicas o agrupaciones irregulares.

2.4.3 Caracterización genotípica o molecular

La identificación de microorganismos puede permitir evaluar la patogenicidad y virulencia de una cepa, así como su uso y aplicación en procesos biotecnológicos (Jiménez, 2009); por lo tanto la caracterización de comunidades microbianas mediante técnicas moleculares se ha impuesto rápidamente debido a la gran cantidad de información que proporciona y a la relativa facilidad metodológica que implican los análisis de estos compuestos, especialmente tras el gran desarrollo tecnológico que ha experimentado la biología molecular durante los últimos 20 años (Gaona *et al.*, 2012; Cedeño, 2005).

Los métodos moleculares están reemplazando a los tradicionales para el estudio y análisis de comunidades bacterianas, estas técnicas son rápidas y proveen un perfil de la diversidad genética de una comunidad bacteriana. Entre los métodos moleculares se pueden destacar las siguientes técnicas (Cedeño, 2005):

- ❖ Reasociación del ADN (ácido desoxiribonucleico)
- ❖ Hibridización del ADN
- ❖ Clonación y secuenciación del ADN
- ❖ Electroforesis de geles con gradientes denaturante (DGGE)
- ❖ Electroforesis de geles con gradientes de temperatura (TGGE)
- ❖ Análisis de los espacios intergénicos ribosomales (RISA)
- ❖ Análisis de los espacios intergénicos ribosomales automatizados (ARISA)

El método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE) han sido efectivos para estudiar la diversidad microbiana en varios ecosistemas. Con la utilización de la PCR se han podido encontrar secuencias de todos los procariotes; y para el DGGE cambios en las comunidades microbianas muestreadas en diferentes tiempos (Gaona *et al.*, 2012).

Estas técnicas moleculares permiten estudiar los microorganismos a partir de sus ácidos nucleicos. El procedimiento básico consiste en extraer el ADN de la muestra y amplificar

por PCR los fragmentos de ADN de interés para nuestro análisis. La secuencia de ADN más utilizada es el ARN ribosómico, particularmente el gen 16S en el caso de procariotas (Jiménez, 2009).

Los genes del ARN ribosómico presenta una serie de ventajas, tales como: (i) están presentes en todos los organismos, (ii) poseen regiones conservadas que facilitan su comparación y análisis y (iii) presentan suficiente variabilidad entre especies para permitir su diferenciación por lo que pueden ser usadas como un marcador filogenético (Jiménez, 2009).

La obtención de la información genotípica incluye metodologías basadas en el análisis del ADN, que incluye la secuenciación del gen que codifica para subunidad pequeña del 16S ARNr, la determinación del contenido G + C, la detección de perfiles de agrupamiento de fragmentos de ADN que se basan generalmente en la variación característica de sitios de restricción genómica. (Díaz 2011)

2.4.4 Análisis del 16S ARNr

El análisis de la secuencia del 16s ARNr ha sido ampliamente usado en sistemática procariota por ser un marcador molecular que permite generar árboles genealógicos que representan líneas de descendientes. El análisis del 16S ARNR produce valores numéricos de similitud entre secuencias del 16S ARNr que puede ser usado como un límite para circunscribir taxones teniendo en cuenta que aunque la secuencia por sí sola no describe una especie, si proporciona la primera evidencia de que una nueva especie ha sido aislada (Díaz 2011).

El gen ARNr 16S ha sido el más estudiado debido al tamaño de la molécula (aproximadamente 1650 bases) y la cantidad relativa de información que aporta. En la actualidad se dispone de aproximadamente, unas 22000 secuencias completas de gen ARNr 16S procedentes de organismos cultivados y no cultivados, lo que ha permitido reconocer la existencia de nuevas especies y la reubicación de otras aparentemente similares (Miravet, 2003)

La secuenciación permiten interpretaciones cuantitativas y directas, además que van conformando una creciente base de datos para subsecuentes referencias (Herrera, 2002). Ya que consiste en el estudio de la secuencia total de nucleótidos del genoma del microorganismo, pero actualmente se utilizan los estudios del ARNr 16S o 18S, porque

son secuencias que se han mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución, y por eso se ven claramente las diferencias entre los distintos microorganismos y se pueden realizar árboles filogenéticos y esquemas evolutivos (Herrera, 2002).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de Estudio

El presente estudio se realizó en dos ecosistemas referenciales del Ecuador. Tomando en cuenta dos microcuencas hidrográficas, una degradada ubicada en el cantón Puyango, provincia de Loja (Sierra) y la otra conservada en el cantón Puyo, provincia Pastaza (Amazonía).

3.1.1 Ubicación política y geográfica

El primer muestreo se realizó en la cuenca Chinchal donde se recolectaron muestras de dos quebradas en estado de degradación: 1) quebrada Luz América y 2) quebrada Chinchal.

Esta microcuenca cuenta con un área de 448,58 ha; las coordenadas geográficas de los puntos de muestreo son:

Punto 1 Quebrada Chinchal: latitud 4° 1'47.16"S y longitud 79°55'7.14"O

Punto 2. Quebrada Tolera: latitud 4° 1'58.25"S y longitud: 79°54'50.90"O

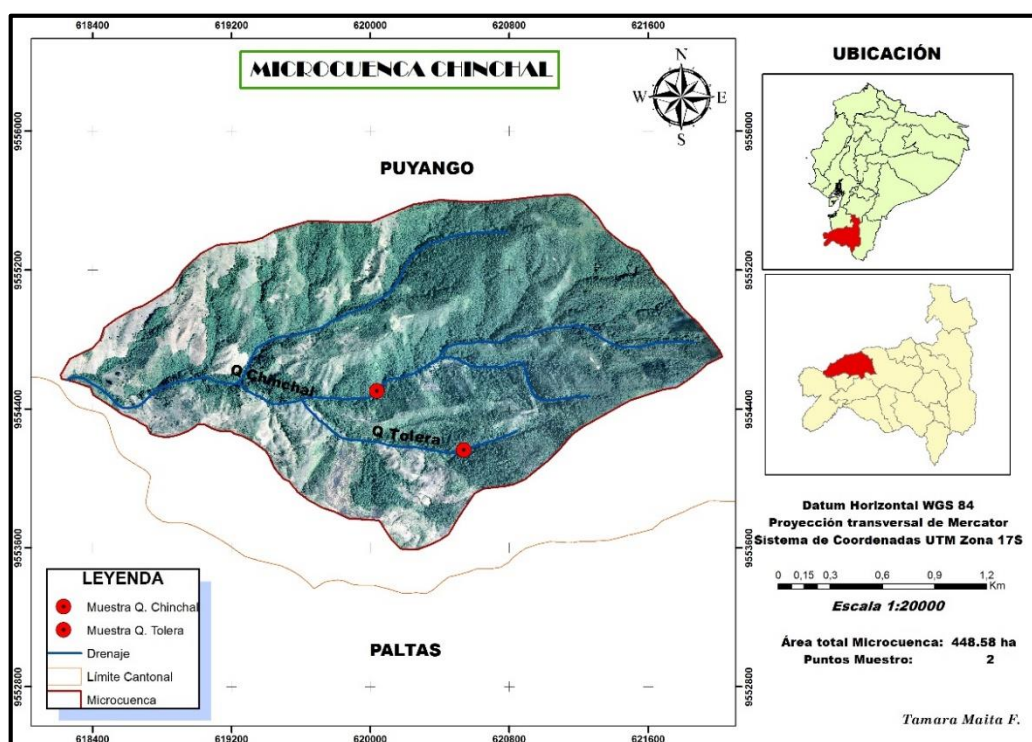


Figura 10 Ubicación del área de estudio “Microcuenca Chinchal”, cuenca del río Puyango
El segundo muestreo se ubicó en la cuenca del río Puyo que se encuentra dentro de la Universidad Estatal Amazónica (UEA). Esta institución está ubicada en la capital de la provincia a de Pastaza (Puyo).

El muestreo se realizó dentro de dos arroyos en la finca de la UEA, que se encuentra localizado en las siguientes coordenadas:

Arroyo 1: latitud $1^{\circ}27'58.70''\text{S}$ y longitud $77^{\circ}59'46.74''\text{O}$

Arroyo 2: latitud $1^{\circ}27'44.38''\text{S}$ y longitud $77^{\circ}59'52.64''\text{O}$

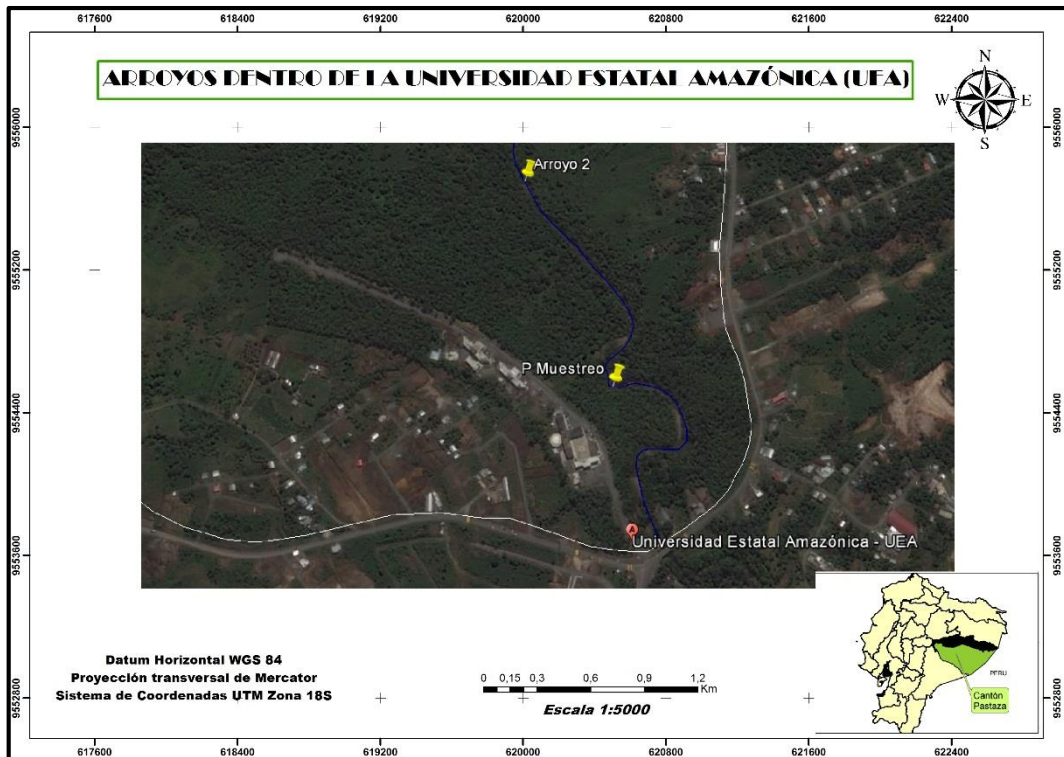


Figura 11 Ubicación del área de estudio “Arroyos dentro de la Universidad Estatal Amazónica” cuenca del río Puyo

3.2 Materiales

Dentro de la fase de campo y laboratorio se utilizaran equipos y reactivos descritos a continuación:

Tabla 2 Materiales y reactivos

MATERIALES					
CAMPO	Cooler	LABORATORIO	Tubos de ensayo	REACTIVOS	Alcohol potable
	Guantes		Cajas petri		Alcohol industrial
	Frascos esterilizados		Asa de siembra		Lugol
	Machete		Cubeta de tinción		Violeta de genciana
	Fundas Ziploc		Porta objetos		Safranina
	Cámara fotográfica		Cubre objetos		Caldo Nutriente
	Libreta de Campo		Papel Aluminio		Agua destilada
EQUIPOS	Centrifuga		Guantes		Agar Nutriente
	Contador de bacterias		Parafilm		TAE 10x
	Incubadora		Mascarilla		gDNA Mini Bacteria Kit
	Balanza eléctrica		Matraz Erlenmeyer		Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit
	Microscopio		Agitadores magnéticos		
	Mechero de alcohol		Probetas		
	Autoclave	Tubos eppendorf			
	Mechero Fisher	Gradillas			
	Balanzas analíticas	Espátulas			
	Pipeteador	Vasos de precipitados			
	Placa calefactora	Papel aluminio			
	Cubeta de electroforesis				

3.3 Metodología

3.3.1 Cuantificación y caracterización morfo-cultural de comunidades bacterianas

Para el aislamiento de todas las colonias bacterianas se realizó siembra de diluciones seriadas en medio de crecimiento general Agar Nutriente (NA). En base a la metodología propuesta por Torres *et al.* (2008), se realizaron diluciones cuantitativas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} en condiciones estériles (cámara de flujo laminar) para las muestras de agua y desde 10^{-1} hasta 10^{-7} para muestras de sedimentos.

Para determinar la cuantificación de comunidades bacterianas se realizó siembra en cajas Petri, la cual me permitieron conocer la diversidad de las colonias, las diluciones que se emplearán para la determinación de bacterias en las muestras de agua serán 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , y para sedimentos 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , considerándose estas como un estándar para la determinación de las unidades formadoras de colonias por mililitro de agua y gramo de sedimento (UFC ml-1) para cada grupo microbiano.

Las cajas Petri con cada dilución, son incubadas a 30 °C para bacterias durante 24, 72 y 168 horas para la cuantificación e identificación de grupos microbianos mediante parámetros morfo-culturales. En base a la cuantificación se determinó la cinética de crecimiento de las colonias durante el tiempo establecido, realizado por la sumatoria del número de colonias por caja Petri, en base al número de cajas, el volumen inoculado y el factor de dilución.

Para su caracterización se escogieron bacterias con rasgos diferentes para su identificación, en base al manual elaborado por Rojas Triviño (2011), la cual indica la descripción macroscópica realizada para cada colina (figura 8), identificando la apariencia de crecimiento que presenta la bacteria, la forma, elevación, borde y color de la colonia, luego se procedió a realizar la tinción de Gram a partir de las 24 horas realizada su siembra, permitiéndome identificar dos grupos de bacterias que son Gram positivas y Gram negativas, como también la manera de agruparse y la estructura de las células.

3.3.2 Comparación comunidades bacterianas obtenidas en cada localidad de estudio, según la cuantificación y características morfo culturales.

Para determinar las diferencias existentes, se cuantifico el número de bacterias que lograron adaptarse al medio de cultivo de cada lugar de estudio, determinadas en base a

la cinética de crecimiento y las características morfológica y cultural que presentaron las colonias en las microcuencas del río Puyo y Chinchal-Puyango.

3.3.3 Identificación molecular de aislados bacterianos obtenidos, resultantes de la variabilidad morfocultural y análisis filogenético de las mismas.

En la identificación molecular se basó en el aislamiento del ADN genómico de las colonias bacterianas resultantes de la caracterización morfo-cultural, la amplificación del gen 16S ARNr y la secuenciación de estos genes.

Durante el Aislamiento del ADN de las bacterias se procedió adicionar el contenido RNasa A al buffer de resuspensión, mezclando y rotulando el frasco. Adicionalmente con ayuda en un tubo eppendorf se añadió 10 µl de lisozima fresca con 100 µl de buffer de resuspensión con RNasa A para cada muestra.

El aislamiento del ADN de las colonias bacterianas se realizó mediante el protocolo de extracción de DNA genómico utilizando el Charge Switch gDNA Mini Bacteria Kit, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y analizándolo posteriormente en Nanodrop para su cuantificación y en electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (1,05 g de agarosa, 150 ml de buffer TBE-1X) a 115 V durante 45 minutos. Al usar inmediatamente el ADN se debe almacenar a 4°C, de lo contrario almacenar a -20°C.

3.3.4 Amplificación de los genes de la región 16S ARNr

Los genes de la región 16S ARNr se amplificaron con los cebadores (primers) universales: 5'CTGGCTCAGGAC/TGAACGCTG3' (ARI C/T) y 5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3' (pH), los cuales amplificaron prácticamente toda la región (1500 pares de bases) correspondiente a los genes 16S ARNr (Torres Gutiérrez, 2008). Todas las reacciones de amplificación (50 µl) contendrán: 34µl agua MilliQ; 5 µl dNTPs (2 mM de cada uno); 5 µl 10X-buffer de PCR [100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KC l, 15mM MgCl₂, 0.01%(w/v) gelatina]; 1,5µl de cada cebador (50 ngµl⁻¹); 1,8µl de MgCl₂; 0,2µl Taq DNA polimerasa (1 U µl⁻¹) y 1µl de muestra de ADN extraído.

