

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EFICACIA DE LOS MÉTODOS DE
FILTRACIÓN ACTIVO Y PASIVO PARA DOCUMENTAR LA DIVERSIDAD
GENÉTICA DE CIANOBACTERIAS EN LOS RÍOS DE LA BAHÍA ALMIRANTE,
BOCAS DEL TORO

JACQUELINE TERESA DELGADO PERÉZ

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN BIOLOGIA MOLECULAR

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2023

DEDICATORIA

Para todos aquellos que quieren conocer, aprender y cuidar el medio ambiente y la salud a través de las cianobacterias.

A familiares, profesores, amigos y compañeros, que han aportado a mi crecimiento personal y profesional.

A quienes no están con nosotros, pero nos brindaron gratos momentos, Hela y Hurón.

Con cariño para todos ustedes. Gracias

AGRADECIMIENTO

Doy gracias primeramente a Dios por otorgarme la fuerza y perseverancia que siempre me acompaña.

Agradezco a mi familia, por estar allí siempre, a mis compañeros por el apoyo y mis amigos quienes me brindaron todo su tiempo siempre, todo para alcanzar esta meta.

A la Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), por permitirme la oportunidad de participar en el programa, y otorgarme los recursos financieros necesarios.

Al Instituto de Investigaciones Tropicales Smithsonian (STRI) por aceptarme y permitirme usar sus instalaciones y equipo, muy especialmente a mi Asesora, la Dra., Rachel Collin, por su orientación y consejos, también a todo el equipo del Collin Lab, por su apoyo. A mi co-asesora, la Dra. Kristin Saltonstall, por su orientación y paciencia a la hora de explicarme, a la Lab Manager Marta Vargas, por las enseñanzas en las largas horas de laboratorio, y el equipo del Ecological and Evolutionary Genomics (EEG), que siempre estuvo allí para darme cualquier ayuda que necesite.

A la estación de Bocas del Toro del STRI, por permitirme el uso de sus instalaciones, y todos estar dispuestos a ayudar por cualquier problema que surgiera. A las chicas de Marine Geo por todo lo brindado y siempre estas dispuestas a ayudar, en especial a Viviana Bravo por siempre estar pendiente de la logística de los muestreos.

A la Universidad de Panamá, por la dedicación y esmero en el programa de la Maestría en Biología Molecular, y sus profesores a la hora de enseñarnos.

Mi co-asesores la profesora Maira Díaz y el profesor Janzel Villalaz, por siempre estar dispuestos a aclararme las dudas.

A mis compañeros del programa que siempre estuvieron dispuestos a tender una mano, y brindar su apoyo en el momento indicado.

A mis verdaderos amigos, que a pesar de no saber del tema estuvieron dispuestos a brindarme su tiempo para escuchar mis explicaciones, Marianela Camarena, Maybelin Ureña, Rafael Aguilar, Eri Jiménez, Lourdes Vargas, Lenin de León, Dailyn Santana, Christin Macre, María Pérez, Elizabeth Vega y Christopher Aguilar y en especial a quien estuvo corrigiéndome y ayudándome a ver errores en el escrito de mi tesis, Gricel García, y escuchándome siempre, brindándome sus consejos, Andreina Ríos. Quienes me motivaron siempre a seguir Linda Calle y Mabelle Chong.