Las secuencias de ciclos de temperaturas que se usaron para la amplificación de los genes de la región 16S ARNr son: un ciclo de 5 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN, 30 ciclos de amplificación (45 segundos a 94°C, 2 minutos a 57°C y 1 minuto a 72°C), y finalmente 5 minutos a 7°C para la extensión final de los cebadores. Los productos del

PCR se analizaron en electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (1 g de agarosa, 150 ml de buffer TAE-1X) a 115 V durante 45 minutos.

El producto de la amplificación de los genes 16S ARNr se purificaron usando el kit de purificación PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit, acorde con las instrucciones del fabricante y analizado posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7%.



Figura 12 Extracción del ADN de comunidades bacterianas mediante protocolo de extracción Charge Switch gDNA Mini Bacteria Kit y amplificación de la subregión 16S rRNA, en base al fotodocumentador.

4 RESULTADOS

4.1 Cuantificar y caracterizar morfo-culturalmente las comunidades bacterianas de las muestras de agua de Puyango (Loja-Sierra) y Puyo (Pastaza-Amazonía) respectivamente.

4.1.1 Toma de muestras de agua y sedimentos

Se seleccionaron tres puntos en la quebrada Tolera, Luz de América y Chinchal dentro de la cuenca Chinchal-Puyango, y en el finca de la UEA ubicada en Puyo se recolectaron de igual manera tres puntos de muestreo, rotulando cada uno de los frascos para su identificación.

En la recolección de muestras en los diferentes puntos de estudio, se utilizó un método de manos limpias y manos sucias aplicando las directrices establecidas por Rojas (2002) y Ortiz (2011), lo cual se colectó las muestras de agua lo más lejos posible de la orilla, procurando no remover el fondo, sujetando el frasco en posición invertida sumergiéndolo completamente, dándole la vuelta en sentido contrario a la corriente y a una profundidad media, inferior a 5cm, tapando y sellando para mantenerlas en refrigeración en un cooler, asegurando que llegue en buen estado al laboratorio.

4.1.2 Diluciones seriadas cuantitativas

Con las muestras obtenidas en campo se procedió a caracterizar morfo-cultural las bacterias, mediante diluciones seriadas cuantitativas, con la finalidad de cuantificar el número de microorganismos por milímetro de agua y por gramo de sedimento.

Las muestras de agua se realizaron en diluciones dentro de tubos de ensayos (figura 13), adicionando 1ml de muestra de agua y las diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} dentro de la cámara de flujo laminar, mientras que para las muestras de sedimentos las diluciones fueron desde 10^{-1} hasta 10^{-7} , partiendo con 1g de sedimento.

4.1.3 Siembra en cajas Petri, cuantificación y diversidad de colonias bacterianas

De acuerdo a la metodología propuesta por Torres Gutiérrez (2008), para la siembra de diluciones en la caja Petri, se tomaron concentraciones de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} de las muestras de agua, en cambio para sedimentos se tomaron 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , valores considerados como estándar para la determinación de unidades formadoras de colonias por mililitro de agua o gramo de sedimento.

Para el crecimiento de cualquier organismo procariota se preparó el medio de cultivo general Agar nutriente, la cantidad utilizada fue en base a la cantidad de muestras y número de cajas. En cada caja Petri se añadió uniformemente con ayuda de una micropipeta 1ml de cada dilución, y al culminar se añadió 20ml de cultivo Agar, realizando un movimiento en dirección a los cuatro cuadrantes con la finalidad de un crecimiento homogéneo puntiforme de las colonias.

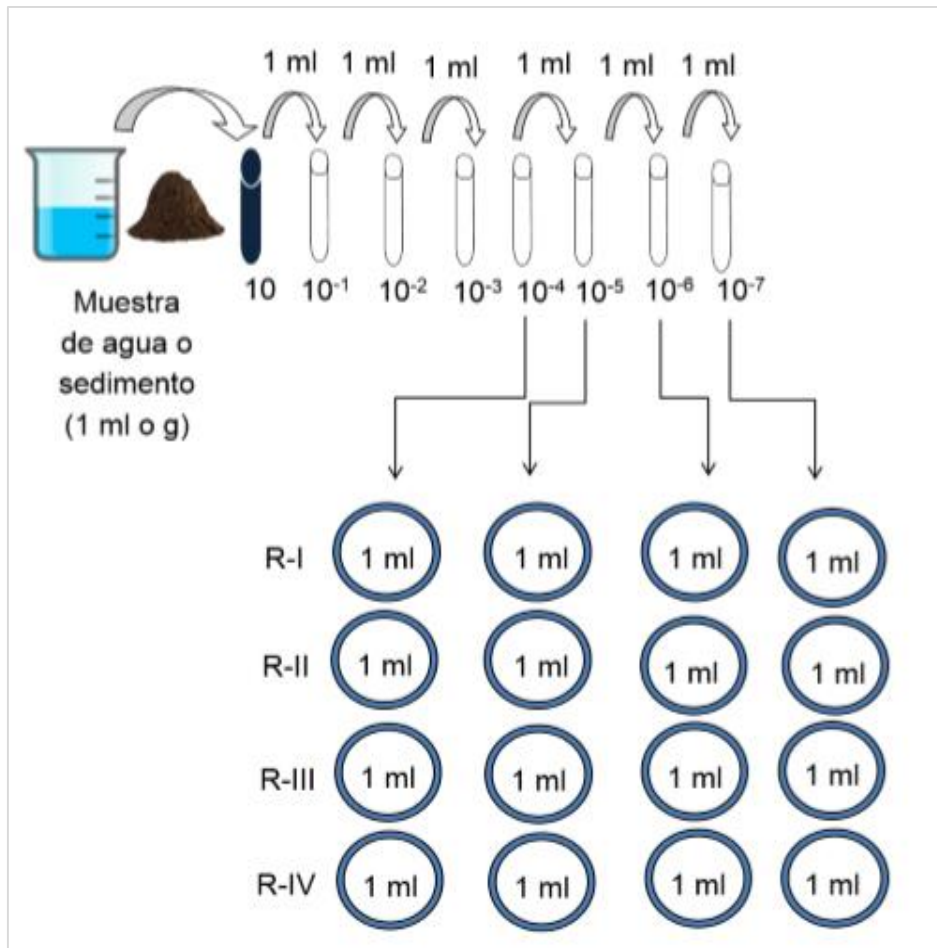


Figura 13 Esquemización del procedimiento para realizar las diluciones cuantitativas

Fuente: Torres Gutiérrez 2008

Al finalizar las cajas Petri con la siembra realizada se incubaron a 30°C, cuantificando las unidades Formadoras de Colonias (UFC) cada 24, 72, y 168 horas, determinando el número de colonias en cada muestra (figura 14), y la diversidad bacteriana mediante parámetros morfo-culturales.

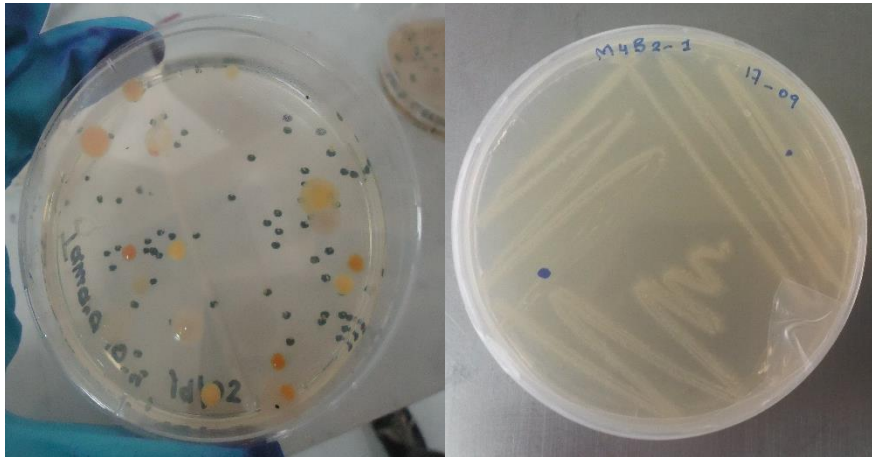


Figura 14 Cuantificación y caracterización de las comunidades bacterianas en base a sus crecimiento bacteriano y características fenotípicas

La cuantificación de las colonias bacterianas, tanto para las muestras de agua como sedimentos se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$UFC/gs = \frac{(\sum N^{\circ}CpC)}{N^{\circ}C} * FD$$

Dónde:

$\sum N^{\circ}CpC$: Sumatoria del número de colonias por cada caja Petri

$N^{\circ}C$: número de cajas Petri

V : Volumen inoculado en la caja Petri

$F.D$: Factor de dilución

4.1.4 Análisis morfo cultural de los aislados bacterianos

Para analizar el crecimiento de las bacterias, se utilizó la metodología propuesta por Rojas Triviño 2011, en la cual se determinó la apariencia de crecimiento que presenta cada colonia (figura 7 y 8), el color, la forma, elevación, bordes y la tinción de Gram de cada aislado.

Al sembrar las bacterias dentro de las 24 horas se procedió a realizar la tinción de Gram, descrita por Triviño 2011. Se realizó frotis sobre un porta objetos, colocando una gota de agua destilada y con la ayuda de un asa microbiológica, se tomó una pequeña cantidad del cultivo bacteriano y se lo extendió a lo largo del portaobjetos, dejándolo secar y fijándolo con la llama del mechero teniendo cuidado de no quemar el cultivo. Ya lista la muestra se añadió violeta de cristal y se esperó un minuto, lavando la preparación con agua destilada, realizando el mismo procedimiento con lugol dejando reposar un minuto y lavando con alcohol potable, y finalmente se añadió Safranina, se esperó 1 minuto para volver a lavar con agua destilada, dejando secar a temperatura ambiente (figura 15)

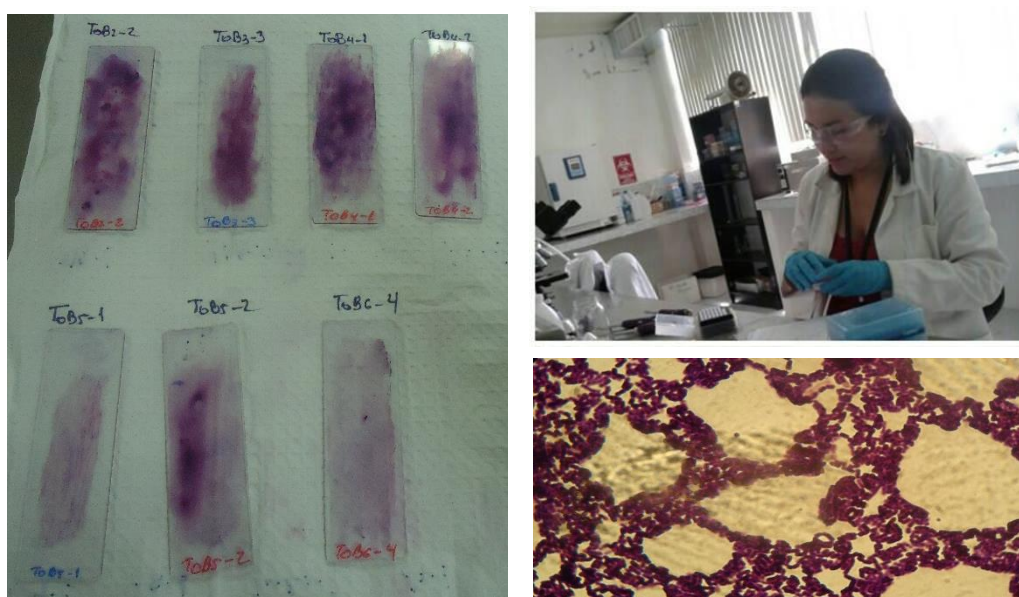


Figura 15 Bacterias teñida, tincion de Gram y observacion de la tincion en el microscopio

Al finalizar la tinción Gram, se procedió a identificar las bacterias Gram positivas y Gram negativas, la forma de agrupación y la estructura de la célula, se lo llevo a cabo con ayuda del microscopio.

4.1.5 Cuantificación de las comunidades bacterianas

Los resultados de la cuantificación de las comunidades bacterianas obtenidos en las muestras de agua y sedimentos en ambas microcuencas de Puyo y Puyango, se determinaron mediante la implementación de la metodología de diluciones seriadas cuantitativas.

En las figura 16 y 17, se establece el análisis de la cinética del crecimiento bacteriano (UFCml-1) en muestras de agua y sedimentos a las 24 horas (1 día), 72 horas (3 días) y 168 horas (7días) después de haber realizado las diluciones.

La curva de crecimiento microbiano representa la evolución del número de bacterias viables durante las diferentes fases dentro de los días de estudio, relacionando entre las abscisas el tiempo y las ordenadas el número de colonias que se lograron cuantificar de cada muestra.

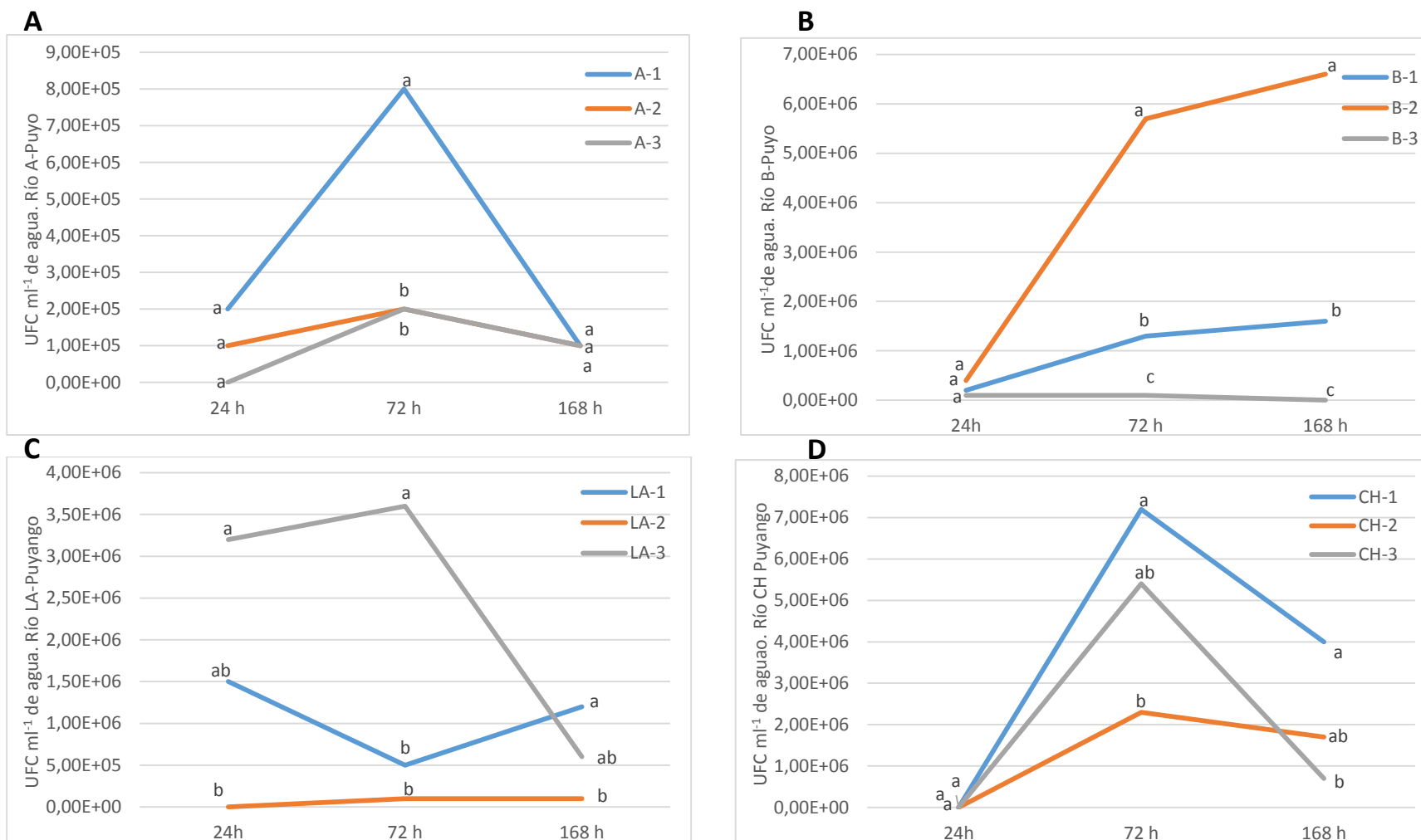


Figura 16 Cinética de la cuantificación de comunidades bacterianas en muestras de aguas para 24, 48 y 168 horas después de cultivadas en medio Agar Nutritivo. A: río A-Puyo, B: río B-Puyo, C: río LA-Puyango, D: río CH-Puyango. Letras desiguales entre las muestras difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. Errores estándares A: 0.24, B: 1.99, C: 1.05, D: 1.09.

Los gráficos presentes en la figura 16 expresan el crecimiento en muestras de agua en los ríos Puyo y Puyango, se analizaron 6 muestras en la microcuenca de Puyo donde se recolectaron en dos puntos específicos, y en la microcuenca del río Puyango se estudió 9 muestras de tres diferentes efluentes.

Las muestras de agua correspondientes al río Puyo (grafico A), fue el primer lugar de muestreo dentro de la finca de la UEA, la línea de curva generada indica la fase de crecimiento dentro de las 24 y 72 horas para la muestra A-1, evidenciando un aumento de la población microbiana, a las 168 horas no se evidencia un incremento en el crecimiento bacteriano ya que se encuentra en la fase de muerte, por el contrario en las muestras A-2 y A-3 no se detectó mayor crecimiento; a diferencia del punto de muestreo numero dos (gráfico B), que indica que existió un crecimiento mayor en la muestra B-2 y en mayor número en B-1, a partir de las 72 hasta las 168 horas, determinando que los microorganismos de este sector de muestreo presentaron una fidelidad en el estado metabólico presentes en el medio de cultivo, a diferencia de la muestra B-3 no se evidencio aumento en el número de bacterias, de hecho no existió crecimiento.

Los gráficos C y D, por el contrario representan el crecimiento dentro de las muestras en la microcuenca Puyango. Se analizó el crecimiento bacteriano de la quebrada Luz de América la cual se ubicó dentro del río Guando, determinando tres lugares de muestreo dentro de la quebrada, de los cuales LA-2 no se identificó un crecimiento dentro de las horas de estudio, LA-1 incremento la actividad microbiana dentro de las 168 horas, y dentro del muestra LA-3 fue el único que se logró diferenciar un mayor incremento de colonias en su fase estacionaria, sin embargo se logró evidenciar que las colonias al llegar a las 168 horas de crecimiento presentaron una disminución determinándose su fase de muerte.

La quebrada Chinchal, de igual manera tiene un incremento en el crecimiento en la fase inicial y estacionaria dentro de las 24 y 78 horas con un crecimiento exponencial en las muestras CH-1 y CH-2, y los valores menores en su fase de muerte se encontraron a partir de las 168 horas, lo cual se encontró una disminución en la población microbiana.

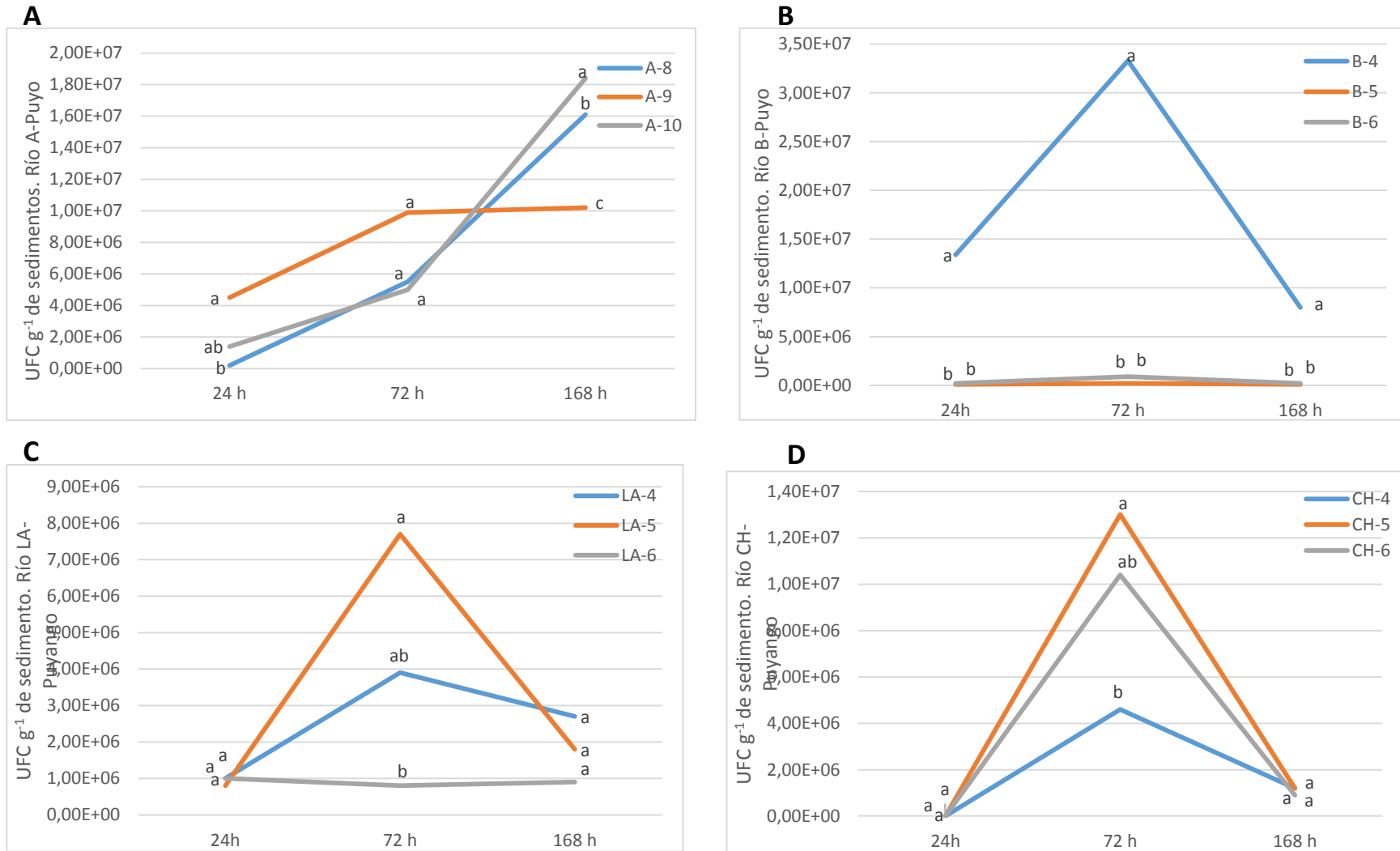


Figura 17
Cinética de la

cuantificación de comunidades bacterianas en muestras de sedimentos para 24, 48 y 168 horas después de cultivadas en medio Agar Nutritivo. A: río A-Puyo, B: río B-Puyo, C: río LA-Puyango, D: río CH-Puyango. Letras desiguales entre las muestras difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. Errores estándares A: 4.18, B: 7.41, C: 1.46, D: 1.62

La cinética de crecimiento de las muestras de sedimentos (figura 17) dentro de la zona de estudio se analizó igual que la muestra de agua. El río Puyo en la muestra A tiene un incremento en la masa celular dentro de las 72 y 168 horas en los estratos A8 y A10, lo cual se especifica que su fase de crecimiento exponencial se realiza dentro de este periodo, diferenciando a la muestra A-9 que después de las 72 horas no se registró aumento de las colonias. En la muestra B del río Puyo indica crecimiento dentro del estrato B-4 en la cual su incremento mayor fue de 3.50×10^7 , dentro de la fase estacional con un crecimiento exponencial, y llegando a disminuir a las 168 horas presentado su fase de muerte, haciéndose nulo el crecimiento. A diferencia de los estratos B-5 y B-6 no se evidenció crecimiento durante los diferentes periodos establecidos.

Las muestras de sedimento en la microcuenca Puyango, tiene un crecimiento normal dentro de la fase estacional, e igual un descenso para la fase de muerte dentro de algunos estratos. El gráfico C representa a la quebrada Luz de América, el crecimiento en la muestra LA-6 no representó aumento en la población de colonias, relacionando con la muestra LA – 5 que logró un mayor incremento en el crecimiento bacteriano durante la fase estacionaria con un crecimiento exponencial en las 24 y 72 horas, se evidenció poca diferencia en el crecimiento en el estrato LA-4. En el gráfico D que representa a la quebrada Chinchal, como se puede observar se obtuvo diferencia en el crecimiento bacteriano en los tres lugares de muestreo, dentro de las 24 y 72 horas, cumpliendo su fase estacionaria y su fase de muerte y presentando una diferencia significativa para las UFC g-1.

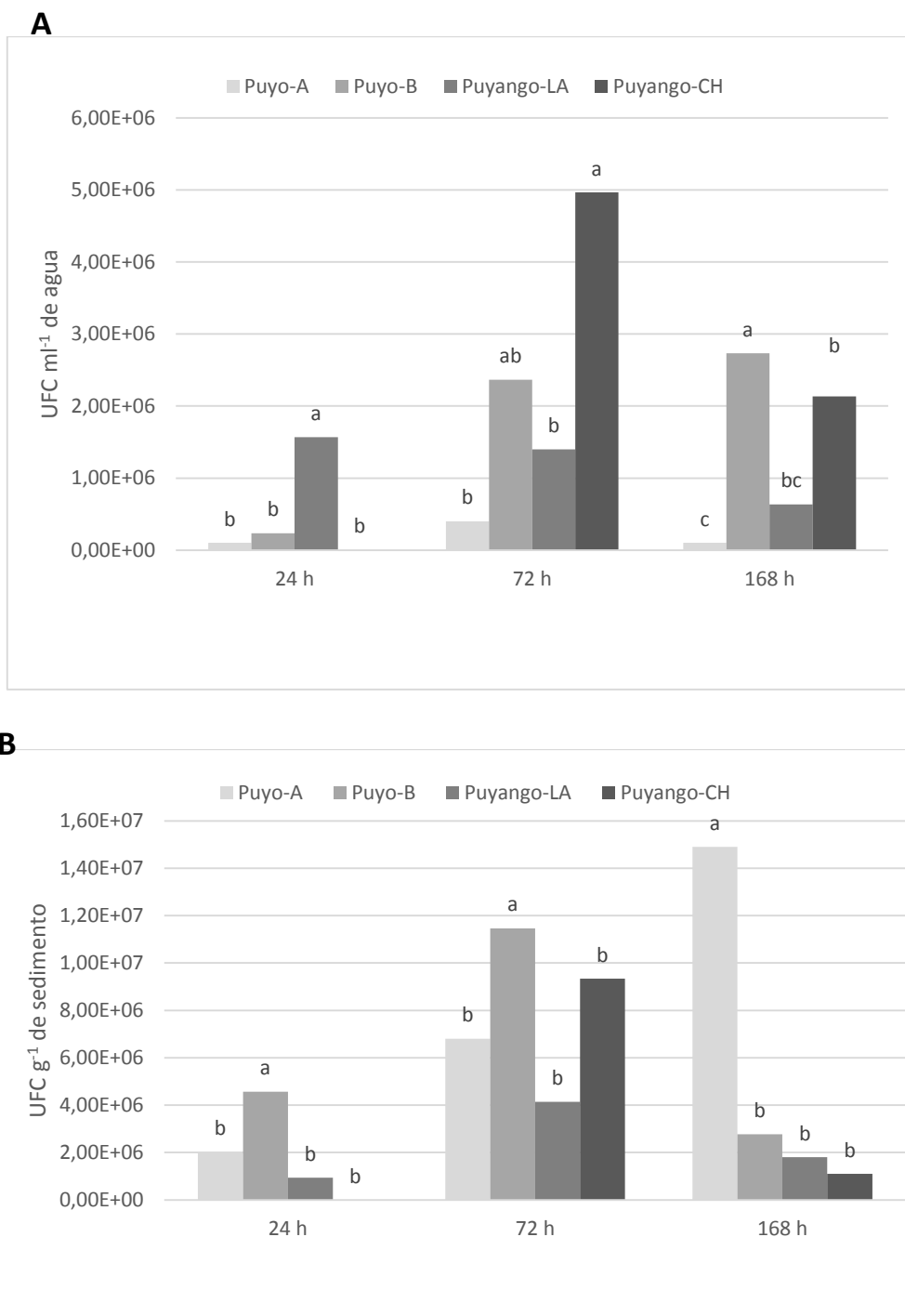


Figura 18 Comportamiento de las comunidades bacterianas por río en las localidades de Puyo y Puyango a las 24, 48 y 168 horas. A: muestras de aguas, B: muestras de sedimentos. Letras desiguales en cada grupo de columnas difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. Errores estándares A- 24 h: 0.42, 48 h: 1.27, 168 h: 0.86; B- 24 h: 1.53, 48 h: 3.36, 168 h: 3.56.

La cinética de crecimientos se expresa de manera detallada en la figura 18, representando el crecimiento bacteriano en las muestras de agua en el gráfico A, de igual manera se analizó durante el periodo de 24, 72 y 168 horas, el lugar en donde se obtuvo mayor crecimiento en la población de colonias fue en la quebrada Chinchal dentro de la microcuenca Puyango, lo cual su fase de mayor crecimiento se dio a las 72 horas. A

diferencia de las muestras analizadas en la microcuenca Puyo el mayor crecimiento se obtuvo en el primer lugar de muestreo, el cual indico su incremento poblacional dentro de las 168 horas.

Las muestras de sedimentos que se lograron analizar, indican que la mayor población bacteriana existió en el Puyo, con un mayor crecimiento dentro de las 168 horas y una velocidad de crecimiento máxima, la cual se dio en el estrato A del primer lugar de muestreo dentro de la finca de la UEA. Además se evidencia que la fase estacionaria dentro de los demás lugares de muestreo se estableció a partir de las 72 horas siendo su fase estacionaria con un crecimiento exponencial, en la fase de inicio no se presencié crecimiento en todos los lugares estudiados, de igual manera su fase de muerte se presentó en las muestras analizadas en el estrato B de Puyo y en la microcuenca Puyango en la quebrada Luz de América, además en menor porcentaje en la quebrada Chinchal.

4.1.6 Caracterización morfo-cultural comunidad bacterianas

En base a la metodología establecida por Rojas Triviño (2011), tomando en cuenta una correcta observación de cada característica presentadas en el crecimiento de las colonias bacterianas, dado que dicha clasificación se convierte en uno de los principales marcadores para la identificación inicial de géneros bacterianos, encontrándose registrados en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, cada género posee características particulares que permiten diferenciarlo uno de otros.

En las muestras obtenidas en la microcuenca Puyo (tabla 3), se escogieron 9 tipos de bacterias con diferentes características, su crecimiento fue en un 78% de apariencia filiforme, seguida por apariencia difusa con un valor de 22%, en cambio la forma que presentaron fue irregular con un 67%, circular 22% y filamentosa con un 11%, mientras la elevación con un mayor porcentaje fue plana o aplastada con un 89% y un valor del 11% convexa baja, en cuanto al color las bacterias tuvieron un color blanco con un 56% y 22% en café y naranja, y en base a su borde fueron poco onduladas en un 44%, ondulado 33% y entero continuo 22%, y el tipo de bacterias más predominantes fue coco Gram positivo con una presencia de 33%, además se identificaron bacterias tipo Bacillus corto Gram negativo con una presencia de 22%, Bacillus corto Gram positivo, estreptococo Gram positivo, Bacillus largo Gram positivo y coco Bacillus Gram positivo con un porcentaje del 11%.

Tabla 3 Caracterización morfocultural de comunidades bacterianas de muestras de agua en la microcuenca Puyo

CARACTERIZACIÓN MORFO CULTURAL MUESTRAS DE AGUA - PUYO							
Características		N°	%	Características		N°	%
Apariencia	Filiforme	7	78	Borde	Poco ondulada	4	44
	Difuso	2	22		Ondulado	3	33
	Total	9	100		Entero continuo	2	22
					Total	9	100
Forma	Irregular	6	67	Tinción	Coco Gram +	3	33
	Circular	2	22		Bacillus corto Gram +	1	11
	Filamentosa	1	11		Estreptococo Gram +	1	11
	Total	9	100		Bacillus corto Gram -	2	22
Elevación	Plana o aplastada	8	89		Bacillus largo Gram +	1	11
	Convexa baja	1	11		Coco Bacillus Gram +	1	11
	Total	9	100		Total	9	100
Color	Café	2	22				
	Blanco	5	56				
	Naranja	2	22				
	Total	9	100				

En la cuenca del río Puyango se identificaron 23 tipos de bacterias con diferentes características (tabla 4), de las cuales el 91% tuvieron apariencia filiforme y 21% difuso, su forma más predominante fue circular con un 74%, seguida de filamentosa con 17% e irregular con 9%, las bacterias además presentaron una elevación elevada con un 48%, plana o aplastada 43% y convexa baja con un 9%, con un 70% fueron de borde entero continuo, poco ondulado 26% y ondulada 4%, el color que más predominó fue beige con 35%, seguido por translucida 26%, blanco 13%, y el 9% en los colores amarillo, café y naranja. El tipo de bacteria con mayor frecuencia fue Bacillus corto Gram positivo, coco Gram positivo 17%, Bacillus largo Gram positivo 13%, el 9% fueron Bacillus Gram positivo y coco Gram positivo agrupado en racimos, y el 4% presentaron las bacterias de tipo Coco Gram negativo, Estreptobacillus Gram positivo y Sarcinas coco Gram positivo.

Tabla 4 Caracterización morfo cultural de comunidades bacterianas de muestras de agua en la microcuenca Puyango.

CARACTERIZACIÓN MORFO CULTURAL MUESTRAS DE AGUA PUYANGO								
Características		N°	%	Características		N°	%	
Apariencia	Filiforme	21	91	Color	Beige	8	35	
	Difuso	2	9		Amarilla	2	9	
	Total	23	100		Café	2	9	
Forma	Irregular	2	9		Translucida	6	26	
	Circular	17	74		Naranja	2	9	
	Filamentosa	4	17		Blanco	3	13	
	Total	23	100		Total	23	100	
Elevación	Plana o aplastada	10	43		Tinción	Bacillus Gram +	2	9
	elevada	11	48			Bacillus corto Gram +	9	39
	convexa baja	2	9			Bacillus largo Gram +	3	13
	Total	23	100	Coco Gram -		1	4	
Borde	Poco ondulada	6	26	Coco Gram +		4	17	
	Ondulada	1	4	Coco Gram + agrupado en racimos		2	9	
	Entero continuo	16	70	Estreptobacillus Gram +		1	4	
	Total	23	100	Sarcinas coco Gram +		1	4	
				Total		23	100	

En la caracterización morfológica y cultural de muestras de sedimentos (tabla 5), se analizaron 10 tipos de bacterias que presentaron características diferentes en la microcuenca Puyo, las cuales el 70% presento una apariencia filiforme, siguiéndole el barbado con un 20% y difuso con 10%, entre la forma las colonias identificadas fueron circulares con 50%, irregular 40% y filamentosa 10%, su elevación fue entre un 50% para elevada y plana o aplastada, en base a su borde las colonias presentes fueron entero o continuo de 50%, ondulada 30% y poco ondulada del 20%, mientras en el color tuvieron mayor variabilidad en varios tonos, identificando el 20% para los colores amarillo, beige y café, y el 10% distribuido entre blanco, naranja, translucido y transparente, en lo que consiste a la tinción de Gram, el 30% se encontró bacterias de tipo coco Gram positivo y

Bacillus corto Gram positivo, el 20% para Bacillus Gram positivo y finalmente un 10% para cada colonia de tipo coco Gram positivo agrupado en racimos y Bacillus Gram negativo.

Tabla 5 Caracterización morfo cultural de comunidades bacterianas de muestras de sedimentos en la microcuenca Puyo

CARACTERIZACIÓN MORFO CULTURAL MUESTRA DE SEDIMENTOS PUYO								
Características		N o	%	Características		N o	%	
Apariencia	Barbado	2	20	Color	Amarillo	2	20	
	Crecimiento Filiforme	7	70		Beige	2	20	
	Difuso	1	10		Blanco	1	10	
	Total	10	100		Café	2	20	
Forma	Circular	5	50		Naranja	1	10	
	Filamentosa	1	10		Translucido	1	10	
	Irregular	4	40		Transparente	1	10	
	Total	10	100		Total	10	100	
Elevación	Elevada	5	50		Tinción	Coco Gram +	3	30
	Plana o aplastada	5	50			Coco Gram + agrupado en racimos	1	10
	Total	10	100			Bacillus Gram +	2	20
Borde	Entero o continuo	5	50			Bacillus Gram -	1	10
	Ondulada	3	30	Bacillus corto Gram +		3	30	
	Poco Ondulada	2	20	Total		10	100	
	Total	10	100					

Las colonias bacterianas identificadas en sedimentos dentro de la cuenca del río Puyango (tabla 6), fueron en un total de 17 tipos de diferentes características, de las cuales un 71% fueron de apariencia filiforme, seguida del 18% para difuso y el 6% para Barbado y Equinulado, a partir de su forma el 71% fue circular, 24% irregular y el 6% filamentosa, a partir de su elevación tuvo una distribución del 41% para el tipo de bacteria elevada y plana o aplastada, y el 18% fueron convexa baja, además presentaron un borde entero continuo de 53%, poco ondulado 29% y ondulada del 18%, en base a su color de igual manera tuvieron variabilidad con un 41% predominando el color beige, 18% fueron blanco y translucido, el 12% naranja y el 6% para amarillo y transparente. En lo que concierne a la tinción cuya agrupación predominante fue del 24% para Bacillus corto Gram positivo, seguida del 18% para Bacillus corto Gram negativo, 12% en Bacillus largo

Gram positivo y el 6% para tipo de bacterias coco Gram positivo agrupado en racimos, Bacillus Gram negativo, Bacillus Gram positivo, micrococos Gram negativo y sarcinas Gram positivo.

Tabla 6 Caracterización morfocultural de comunidades bacterianas de muestras de sedimentos en la microcuenca Puyo

CARACTERIZACIÓN MORFO CULTURAL MUESTRAS DE SEDIMENTOS PUYANGO							
Características		N^o	%	Características		N^o	%
<u>Apariencia</u>	Filiforme	12	71	<u>Color</u>	Amarillo	1	6
	Barbado	1	6		Naranja	2	12
	Difuso	3	18		Beige	7	41
	Equinulado	1	6		Blanco	3	18
	Total	17	100		Translucido	3	18
<u>Forma</u>	Circular	12	71		Transparente	1	6
	Filamentosa	1	6		Total	17	100
	Irregular	4	24	<u>Tinción</u>	Coco Gram +	3	18
	Total	17	100		Coco Gram + agrupado en racimos	1	6
<u>Elevación</u>	Convexa baja	3	18		Bacillus corto Gram -	3	18
	Elevada	7	41		Bacillus corto Gram +	4	24
	Plana o aplastada	7	41		Bacillus Gram -	1	6
	Total	17	100		Bacillus Gram +	1	6
<u>Borde</u>	entero continuo	9	53		Bacillus largo Gram +	2	12
	Poco ondulada	5	29		micrococos Gram -	1	6
	Ondulada	3	18		Sarcinas coco Gram +	1	6
	Total	17	100		Total	17	100

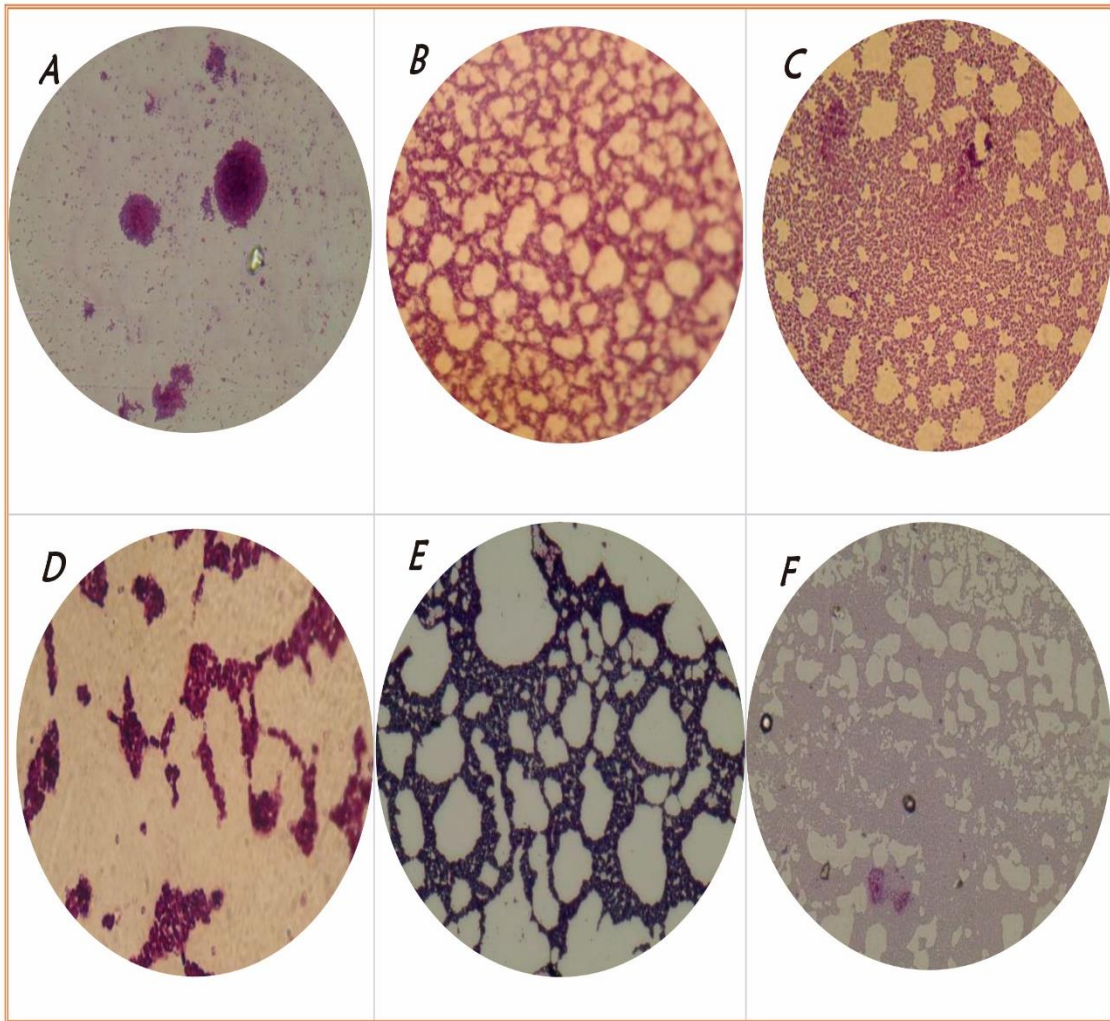


Figura 19 Tinción de Gram identificados en la microcuenca del río Puyo. (A) Coco Gram positivo; (B) Bacillus corto Gram positivo; (C) Bacillus corto Gram negativo; (D) Estreptococos Gram positivo; (E) Coco gram positivo agrupado en racimos; (F) Bacillus Gram negativo

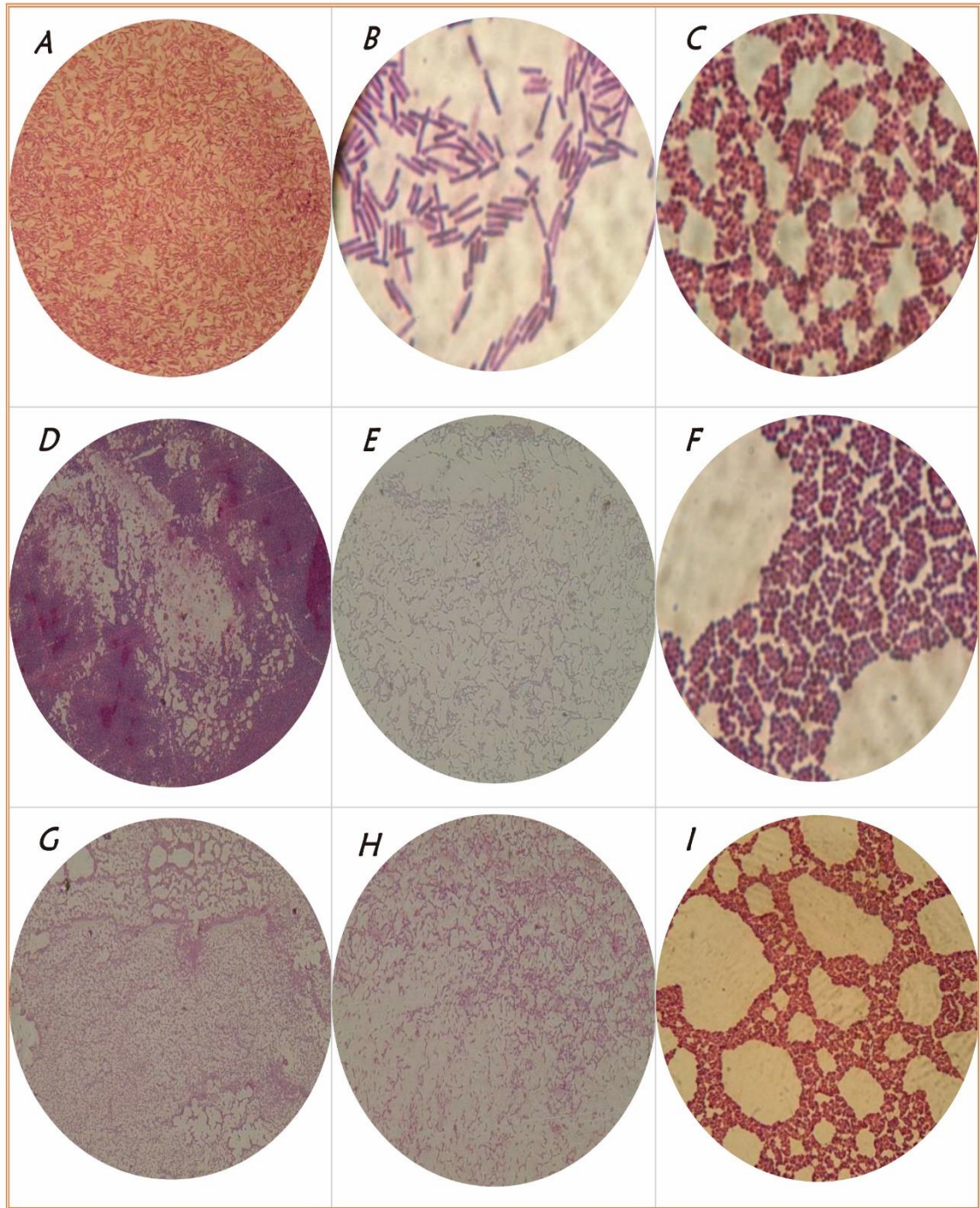


Figura 20 Tinción de Gram identificados en la microcuenca del río Puyango. (A) Bacillus Gram positivo; (B) Bacillus largo Gram positivo; (C) Sarcinas coco Gram positivo; (D) Bacillus corto Gram positivo; (E) Bacillus corto Gram negativo; (F) Sarcinas Gram positivo; (G) Micrococos Gram positivo; (H) Bacillus Gram negativo; (I) Coco Gram positivo

4.2 Comparación comunidades bacterianas obtenidas en cada localidad de estudio, según la cuantificación y las características morfo-culturales.

4.2.1 Comparación de comunidades bacterianas en base a la cinética de crecimiento

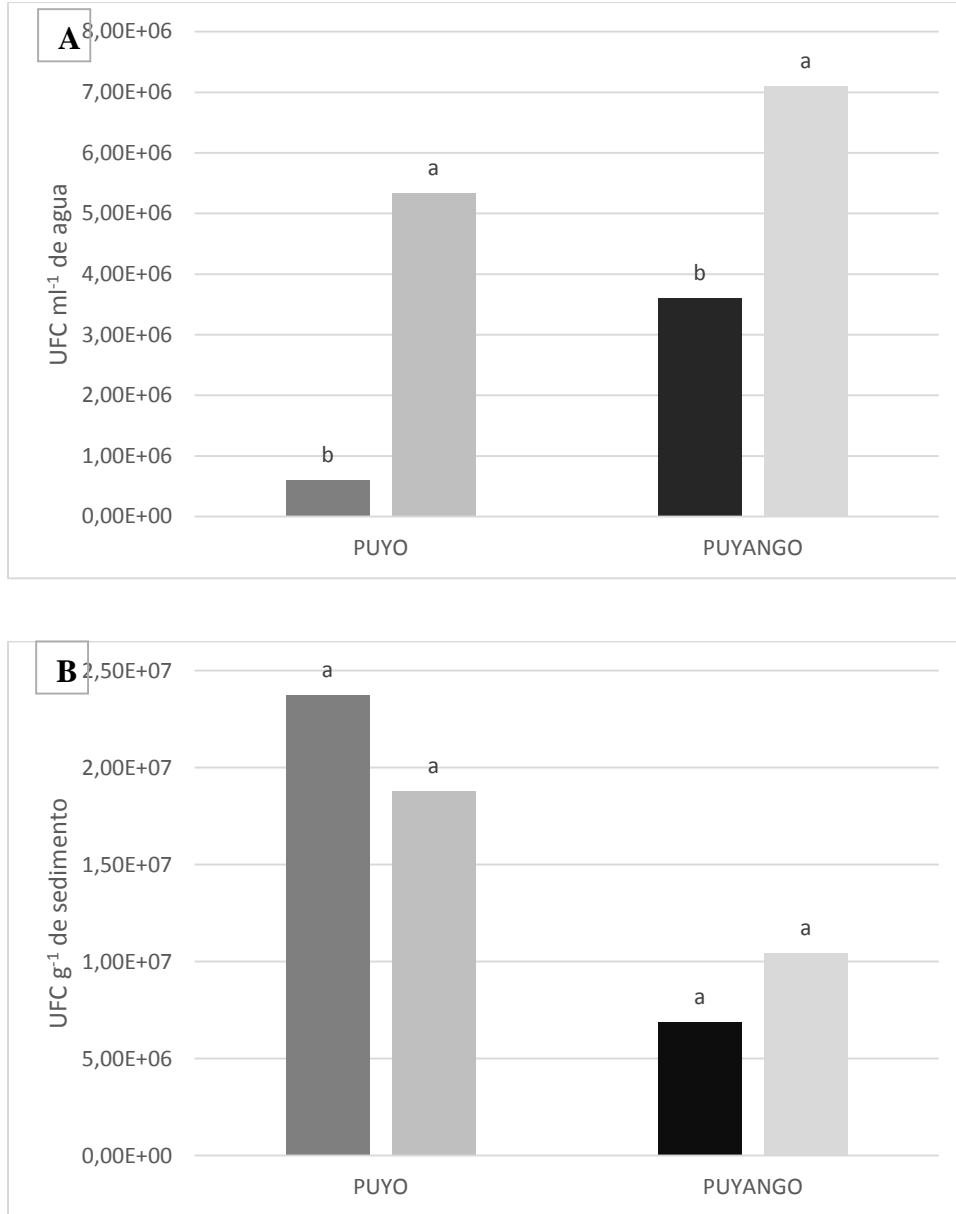


Figura 21 Cuantificación total de comunidades bacterianas por ríos en Puyo y Puyango. A: muestras de aguas, B: muestras de sedimentos. Letras desiguales en cada grupo de columnas difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. Errores estándares A- Puyo: 1.25, Puyango: 9.50; B- Puyo: 11.03, Puyango: 3.67.

Al realizar el muestreo en cada lugar de estudio, se tomó en cuenta las mismas cantidades para analizar en ambas cuencas hidrográficas, dada que la adaptación de la población bacteriana se estableció dentro de las 24 y 72 horas. Como se ha venido determinando la cinética de crecimiento, en la microcuenca del río Puyo ubicado dentro de la finca de la UEA, los resultados obtenidos en el arroyo B obtuvieron un mayor índice de crecimiento con una variabilidad en colonias de 5.3×10^6 . A diferencia de la microcuenca Puyango donde los resultados representaron mayor crecimiento en la quebrada Chinchal con 7×10^6 . Es así que dentro de las muestras de agua de las UFC, el lugar que tuvo mayor población microbiana fue en la cuenca del río Puyango, dado que las colonias bacterianas se adaptaron al medio con una fase de crecimiento exponencial.

Dentro del análisis en las muestras de sedimentos de las UFCg⁻¹, Puyo obtuvo mayor población de comunidades bacterianas dentro del primer lugar de muestreo A (grafico B) con 2.4×10^7 ; y en Puyango se obtuvo un incremento de población bacteriana de 1×10^7 , sobresaliendo los muestreos en el río Chinchal determinadas anteriormente.

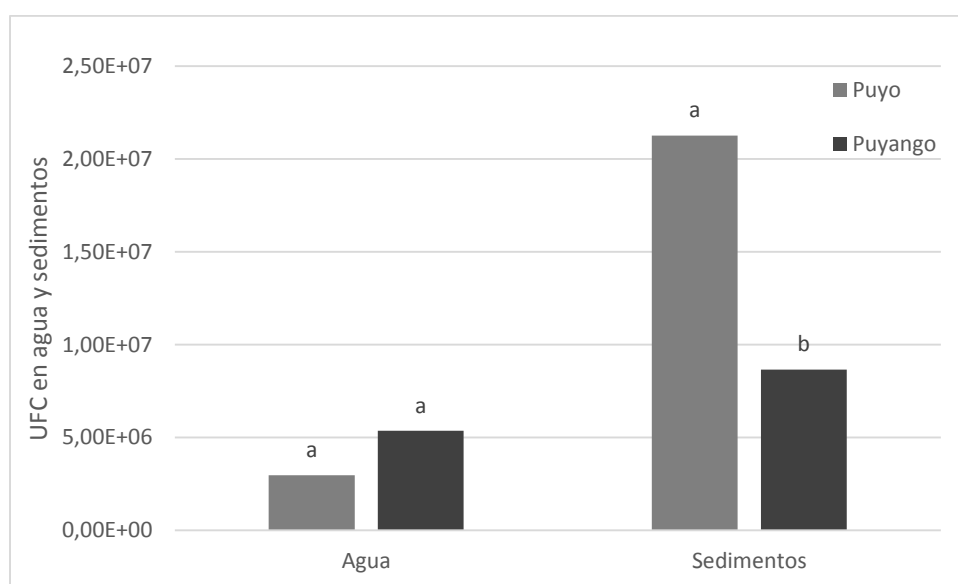


Figura 22 Cuantificación total de comunidades bacterianas por muestras de agua y sedimentos en Puyo y Puyango. Letras desiguales en cada grupo de columnas difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. Errores estándares Agua: 2.03, Sedimentos: 6.19

Se identifica en la figura 20 la cuantificación total de las comunidades bacterianas en muestras de agua y sedimentos en los dos lugares de muestreo, mostrando poca diferencia en base al crecimiento en la cuenca del río Puyango, y una diferencia significativa en las muestras de sedimentos en la cuenca del río Puyo, la cual obtuvo mayor UFC en base a su cinética de crecimiento dentro de las horas establecidas para su análisis.

4.2.2 Comparación de comunidades bacterianas en base a la caracterización morfo-cultural

Para establecer la caracterización morfológica y cultural de los aislados bacterianos se seleccionaron aquellas colonias que presentaron diferentes características tanto para las muestras de agua y sedimentos, y así poder determinar la diversidad de las poblaciones de bacterias presentes en las zonas de estudio.

Durante la identificación de todas las bacterias que crecieron dentro en la microcuena del río Puyo, solo 9 presentaron características diferentes las cuales fueron seleccionadas para su análisis, al contrario que la microcuena Puyango presentó 23 colonias bacterianas que crecieron y se adaptaron en el medio agar, dando como resultado el lugar en donde se encontró mayor diversidad.

En la figura 21 se presenta un resumen de la diferencia en porcentaje de las colonias identificadas en ambos lugares para las muestras de agua. Las bacterias presentaron una apariencia filiforme mayor con un 90% en Puyango, de igual manera con una forma circular con un 74%. Por el contrario las bacterias presentes en Puyo tienen una elevación plana o aplastada con un valor del 89% de su totalidad, y en este sector presentaron poca tonalidad pero el que mayor predominio fue el color blanco con un 56%, al contrario en Puyango se identificó mayor variabilidad en este aspecto. El borde es un elemento importante para diferenciar el tipo de bacteria así que las muestras analizadas en la microcuena Puyango se identificaron con un borde entero continuo que fueron las que predominaron con un valor del 70%.

Los resultados en base a la tinción de Gram es un aspecto importante para su caracterización, como se identificaron más muestras en Puyango por las características que presentaron cada colonia, este aspecto se presentaron ocho clases de bacterias, y la que mayor predominio es la bacteria de genero *Bacillus* corto Gram positivo con un valor del 39%, además se identificaron bacterias del tipo *Coco* Gram negativo, *Coco* Gram positivo agrupado en racimos, *Estreptobacillus* Gram positivo, y *Sarcinas* *coco* Gram positivo, y los tipos de bacterias que no se encontraron en este sector y en Puyo estuvieron presentes fueron *Coco Bacillus* Gram positivo, *Bacillus* corto Gram negativo y *Estreptococo* Gram positivo.

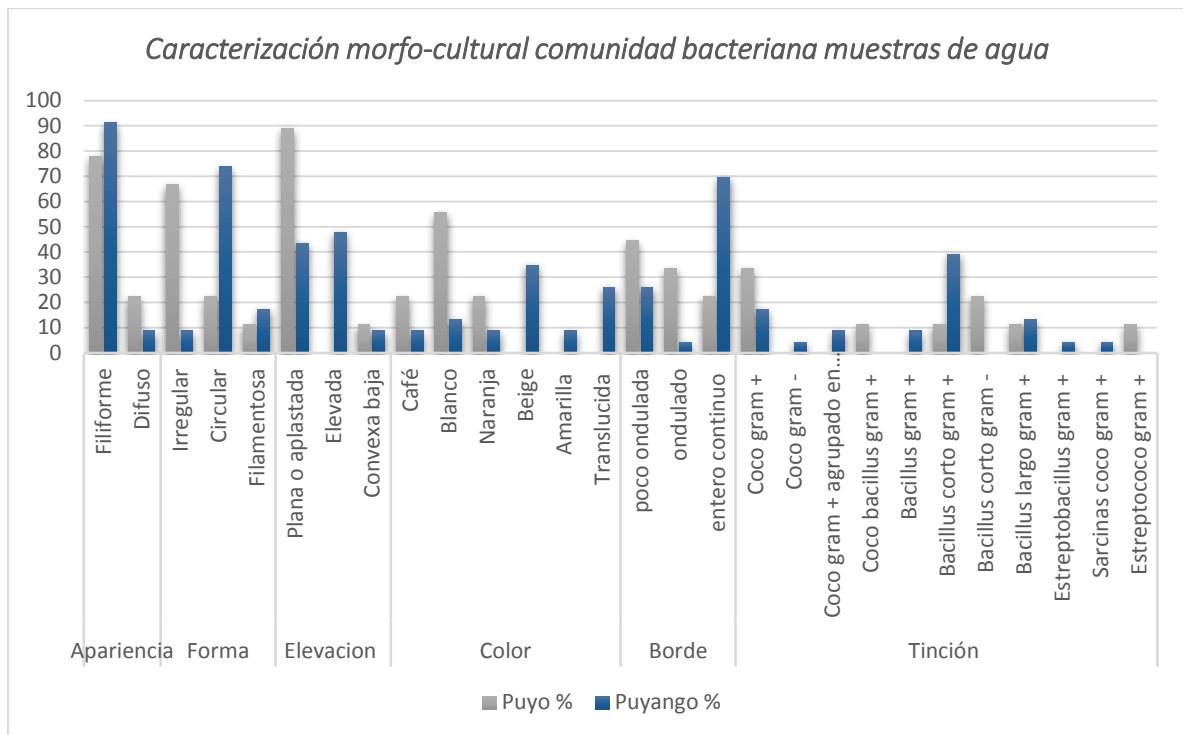


Figura 23 Comparación caracterización morfológica y cultural muestras de agua

Los resultados presentes en las colonias bacterianas identificadas en la caracterización morfológica y cultural de las muestras de sedimentos (figura 22), se obtuvieron 10 tipos de bacterias en Puyo, por el contrario en Puyango se identificaron 17 bacterias.

Dentro de la característica de las bacterias con un mayor porcentaje la apariencia filiforme predominó más con un valor de 71% y en Puyo obtuvo un 70%. En la forma circular Puyango presentó un valor de 71% mayor a las demás características, en la elevación de cada tipo de bacteria Puyo obtuvo mayor presencia en la característica elevada y plana o aplastada. El borde entero continuo con un valor de 53% lo obtuvo Puyango, y en base al color entre las dos zonas de estudio presentaron los dos lugares las mismas características predominando el color Beige en Puyango con un 41%. Para la tinción de Gram, se diferenciaron 5 clases en Puyo con un mayor porcentaje las bacterias de género coco Gram positivo y *Bacillus corto* Gram positivo con un valor de 30%, comparando con Puyango que se identificaron 9 tipos de bacterias, y 4 que no estuvieron presentes en Puyo las cuales fueron *Bacillus corto* Gram negativo, *Bacillus largo* Gram positivo, micrococcos Gram negativo y *Sarcinas coco* Gram positivo.

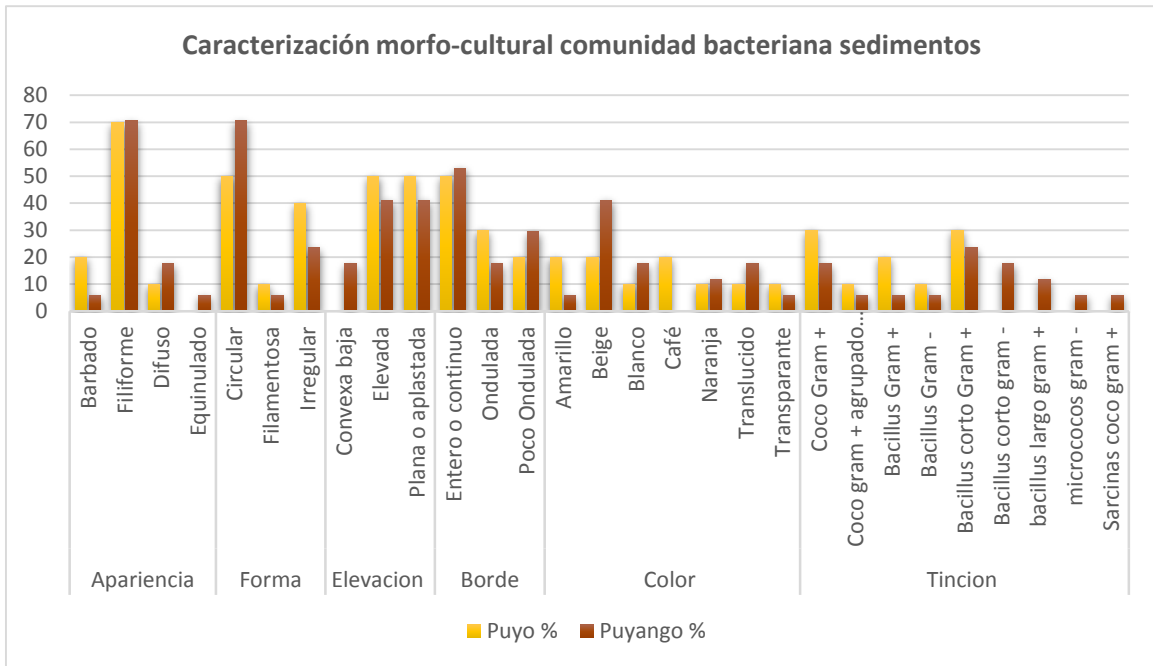


Figura 24 Comparación caracterización morfológica y cultural muestras de agua

4.3 Identificación molecular de los aislados bacterianos obtenidos y determinación de las relaciones filogenéticas, resultantes de la variabilidad morfo-cultural.

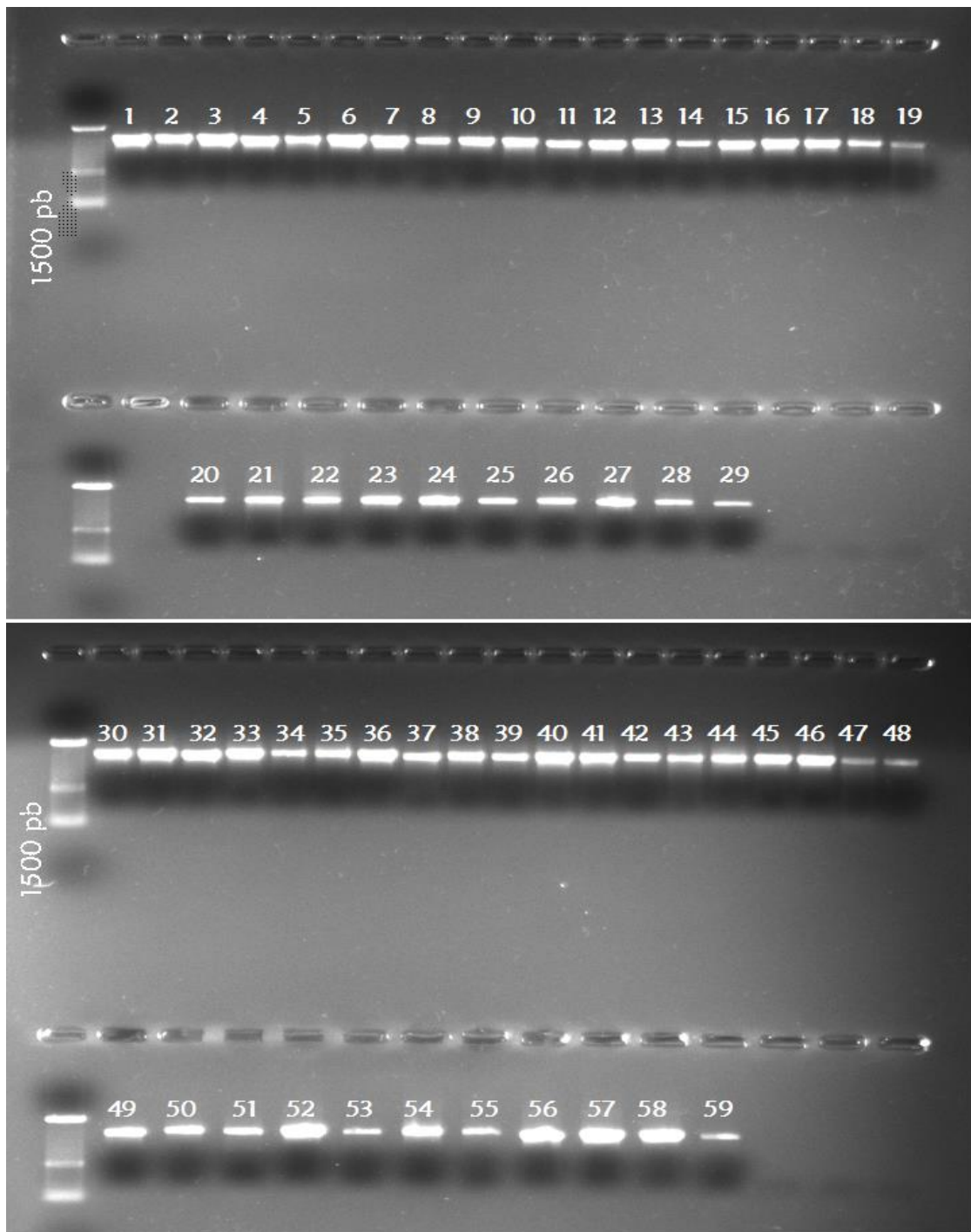


Figura 25 Electroforesis en gel de agarosa obtenidos mediante PCR del ADN de las bacterias de las muestras de agua y sedimentos extraídos de las microcuencas ubicadas en Puyo y Puyango

DESCRIPCIÓN ADN (figura 25): Puyo: 1(A8-3); 2(A8-2); 4(B2-1); 14(B5 -2); 22(A1-1); 23(A2-1); 24(A3-1); 25(A7-1); 26(A8-1); 29 (B4-1); 30(B5-1); 31(B5-3); 40(B6-4); 42 (B1-1); 43(A3-2); 45(B1-2); 46(A2-2); 47(A1-1); 48(A7-1). **Puyango:** 3(TOB3-2); 5 (CHB2-2); 6(TOB4-2); 7(LAB4-3); 8(TOB2-4); 9(LAB3-2); 10(LAB3-3); 11(CHB2-1); 12(TOB1-1); 13(TOB2-1); 15(LAB1-1); 16(LAB4-2); 17(TOB6-2); 18(TOB2-3); 19(TOB2-2); 20(LAB6-2); 21(CHB2-4); 27(CHB3-3); 28(CHB6-1); 32(TOB3-3); 33(TOB4-1); 34(TOB5-2); 35(TOB6-1); 36(LAB1-3); 37(LAB5-2); 38(LAB4-1); 39(CHB1-2); 41(CHB3-4); 44(CHB1-1); 49(CHB5-1); 50(TOB2-5); 51(TOB5-1); 52(CHB5-3); 53(CHB7-1); 54(CHB6-2); 55(TOB6-4); 56(LAB1-2); 57(LAB3-1); 58(CHB3-5);59(CHB2-3)

Una vez realizado la extracción del ADN se procedió a realizar la electroforesis de cada aislado extraído, en algunas muestras repitieron este procedimiento varias veces hasta lograr la expresión del gen 16 rRNA y otros aislados que no lograron la expresión no fueron analizados, en total se obtuvo 59 colonias bacterianas, 40 de ellas pertenece a la microcuenca Puyango y las 19 restantes se obtuvieron en microcuenca de Puyo.

Para la identificación de género y especie de las diferentes colonias bacterianas se necesitaría realizar la secuenciación que permitirá diferenciar entre los distintos microorganismos. Sin embargo se presentaron inconvenientes para realizar la secuenciación ya que no fueron suficiente los reactivos adquiridos para realizar la secuenciación por todas las muestras. Es por ello que se realizó su identificación en base a las características morfológicas que presentaron cada aislado.

5 DISCUSIÓN

Se escogieron dos lugares con características diferentes para realizar el estudio de comunidades bacterianas, dentro de la microcuenca ubicada en Puyo, se valuó en estado natural, ya que se consideró que el crecimiento microbiano espontáneo no se vea afectado por la actividad humana, a diferencia que la microcuenca Puyango, se estimó que se encontraba en estado de intervención. La investigación permitió establecer diferencia de los microorganismos encontrados en cada lugar muestreado.

De la Rosa (2000), manifiesta que existe diversidad de bacterias y cada una depende de su medio de adaptación y características singulares, existiendo microorganismos termófilos que crecen a más de 45°C pero la mayoría son mesófilas con temperaturas óptimas a 37°C, que se adaptan a estas condiciones de elevada temperatura (De la Rosa 2000).

El proceso de adaptación de los microorganismos a las condiciones del medio en que se encuentra depende de varios factores como es el caso de la composición del medio mismo o del estado fisiológico de la cepa, entre otros. Por eso, la variabilidad de las respuestas microbianas influye de manera distinta en la predicción de la cinética de los microorganismos (Dos Santos, 2007), la respuesta de los microorganismos durante el crecimiento se evidencio a través de parámetros como el tiempo, latencia y velocidad crecimiento (Cárdenas, 2013).

5.1 Cuantificación y caracterización morfo-cultural de las comunidades bacterianas de las muestras de agua Puyango (Loja-Sierra) y Puyo (Pastaza-Amazonia) respectivamente.

5.1.1 Cuantificación de las comunidades bacterianas

Durante el procesamiento de muestras de agua y sedimentos, se analizó la cinética de crecimiento de los microorganismos presentes en las zonas de estudio. Para De la Cruz-Leyva *et al.*, (2015), el contexto ambiental y biológico de un ecosistema, radica en la identificación de microorganismos que coexisten en un lugar y tiempo. Por este motivo Corral-Lugo *et al.*, (2012) determina que la cuantificación de microorganismos es un elemento crítico en los estudios de ecología microbiana.

Para la identificación de los microorganismos existentes en las microcuencas ubicadas en Puyango (Loja-Sierra) y Puyo (Amazonia), se tomó en cuenta que las bacterias al crecer

en una superficie de un medio de cultivo sólido (agar nutriente), las células en división permanecen aproximadamente fijas en su posición y forman masas de muchos millones de células, las colonias así formadas varían desde un tamaño diminuto, apenas visible, hasta de varios milímetros de diámetros (Díaz, 2010).

Mediante el proceso de cuantificación se evidenció que la cinética de crecimiento de las unidades formadoras de colonias (UFC), el crecimiento microbiano fue asincrónico puesto que cada microorganismos presentaba diferencia en el ciclo celular (Microbiología Clínica, 2005), estableciendo tres periodos para su análisis, ya que al cabo del tiempo comenzaron a crecer células aisladas presentando diferencia en cada sustrato.

Cada población presento varias etapas durante el crecimiento, siendo características de cada colonia, la curva de crecimiento permitió identificar que dentro de las 24 horas, las células empezaron a sintetizar nutrientes, adaptarse al medio sólido y a la temperatura establecida, (Koneman *et al.*, 2008), se considerado su fase de crecimiento exponencial o logarítmico, en esta etapa el crecimiento de la población bacteriana fue rápida (Ulloa *et al.*, 2010) para algunas muestras de agua y sedimentos.

A las 72 horas (3 días) se encuentran en la fase estacionaria, donde la tasa de crecimiento se hace más lenta o se detiene (Agatangelo, 2007), su crecimiento es menguante por la carencia de nutrientes esenciales del medio o de la acumulación de sustancias que son inhibitoras o toxicas. A partir de este periodo el número de células viables ha alcanzado una meseta y el número de células comienzan a liarse y a morir (Koneman *et al.*, 2008), iniciando la fase de muerte, donde existe un declive del crecimiento hasta las 168 horas (7 días). Es evidente que el periodo óptimo para el crecimiento de las comunidades bacterianas se da en el intervalo de 24 hasta las 72 horas, que entran a la fase estacionaria (Agatangelo, 2007).

La mayoría de microorganismos siguieron un patrón estándar de la curva de crecimiento bacteriano. En la microcuenca en Puyo (Pastaza Amazonia) ubicada dentro de la UEA, las muestras de agua obtenidas, se evidencia una curva de crecimiento dentro de las 24 y 72 horas considerando su fase de crecimiento, en las muestras A-2 y A-3 se evidencia poco crecimiento, por el contrario el punto B las muestras B-1 y B-2 se presencia crecimiento a partir de las 72 horas. Las muestras de sedimento analizadas dentro de esta microcuenca, su fase de crecimiento se encuentra a partir de las 72 horas para las muestras A8, y A-10 su crecimiento fue estacional, en cambio los estratos del punto B, existió

crecimiento en la muestra B-4, para las demás no se evidencio incremento en la población microbiana.

Por otro lado, en la microcuenca del rio Puyango, las muestras de agua en la quebrada Luz de América, no se identificó un crecimiento dentro de las horas de estudio, LA-3 fue el único que se logró diferenciar un mayor incremento de colonias en su fase estacionaria y presentaron fase de muerte, por el contrario la quebrada Chinchal, su fase de crecimiento exponencial se ubica dentro de las 24 y 78 horas, con una mayor población microbiana en las muestras CH-1 y CH-3. En las muestras de sedimentos la cinética de crecimiento en la quebrada Luz de América se dio dentro de las 24 horas, LA-6 no presento incremento microbiano, a diferencia de la quebrada Chinchal presento diferencia en los sustratos durante las 24 y 72 horas, las bacterias lograron utilizar un mayor número de nutrientes en menor tiempo como lo cita Pérez et al (2007), además Staley et al. (2015) menciona que los sedimentos contribuyen hasta un 50% de la composición de la comunidad bacteriana en la columna de agua, por su capacidad de retención de nutrientes.

5.1.2 Morfología de las colonias bacterianas

La morfología de las colonias es una de las características básica de las bacterias y es indispensable su estudio para comenzar correctamente una identificación preliminar, sus características dependen de la naturaleza del medio de cultivo y las condiciones de incubación (Díaz, 2010). Además su reproducción se da dentro de las 24 horas y su caracterización se la realiza mediante un microscopio óptico o electrónico con una adecuada tinción, puesto que estos organismos son incoloros (Vargas, 2014).

Durante la investigación se presentaron inconvenientes en la identificación de género y especies mediante la caracterización morfológica, debido a la imposibilidad de realizar la secuenciación genómica de los aislados bacterianos procedentes de muestras de agua y sedimentos, por lo cual se hace referencia a probables géneros presentes dentro de las microcuencas ubicadas en Puyo y Puyango, cada identificación morfológica se basó en el Atlas et al (2006), la cual presenta características de la microbiota presentada en muestras de agua y sedimentos.

Las bacterias presentaron tres formas básicas, esféricas denominadas cocos, alargadas serán bacilos, las bacterias curvadas y las que tienen forma de espiral son espirilos, espiroquetas, comas o vibriones. Además una colina dependerá del borde y la forma en

que se eleva sobre el medio de cultivo, presentan también otras características como pigmentación, consistencia y comportamiento óptico (Vargas, 2014)

La microbiota bacteriana heterotrófica y oligotrófica predominante en el agua y sedimento consistió de bacterias Gram positivas, con una participación superior del 78 % en agua y 90 % en sedimentos obtenidos en la microcuenca Puyo, y el 96% en agua y 71% en sedimentos en Puyango. En contraste, el menor porcentaje de bacterias Gram negativas no superó el 30 %. Estos resultados no coinciden con lo descrito por Rheinheimer (1987), quién señala que la mayoría de las bacterias marinas son Gram negativas, con proporciones incluso mayores al 90 %.

Descrito en forma específica, dentro de la microcuenca ubicado en el río Puyo, el mayor porcentaje de bacterias se identificaron de género *Coco* Gram positivo con 33% en agua y 30% en sedimentos, y *Bacillus* corto Gram negativo en 22% en agua y 30% en sedimentos. Presentando semejanza en la microcuenca del río Puyango, en la cual el mayor porcentaje de especie presente fue *Bacillus* corto Gram positivo con 39% en muestras de agua y 24% en sedimentos. En base a la tinción de Gram, las colonias en ambos lugares muestreados se identificaron miembros de género *Bacillus*, *Coco*, *Micrococo*, *Spirillum* y *Sarcinas*.

En la propia naturaleza de los ríos, se encuentra una elevada proporción de microorganismos zimógenos, miembros de los géneros *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Cytophaga*, *Spirillum*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Vibrio*, los cuales se encuentran frecuentemente en muestras de agua y sedimentos (Atlas et al, 2006)

Por las características presentadas dentro de los aislados bacterianos, se relacionaron por su crecimiento, forma, borde, color y tinción, bacterias de género *Salmonella*, *Pseudomona*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, siendo Gram negativo, que se adaptan a temperatura de 30°C – 37°C, las cuales se utilizaron para su crecimiento. Otro género es *Staphylococcus*, son células Gram positivas, sus colonias son planas o levemente convexas, de bordes enteros, son opacas y pueden ser de color blanco o beige, ocasionalmente, de color amarillo o naranja (Tang et al., 2014; Seija, 2006)

Los microorganismos del género *Bacillus* son bacilos de gran tamaño (4 – 19µm), Gram positivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos encapsulados. Su característica importante es que forman esporas extraordinariamente resistentes a condiciones

desfavorables (Bartram J *et al.*, 2003). Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en ciclo del carbono y el nitrógeno. Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos (Cuervo, 2010).

Por otra parte los *Micrococcus* presentes su morfología corresponde a los cocos, los cuales son Gram positivos, dispuestos en tétradas o racimos irregulares. Sus colonias suelen ser blancas, amarilla, rojo, de forma circular, borde entero, convexas y crecen en medios simples (Koneman, 2006). Se los considera catalasa positivos y hasta hace poco formaban parte de la familia *Micrococaceae* junto a los géneros *Planococcus* y *Stomacoccus* (Seija, 2008)

El género *Acinetobacter* está compuesto por cocobacilos Gram negativos, oxidasa negativos, no exigentes. Forman colonias lisas, blancas o grisáceas, a veces hemolíticas, similares a las de las enterobacterias. Los miembros de este género habitan en el agua y el suelo, y también forman parte de la flora normal humana de la piel. Las bacterias del género *Neisseria* son cocos Gram negativos, inmóviles, que se agrupan en pares en diplococos, cuya forma se ha comparado a granos de café. Aunque son Gram negativas, contienen endotoxinas, y ultraestructuralmente tienen una pared celular típica de las bacterias Gram negativas (Torres, 2008)

Estos géneros también han sido observados como predominantes por otros 34 autores en ambientes marinos, Schadebrodt (1983) observó un predominio de los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Vibrio* en la Bahía de Corral. A su vez, Macdonell & Hood (1982), en un trabajo realizado en Perdido Bay, Alabama, halló en mayor cuantía a los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio*. Entre los Gram positivos, el género predominante fue *Bacillus* que alcanzó su mayor número en las bacterias oligótroficas de sedimento. Estos resultados están de acuerdo con lo expresado por Rheinheimer (1987), quien señala que los microorganismos esporulados son más frecuentes en los sedimentos, no estando bien difundidos en el agua (Mancilla, 2003)

5.2 Comparación de las comunidades bacterianas obtenidas en cada localidad de estudio, según la cuantificación y las características morfo-culturales.

Realizando la comparación dentro de la finca de la UEA ubicada en la microcuenca Puyo, las muestras de agua del río B obtuvieron una mayor crecimiento con un una variabilidad en colonias en las 24 horas, a diferencia de la microcuenca Puyango donde represento

mayor crecimiento la quebrada Chinchal, presento su crecimiento exponencial en la fase estacionaria a partir de las 24 y 72 horas. Dentro del análisis en las muestras de sedimentos de las UFCg⁻¹, Puyo obtuvo mayor población de comunidades bacterianas dentro del primer lugar de muestre, el cual tuvo un crecimiento exponencial a partir de las 72 y 168 horas, por el contrario Puyango el río Chinchal presento mayor población microbiana dentro de las 24 y 72 horas.

En la caracterización morfológica y cultural, las zonas de estudio no presentaron mayor diferencia en base a la tinción de Gram, pero si en las demás características morfológicas, es por ello que se seleccionó 9 colonias en Puyo y 23 en Puyango, fueron las bacterias que resaltaron mayor diferencia de las demás.

Para lograr diferenciar correctamente la especie y género encontrados en ambos lugares, se necesitó de la secuenciación del ADN, pero por motivos explicados durante la fase de investigación, no se pudo lograr resultados exactos. Pero en base a su morfología, en ambas zonas de estudio se encontraron apariencias de mayor porcentaje filiforme, su forma que mayor predominio fue circular, la elevación entero continuo y plana o aplastada tuvieron mayor porcentaje en muestras de agua y sedimentos, a diferencia del color se presentó mayor diversidad en Puyango con una variabilidad de tonalidad en comparación en Puyo, y en base a la tinción de Gram en muestras de agua se encontraron diferentes géneros de bacterias, identificando ocho clases de bacterias en Puyango, siendo de mayor porcentaje Bacillus corto Gram+ con un valor del 39%, las colonias que estuvieron presentes solo en Puyo fueron Coco Bacillus Gram+, Bacillus corto Gram- y Estreptococo Gram+. Por el contrario la tinción presente en muestras de sedimentos, se diferenciaron 5 clases de genero bacteriano en Puyo con un mayor porcentaje las bacterias de tipo coco Gram + y Bacillus corto Gram+ con un valor de 30%, y en Puyango que se identificaron 9 tipos de bacterias, lo cual cuatro de ella no estuvieron presentes en Puyo las cuales fueron Bacillus corto Gram-, Bacillus largo Gram+, micrococos Gram- y sarcinas coco Gram +.

Como se observa el mayor porcentaje de tinción fue Gram positivo, con 96% de muestras de agua en Puyango y 78% en Puyo. En sedimentos se encontró mayor número de bacterias en Puyo con 90% a diferencia de Puyango con el 71%, la cual tubo menor abundancia de bacterias típicas.

5.3 Identificación molecular de los aislados bacterianos obtenidos y determinación de las relaciones filogenéticas, resultantes de la variabilidad morfo-cultural.

La amplificación específica de los fragmentos de genes 16S rRNA en combinación con electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE) permitirá la identificación del género de procariontas encontrados en dos diferentes ecosistemas. Como se ha mencionado, no fue posible la secuenciación de los aislados bacterianos encontrados en la microcuenca Puyo y Puyango, debido a la falta de insumos en el Centro de Biotecnología en la capacitación del secuenciador PGM. No obstante los resultados finales quedan latentes median cultivos puros, que permitan generen a futuro los resultados esperados.

Durante el transcurso de la investigación se obtuvieron un total de 110 diferentes colonias bacterianas, pero resulto difícil conservarlas a todas, ya que en el tiempo que se realizó la siembra al medio líquido para su purificación y extracción del ADN, algunas de estas colonias no se adaptaron al medio y no lograron la amplificación del gen 16S rRNA. Sin embargo se logró conservar 59 muestras de bacterias, 19 de las cuales pertenecen a la microcuenca Puyo y las 40 restantes se logró identificar en Puyango.

En la figura 25 se logra identificar las bandas presentes con un tamaño aproximadamente de 1500 pb, como lo explica Rodicio y Mendoza (2004) las relaciones filogenéticas entre procariontas se pueden deducir de la comparación de sus ARNr 16S teniendo una enorme repercusión sobre la taxonomía bacteriana, lo que lleva al sistema aplicado actualmente de la clasificación, y permitir una identificación rápida y precisa de las bacterias, por medio de otros tipos de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo, en este caso la caracterización morfológica y cultural no permitió precisión para identificar la especie y género.

Existen estudios sobre diversidad microbiana marina siendo importante y aún poco conocida, debido a la baja culturability y submuestreo. Sin embargo, las secuencias del gen 16S rRNA clonaron directamente de la biomasa nos permiten conocer qué tipos de microbios están presentes, con independencia de cultivo, y para crear sondas adecuadas para el estudio de la biodiversidad (Fuhrman, 1997).

El análisis de secuencia del ARN 16S ribosomal (rRNA) de genes ha sido ampliamente utilizado para identificar especies bacterianas y realizar estudios taxonómicos (Petti *et al.*,

2005 ; Schmalenberger *et al.*, 2001). Estos genes contienen generalmente nueve "regiones hipervariables" que demuestran considerable diversidad de secuencia entre las diferentes especies bacterianas y pueden ser utilizados para la identificación de especies (Van de Peer *et al.*, 1996). Numerosos estudios han identificado secuencias de la región hipervariable de 16S rRNA que identifican una sola especie bacteriana o diferenciar entre un número limitado de diferentes especies o géneros (Chakravorty, 2007).

6 CONCLUSIONES

- Mediante el proceso de cuantificación se evidenció la cinética de crecimiento de las unidades formadoras de colonias (UFC), la cual en ambos ecosistemas presentaron un crecimiento asincrónico por la diferencia del ciclo celular. Las células viables más representativas se eligieron por su cinética de crecimiento, la mayoría se presentaron en la microcuenca Puyango, para la quebrada Chinchal su curva de crecimiento fue estandarizada, y se determinó que los sedimentos contribuyeron hasta un 50% de la composición de la comunidad bacteriana. En la microcuenca Puyo se identificó mayor crecimiento a partir de las 72 y 168 horas para las muestras de sedimentos en el arroyo A.
- Los microorganismos en base a sus características presentaron variabilidad morfológica en ambas zonas de estudio, siendo representados por su mayoría Gram positivos, con un 78 % en agua y 90 % en sedimentos obtenidos en la microcuenca Puyo, y el 96% en agua y 71% en sedimentos en Puyango. Por el contrario las bacterias Gram negativas no superaron el 30 %, correspondiendo mayor parte a géneros de bacterias *Bacillus* y *Coco*. Para las muestras de agua y sedimentos se encontraron colonias con mayor incidencia en *Bacillus* corto Gram positivo.
- El tiempo y las condiciones climáticas fue un factor importante para las comunidades bacterianas, se logró establecer diferencia en ambas zonas de estudio mediante la adaptación que presentaron las comunidades bacterianas. En la cuenca del río Puyo, presenta temperaturas secas y húmedas, y en la cuenca Puyango su clima es cálido seco, se evidencia un crecimiento exponencial y variabilidad en las poblaciones microbianas dentro de la cuenca Puyango, estableciendo un mejor índice de adaptación en este ecosistema. El cambio de condiciones ambientales posiblemente esté vinculado a las variaciones de las poblaciones bacterianas, predominando nuevas especies o una mejor respuesta adaptativa sobre especies nativas de microorganismos.

7 RECOMENDACIONES

- ✓ Para conseguir resultados preciso se debe seguir protocolos de buenas técnicas y seguridad en el momento de realizar las prácticas en campo y laboratorio. Uno de ellos es la tinción de Gram que se debe de realizar dentro de las 24 horas permitiendo una mejor identificación en la pared celular y su teñido tendrá un mejor resultado. Para la secuenciación del ADN se toma en cuenta que esta técnicas moleculares permite obtener una gran cantidad de información sobre comunidades microbianas en ambientes naturales e intervenidos, lo cual se considera realizarlo cuidadosamente en base al protocolo de extracción, y al momento de obtener su la amplificación de la subregión 16S rRN, y proceder a conservar la muestra en un lugar óptimo para futuros análisis.
- ✓ Se debe tomar en cuenta una temperatura y un ambiente óptima para el crecimiento de los aislados bacterianos, ya que se están analizando muestras de dos diferentes ecosistemas, y no se quiere obtener una contaminación dentro de los cultivos, por lo que modificaría los resultados finales.
- ✓ En el momento de realizar la caracterización morfología, describir cada aislado en bases al tiempo de crecimiento ya que en algunos casos, fueron variables y presentaron características diferentes de los asilados al transcurrir más de 72 horas, algunos llegaban a su fase de muerte y es difícil identificarlos posteriormente.
- ✓ Al no lograr la secuenciación de los aislados bacterianos obtenidos, se puede incluir en estudios futuros para su identificación taxonómica, considerando la importancia de las comunidades bacterianas en diferentes ecosistemas, y su aplicación biotecnológica podría determinar la función de los microorganismos en su hábitat y como sus actividades contribuyen en los ciclos biogeoquímicos, considerando además la importancia de continuar con el desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento y estrategias de enriquecimiento.

8 BIBLIOGRAFÍA

Aguirre Núñez, M. 2011. La cuenca hidrográfica en la gestión integrada de los recursos hídricos. REDESMA 5(1). Disponible en: http://www.siagua.org/sites/default/files/documentos/documentos/cuencas_m_aguirre.pdf (Consultado julio 20, 2016)

Bartram J et al. (eds.), 2003. Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. Serie de la OMS Emerging Issues in Water and Infectious Disease. Londres (Reino Unido), IWA Publishing.

Bastardo A, Bastardoo H y Rosales J. 2007. Diversidad funcional de las bacterias heterótrofas bajo río Orinoco, Venezuela. Ecotropicos. 20(1): 15 – 23.

Betancor, L., Gadea, P y Flores K. 2012. Genética Bacteriana. "ADN recombinante. Introducción a la ingeniería genética". 15 p.

Brooks K; Ffolliott P and Magner J. 2012. Hydrology and the management of watersheds. 4ta edición. 552 p.

Cachipundo Ulcuango, R. 2007. Diagnostico biofísico y socioeconómico de la microcuenca del río "La Chimba", a través un sistema de información geográfica. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Tesis Licenciado en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo. Ibarra, Ecuador. 166 p.

Cárdenas Beltrán, N. 2013. Cultivo en biorreactores de células eucariotas superiores (humanas). Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Carrera De Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia. 45 pp.

Cedeño, R. 2005. El uso del DGGE como herramienta molecular para el estudio y caracterización bacteriana. CENAIM ESPOL. N° 128. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8426/1/bquinc128.pdf> (Consultado marzo 04, 2016)

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N y Alland, D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Métodos Microbiol J*: 69 (2): 330-339 pp.

Cordero Domínguez, I. 2013. Evaluación de la gestión territorial de la cuenca del río Paute, estrategias y líneas de acción para superarlas. Tesis magister en ordenamiento territorial. Universidad de Cuenca. 148 p.

Corral-Lugo, A., Morales-García, Y., Pazos-Rojas, L., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R y Muñoz-Rojas, J. 2012. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". San Manuel, México. UN. 14(2).

Cortés S. y A. Zuluaga. 2007. Plan de Acción Ambiental Vereda el Bosque Cuenca Alta del río Otún. Administrador del Medio Ambiente. Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Cristancho, M. 2016. Biodiversidad microbiana de los ecosistemas marinos en la Isla Cayo Serrana durante la Expedición Seaflower. Disponible en: <http://www.gbif.org/dataset/746dbba0-9a4c-4c0c-b462-fbced8436d42>. (Consultado mayo 17, 2016)

De la Cruz- Leyva, M., Zamudio, M., Corona, Al., Gonzales, J y Rojas, R. 2015. Importancia y estudio de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. Scielo.99 – 117 pp. 2015. 2(4).

De la Rosa, J y Mosso, M. 2000. Diversidad Microbiana de las aguas Minerales Termales. Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid – España. 6 pp.

Díaz Cárdenas, C. 2011. Estudio de la composición de la comunidad bacteriana de manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risaralda y Boyacá. Tesis doctor en Ciencias Biológicas. Bogotá – Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. 280 p.

Díaz Martin, G. 2010. Morfología y estructura bacteriana. 9 pp. Disponible en: <https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/morfologia-y-estructura-bacteriana.pdf>. (Consultado junio 22, 2016)

Do Santos, A. 2007. Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Universidad autónoma de Barcelona. 282 pp.

Fuhrman, JA. 1997. Widespread Archaea and novel Bacteria from the deep sea as shown by 16S rRNA gene sequences. MEPS 150. 275 – 285 pp.

Gaona, J., Y. Garza, J. Rodríguez y G. Martínez. 2012. Análisis de la diversidad bacteriana por métodos moleculares no dependientes del cultivo microbiano. CIENCIACIERTA. 8 (29).

GREENFACTS. 2009. Resumen del 2° informe de las naciones unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo. 6 p.

Herrera, M. 2002. Filogenia Bacteriana Mediante El Análisis Del rRNA 16S. Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla-México. Disponible en: <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Departamentos/Samp/Microbiologia/filogenetica.pdf> (Consultado marzo 10, 2016)

Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., Vásquez, A., y M. Cerra. 2014. Los Páramos Andinos ¿Qué Sabemos? UICN. Quito-Ecuador. 9 p.

Jiménez, L. 2009. Caracterización biológica del Biofouling marino mediante métodos moleculares. Aislamiento y determinación de actividad Quorum Sensing de las especies implicadas en el proceso. Tesis. Dr. Universidad de Cádiz, España. 29-30p.

Koneman, E y Allen, S. 2008. Diagnostico Microbiológico. Buenos Aires, Argentina. 6ta edición. Editorial Panamericana. 1349 p.

Madigan, M; Martinko J y Parker J. 2014. Brock Biología de los Microorganismos. Décima edición. Madrid, España. 1080 p.

Mancilla, C. 2003. Aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de la Microbiota Bacteriana de agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia. Tesis licenciado en Ciencias Biológicas. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 59 p.

Marín, R. 2003. Físicoquímica y Microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de las aguas. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España.

Mejía Clara, M. 2005. Análisis de la calidad del agua para consumo humano y percepción local de las tecnologías apropiadas para su desinfección a escala domiciliaria, en la microcuenca El Limón, San Jerónimo, Honduras. Tesis maestría en Manejo Integrado de

Cuencas Hidrográficas. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 123 p.

Microbiología Clínica, 2005. Concepto y expresión matemática del crecimiento bacteriano. Disponible en: <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema%2002.pdf>. (Consultado junio 22, 2016)

Miravet Regalado, M. 2003. Abundancia, actividad y diversidad de las bacterias heterótrofas en el Golfo de Batabanó y su uso como indicadoras ambientales. Habana, Cuba. 188 p.

Montaño N, Sandoval A, Camargo S y Sánchez J. 2010. Los microorganismos pequeños gigantes. Ciencia y Cultura Elementos. 15 (2). 15 – 23 p.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Roma, 1997. Servicio de Recursos, Manejo y Conservación de suelos Dirección de Fomento de Tierras y Aguas, FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/W2962S/w2962s00.htm#Contents>. (Consultado julio 20, 2016)

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). 2007. Plan De La Sexta Fase Del PHI. Disponible en: http://webworld.unesco.org/water/ihp/ihp_six_es.shtml. (Consultado julio 09, 2016)

Piñero, D. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudio en especies mexicanas. 1 (15). 65 pp.

Rheinheimer, G. 1987. Microbiología de las aguas. Editorial Acribia, Zaragoza. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/fcm269a/doc/fcm269a.pdf>. (Consultado julio 12, 2016)

Rodicio y Mendoza, 2004. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. Sciencedirect. 22(4), 2004, Pages 238-245

Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F y García, J. 2005. Bacteriología General. 477 pp. Editorial universidad de Costa Rica. Costa Rica.

Rojas Triviño, A. 2011. Conceptos y Práctica de microbiología general. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 160 p.

Sabater, S., J. Charles., A. Giorgi y A. Elozegi. 2009. Conceptos y técnicas en ecología fluvial. El río como ecosistema. Disponible en: http://www.fbbva.es/TLFU/microsites/ecologia_fluvial/pdf/cap_02.pdf. (Consultado julio 25, 2016)

Santambrosio, E., M. Ortega y P. Garibaldi. 2009. Tinción y observación de microorganismos. Tesis Ing. Química. Universidad Tecnológica Nacional. 2-3p.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMART). 2013. Cuencas hidrográficas. Fundamentos y perspectivas para su manejo y gestión. México. 29 p.

Seija, V. 2008. Género Staphylococcus. 257 – 271 pp. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>. (Consultado julio 02, 2016)

Serrano, P. 2014. Obtención del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la laguna de Colta del cantón Colta. Tesis Ing. Biotecnología Ambiental. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Ecuador. 32p.

Silva H; Villalobos B and Ortega D. 2012. Calidad bacteriológica del agua del río Cataniapo, Municipio Atures, Estado Amazonas, Venezuela. Vol III (1). 8 pp.

Torres, J., C. Frías y C. De La Torre. 2014. Adaptación en ecosistemas de montaña. Primera edición. Editorial Soluciones Prácticas. Lima, Perú. 37p

Torres, M. 2008. Principales grupos de bacilos y cocos gramnegativos exigentes. 291 – 313 p.

Umaña Gómez, E. 2002. Manejo de Cuencas Hidrográficas y protección de fuentes de agua. Universidad Nacional Agraria. San Nicolás, Nicaragua. 27 p. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsade/fulltext/cuencas.pdf> (Consultado julio 10, 2016)

Vargas Flores, T y Kuno Vargas, A. 2014. Morfología bacteriana. Revista de actualización Clínica, 49(2).

Villa Achupallas, M. 2011. Evaluación de la calidad del agua en la microcuenca del río Yacuambí. Propuestas de tratamiento y control de la contaminación. Tesis master en gestión integral del agua. Universidad de Cádiz, España.

9 ANEXOS

Anexo 1 Conteo de las UFC g sedimento-1, Puyo

SEDIMENTOS																			
RIO "A"										RIO "B2"									
	A8			A9			A10			B4			B5			B6			
	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	
S10-5	1	0	9	46	0	0	0	1	1	73	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	2	0	37	42	0	0	23	0	0	111	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	3	1	0	48	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	4	1	9	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2.00E +05	5.50E +06	1.61E +07	0.00E +00	1.00E +05	2.30E +06	1.00E +05	1.00E +05	1.84E +07	0.00E +00	0.00E +00	0.00E +00	0.00E +00	0.00E +00	0.00E +00	2.00E +05	1.00E +05	
S10-6	1	0	0	0	11	14	0	2	10	11	2	0	0	1	0	0	0	1	0
	2	0	2	1	24	38	1	3	13	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	1	0	5	21	2	3	17	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	4	0	1	0	5	26	1	6	10	3	0	0	5	1	0	0	0	0	0
		0.00E +00	4.00E +05	1.00E +05	4.50E +06	9.90E +06	4.00E +05	1.40E +06	5.00E +06	1.60E +06	3.00E +05	2.00E +05	5.00E +05	1.00E +05	2.00E +05	0.00E +00	0.00E +00	1.00E +05	0.00E +00
S10-7	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	6	94	30	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	1	0	3	0	14	107	22	0	0	0	0	8	0
	3	0	5	0	0	2	2	0	1	0	46	101	11	0	0	0	0	1	0
	4	0	2	0	0	0	99	2	6	0	68	31	17	0	0	1	2	0	2
		0.00E +00	8.00E +05	0.00E +00	0.00E +00	3.00E +05	1.02E +07	2.00E +05	1.00E +06	0.00E +00	1.34E +07	3.33E +07	8.00E +06	0.00E +00	0.00E +00	1.00E +05	2.00E +05	9.00E +05	2.00E +05

Anexo 2 Conteo de las UFC ml-1 de agua, Puyo

AGUA																			
RIO "A"										RIO "B"									
		A1			A2			A3			B1			B2			B3		
		Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7
S10-4	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0	1	15	0	1	0	1	0	0	
	2	0	4	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	6	0	0	0	
	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	42	0	0	0	0	
		0.00E +00	8.00E +05	0.00E +00	0.00E +00	2.00E +05	0.00E +00	0.00E +00	0.00E +00	1.00E +05	1.00E +05	1.30E +06	1.60E +06	1.00E +05	5.70E +06	6.00E +05	1.00E +05	0.00E +00	0.00E +00
S10-5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	
		2.00E +05	1.00E +05	0.00E +00	0.00E +00	1.00E +05	1.00E +05	0.00E +00	0.00E +00	1.00E +05	2.00E +05	0.00E +00	0.00E +00	0.00E +00	6.00E +05	0.00E +00	0.00E +00	0.00E +00	0.00E +00
S10-6	1	0	2	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	13	64	0	0	0	
	3	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	1	0	
	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0.00E +00	5.00E +05	1.00E +05	1.00E +05	0.00E +00	0.00E +00	0.00E +00	2.00E +05	0.00E +00	0.00E +00	0.00E +00	1.00E +05	4.00E +05	1.30E +06	6.60E +06	0.00E +00	1.00E +05	0.00E +00

Anexo 3 Conteo de las UFC g sedimento⁻¹, Puyango

SEDIMENTOS																				
Río TO "B"		Río LAz "B"									Río CH "B"									
		B4			B5			B6			B5			B6			B7			
		Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	
S 10-5	1	6	2	8	3	7	9	2	3	1	0	6	3	0	40	2	0	41	1	
	2	3	26	5	2	1	3	5	2	1	0	20	2	0	50	3	0	17	2	
	3	0	9	5	2	2	4	0	1	2	0	7	3	0	16	2	0	38	0	
	4	1	2	9	1	1	2	3	2	5	0	13	4	0	24	5	0	8	3	
		1.00E	3.90E	2.70E	8.00E	1.10E	1.80E	1.00E	8.00E	9.00E	0.00E	4.60E	1.20E	0.00E	1.30E	1.20E	0.00E	1.04E	6.00E	
		+06	+06	+06	+05	+06	+06	+06	+05	+05	+00	+06	+06	+00	+07	+06	+00	+07	+05	
S10-6	1	1	0	3	0	3	1	0	0	0	0	1	1	0	8	0	0	3	1	
	2	0	2	1	1	72	0	0	0	0	0	2	1	0	6	2	0	1	1	
	3	0	0	3	0	0	2	0	1	1	0	34	0	0	12	0	0	2	1	
	4	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	5	0	0	4	2	0	0	6	
		1.00E	2.00E	7.00E	1.00E	7.70E	3.00E	0.00E	1.00E	2.00E	0.00E	4.20E	2.00E	0.00E	3.00E	4.00E	0.00E	6.00E	9.00E	
		+05	+05	+05	+05	+06	+05	+00	+05	+05	+00	+06	+05	+00	+06	+05	+00	+05	+05	
S10-7	1	0	0	2	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	2	0	1	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	66	1	0	10	1	
	4	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0.00E	3.00E	5.00E	1.00E	2.00E	3.00E	0.00E	3.00E	1.00E	0.00E	1.00E	0.00E	0.00E	0.00E	6.60E	1.00E	0.00E	1.00E	1.00E
		+00	+05	+05	+05	+05	+05	+00	+05	+05	+00	+05	+00	+00	+06	+05	+00	+06	+05	

Anexo 4 Conteo de las UFC ml-1 de agua, Puyango

AGUA																			
Río TO "B"		Río LAz "B"									Río CH "B"								
		B1			B2			B3			B1			B2			B3		
		Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7	Día 1	Día 3	Día 7
S 10-5	1	4	1	4	0	1	0	16	6	2	0	21	14	0	8	6	0	13	2
	2	4	0	2	0	0	0	0	0	2	0	25	13	0	4	1	0	16	1
	3	5	3	4	0	0	1	10	5	0	0	7	3	0	6	4	0	13	1
	4	2	1	2	0	0	0	6	25	2	0	19	10	0	5	6	0	12	3
		1.50E	5.00E	1.20E	0.00E	1.00E	1.00E	3.20E	3.60E	6.00E	0.00E	7.20E	4.00E	0.00E	2.30E	1.70E	0.00E	5.40E	7.00E
		+06	+05	+06	+00	+05	+05	+06	+06	+05	+00	+06	+06	+00	+06	+06	+00	+06	+05
S10-6	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	20	0	3	2	0	1	0
	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	5	2	0	2	1	0	5	1
	3	0	1	0	0	0	0	2	1	0	0	1	3	0	1	0	0	2	0
	4	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	4	1	0	2	1	0	0	1
		2.00E	2.00E	0.00E	0.00E	0.00E	0.00E	3.00E	2.00E	2.00E	0.00E	1.20E	2.60E	0.00E	8.00E	4.00E	0.00E	8.00E	2.00E
		+05	+05	+00	+00	+00	+00	+05	+05	+05	+00	+06	+06	+00	+05	+05	+00	+05	+05
S10-7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	3	2	0	0	0	0	0	5	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
		2.00E	0.00E	0.00E	0.00E	0.00E	0.00E	5.00E	3.00E	0.00E	0.00E	2.00E	0.00E	0.00E	2.00E	0.00E	0.00E	0.00E	1.00E
		+05	+00	+00	+00	+00	+00	+05	+05	+00	+00	+05	+00	+00	+05	+00	+00	+00	+05

Anexo 5 Caracterización morfológica de las colonias bacterianas obtenidas de los aislamientos en muestras de agua de la cuenca Puyo

Río	Muestra	Número	Apariencia	Forma	Elevación	Color	Borde	Tinción
A	1	1	Crecimiento filiforme	Irregular	Plana o aplastada	Café	Ondulada	Coco gram +
A	1	2	Crecimiento filiforme	Irregular	Plana o aplastada	Blanco	Ondulado 2	Coco gram +
A	2	1	Difuso	Circular	Plana o aplastada	Naranja	Entero Continuo	Coco gram +
A	2	2	Crecimiento filiforme	Filamentosa	Plana o aplastada	Blanco	Ondulado 2	Bacillus corto gram +
A	3	1	Crecimiento filiforme	Irregular	Plana o aplastada	Café	Ondulada	Bacillus corto gram -
A	3	2	Crecimiento filiforme	Irregular	Plana o aplastada	Blanco	Ondulada	Estreptococo Gram +
B	1	1	Crecimiento filiforme	Circular	Convexa baja	Naranja	Entero Continuo	Bacillus largo Gram +
B	1	2	Crecimiento filiforme	Irregular	Plana o aplastada	Blanco	Ondulado 2	Coco bacillus Gram +
B	2	1	Difuso	Irregular	Plana o aplastada	Blanco	Ondulada	Bacillus corto gram -

Anexo 6 Caracterización morfológica de las colonias bacterianas obtenidas de los aislamientos en muestras de agua de la cuenca Puyango

Rio	Muestra	Número	Apariencia	Forma	Elevación	Color	Borde	Tinción
CH-B	1	2	Crecimiento filiforme	Circular	Elevada	Beige	Entero Continuo	Coco gram +
CH-B	2	1	Crecimiento filiforme	Circular	Elevada	Beige	Entero Continuo	Bacillus corto gram +
CH-B	2	2	Crecimiento filiforme	Circular	Elevada	Amarilla	Entero Continuo	Bacillus largo Gram +
CH-B	2	3	Crecimiento filiforme	Filamentosa	Plana o aplastada	Café	Ondulado 2	Bacillus largo Gram +
CH-B	2	4	Difuso	Filamentosa	Plana o aplastada	Beige	Ondulada	estreptobacillus gram +
CH-B	3	3	Crecimiento filiforme	Filamentosa	Plana o aplastada	Beige	Ondulada	Coco gram +
CH-B	3	4	Crecimiento filiforme	Circular	Elevada	Translucido	Ondulada	Coco gram + agrupado en razimos
CH-B	3	5	Crecimiento filiforme	Circular	Plana o aplastada	Beige	Entero Continuo	bacillus corto gram +
LAz-B	1	1	Crecimiento filiforme	Filamentosa	Elevada	Beige	Ondulada	Bacillus Gram +
LAz-B	1	2	Difuso	Circular	Plana o aplastada	Translucido -beige	Entero Continuo	Bacillus corto gram +
LAz-B	1	3	Crecimiento filiforme	Circular	Plana o aplastada	Beige	Entero Continuo	Bacillus corto gram +
LAz-B	3	1	Crecimiento filiforme	Circular	Elevada	Café	Entero Continuo	Bacillus corto gram +
LAz-B	3	2	Crecimiento filiforme	Circular	Elevada	Naranja	Entero Continuo	Bacillus corto gram +
LAz-B	3	3	Crecimiento filiforme	Circular	Convexa baja	Amarilla	Entero Continuo	Sarcinas coco gram +
To-B	1	1	Crecimiento filiforme	Circular	Elevada	Blanco	Entero Continuo	Coco gram -
To-B	2	1	Crecimiento filiforme	Circular	Plana o aplastada	Translucido-rosa	Entero Continuo	Coco gram +
To-B	2	2	Crecimiento filiforme	Circular	Elevada	Naranja	Entero Continuo	Bacillus corto gram +
To-B	2	3	Crecimiento filiforme	Circular	Plana o aplastada	Translucido	Entero Continuo	Bacillus largo Gram +
To-B	2	4	Crecimiento filiforme	Irregular	Elevada	Blanco	Ondulada	Bacillus corto gram +
To-B	2	5	Crecimiento filiforme	Circular	Elevada	Blanco	Entero Continuo	Coco gram + agrupado en razimos
To-B	3	2	Crecimiento filiforme	Circular	Convexa baja	Translucido	Entero Continuo	Coco gram +
To-B	3	3	Crecimiento filiforme	Irregular	Plana o aplastada	Translucido	Ondulada	Bairllus corto Gram +

Anexo 7 Caracterización morfológica de las colonias bacterianas obtenidas de los aislamientos en muestras de sedimentos de la cuenca Puyo

Rio	Muestra	Número	Apariencia	Forma	Elevación	Color	Borde	Tinción
A	7	1	Crecimiento Filiforme	Circular	Elevada	Amarillo	Entero o continuo	Bacillus Corto Gram +
A	7	2	Barbado	Circular	Plana o aplastada	Café-translucido	Entero o continuo	Bacillus Corto Gram +
A	8	1	Crecimiento Filiforme	Circular	Elevada	Amarillo	Entero o continuo	Coco gram +
A	8	2	Crecimiento Filiforme	Circular	Elevada	Beige	Entero o continuo	Coco gram +
A	8	3	Crecimiento Filiforme	Circular	Plana o aplastada	Blanco	Entero o continuo	Coco gram +
B	4	1	Difuso	Filamentosa	Plana o aplastada	Translucido	Ondulada 2	Bacillus Corto Gram +
B	5	1	Crecimiento Filiforme	Irregular	Plana o aplastada	Naranja	Ondulada 2	Coco gram + agrupado en razimos
B	5	2	Crecimiento Filiforme	Irregular	Elevada	Beige	Odulada	Bacillus gram +
B	5	3	Crecimiento Filiforme	Irregular	Plana o aplastada	Transparente	Odulada	Bacillus gram +
B	6	4	Barbado	Irregular	Elevada	Café	Odulada	Bacillus gram -

Anexo 8 Caracterización morfológica de las colonias bacterianas obtenidas de los aislamientos en muestras de sedimentos cuenca Puyango

Rio	Muestra	Número	Apariencia	Forma	Elevación	Color	Borde	Tinción
CH-B	5	1	Crecimiento Filiforme	Circular	Convexa baja	Naranja	Entero o continuo	Coco gram + agrupado en razimos
CH-B	5	3	Crecimiento Filiforme	Circular	Elevada	Blanco	Entero o continuo	Bacillus corto gram -
CH-B	6	1	Barbado	Circular	Convexa baja	Blanco	Entero o continuo	Sarcinas coco gram +
CH-B	6	2	Crecimiento Filiforme	Circular	Elevada	Amarillo	Entero o continuo	Coco gram +
CH-B	7	1	Crecimiento Filiforme	Circular	Elevada	Transparente	Ondulada 2	Bacillus largo gram +
LAz-B	4	1	Equinulado	Filamentosa	Plana o aplastada	Beige	Ondulada 2	Bacillus corto gram +
LAz-B	4	2	Crecimiento Filiforme	Circular	Plana o aplastada	Translucido	Entero o continuo	Bacillus corto gram +
LAz-B	4	3	Crecimiento Filiforme	Circular	Elevada	Beige	Entero o continuo	Coco gram +
LAz-B	5	2	Difuso	Circular	Plana o aplastada	Beige	Entero o continuo	Bacillus gram +
LAz-B	6	2	Crecimiento Filiforme	Circular	Elevada	Blanco	Entero o continuo	Coco gram +
To-B	4	1	Difuso	Irregular	Elevada	Beige	Odulada	micrococos gram -
To-B	4	2	Crecimiento Filiforme	Irregular	Plana o aplastada	Beige	Odulada	Bacillus corto gram -
To-B	5	1	Difuso	Irregular	Plana o aplastada	Beige	Odulada	Bacillus gram -
To-B	5	2	Crecimiento Filiforme	Circular	Plana o aplastada	Translucido	Ondulada 2	Bacillus corto gram +
To-B	6	1	Crecimiento Filiforme	Circular	Elevada	Naranja	Odulada	Bacillus corto gram +
To-B	6	2	Crecimiento Filiforme	Circular	Convexa baja	Beige	Entero o continuo	Bacillus corto gram -
To-B	6	4	Crecimiento Filiforme	Irregular	Plana o aplastada	Translucido	Odulada	Bacillus largo gram +