A todas las personas que, de alguna manera u otra, me ayudaron y que, por error, olvidé mencionar.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| DEDICATORIA | 2 |
| AGRADECIMIENTO | 3 |
| ÍNDICE GENERAL | 5 |
| ÍNDICE DE CUADROS | 8 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 9 |
| ABREVIATURAS UTILIZADAS | 11 |
| RESUMEN 13 | |
| SUMMARY | 14 |
| I INTRODUCCIÓN | 15 |
| OBJETIVOS | 20 |
| Objetivo general | 20 |
| Objetivos específicos..... | 20 |
| II REVISIÓN DE LITERATURA | 21 |
| 2.1.Clasificación de las aguas de un río | 22 |
| 2.2.Muestreo de eDNA en ecosistemas de agua dulce..... | 24 |
| 2.3.Diversidad y Clasificación de las cianobacterias | 25 |
| 2.3.1.Ejemplo de cianobacterias | 26 |
| 2.4.Importancia de microorganismos en agua dulce | 27 |
| 2.4.1.Importancia de las cianobacterias en ecosistemas de agua dulce | 28 |
| 2.5.Humedal San San Pond Sak | 28 |
| III MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| 3.1.Sitio de muestreo | 32 |
| 3.2.Estandarización del proyecto | 36 |
| 3.2.1.Tiempo de exposición de los filtros al agua | 36 |
| 3.2.2.Selección del Primer | 38 |
| 3.2.3.Selección de la Taq Polimerasa | 39 |
| 3.2.4.Limpieza de los equipos | 39 |
| 3.2.5.Preparación de Blancos..... | 39 |
| 3.3.Recolección de muestras | 40 |

| | |
|--|----|
| 3.3.1.Recolección activa de eDNA..... | 40 |
| 3.3.2.Recolección pasiva de eDNA | 41 |
| 3.3.3.Toma de datos fisicoquímicos | 42 |
| 3.3.Extracción de ADN | 43 |
| 3.3.1.Corte de filtros | 43 |
| 3.3.2.Extracción de eDNA..... | 44 |
| 3.3.3.Cuantificación de ADN | 44 |
| 3.4.Metabarcode del eDNA..... | 45 |
| 3.4.1.PCR1 | 45 |
| 3.4.2.PCR2..... | 46 |
| 3.4.3.Bibliotecas | 47 |
| 3.5.Bioinformática..... | 49 |
| 3.6.Análisis estadístico..... | 50 |
| IV RESULTADOS..... | 51 |
| 4.1.Estandarización del proyecto | 52 |
| 4.1.1.Tiempo de exposición de los filtros al agua | 52 |
| 4.1.2.Selección del primer o cebador..... | 53 |
| 4.1.3.Selección de la Taq polimerasa. | 54 |
| 4.2.Muestras recolectadas | 55 |
| 4.2.1.Barcoding de las muestras | 55 |
| 4.2.2.Cuantificación del ADN mediante en NanoDrop | 56 |
| 4.2.3.Estadísticos de las muestras..... | 58 |
| 4.2.2.Diferencia de diversidad en cianobacterias capturadas entre ríos y lagos..... | 64 |
| 4.2.4.Determinar si las condiciones físicas de los ríos influyen en los diferentes métodos de recolección..... | 66 |
| V DISCUSIÓN | 70 |
| 5.1.Diversidad de cianobacterias capturadas por cada método | 71 |
| 5.2.Diferencia de diversidad en cianobacterias capturadas entre ríos y lagos | 72 |
| 5.3.Determinar si las condiciones físicas de los ríos influyen en los diferentes métodos de recolección..... | 72 |
| 5.3.1.pH | 72 |
| 5.3.2.Salinidad | 73 |

| | |
|---|----|
| 5.4.Diversidad de Cianobacterias en Bocas del Toro..... | 73 |
| VI CONCLUSIÓN..... | 75 |
| VII RECOMENDACIONES | 77 |
| VIII LITERATURA CITADA | 79 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | | |
|-----------|--|----|
| Cuadro 1. | Información adicional de los puntos de muestreo (Clark, 2022; De La Cruz-Cabrera et al., 2020, Recursos Naturales Y Biodiversidad Del Área Recreativa De Gatún, Colón, 2007, septiembre 2008, n.d.). | 35 |
| Cuadro 2. | Primers utilizados durante la estandarización del proyecto. | 38 |
| Tabla 1. | Promedio por hora de los resultados de la cuantificación de ADN con el NanoDrop. | 52 |
| Tabla 2. | Cuantificación promedio del ADN con el NanoDrop para cada uno de los sitios. | 56 |
| Tabla 3. | Cantidad de secuencias obtenidas en cada uno de los sitios de muestreo. | 58 |
| Tabla 4. | Comparación de las comunidades de Cianobacteria con una prueba de Wilcoxon entre las poblaciones de las muestras activas y pasivas para cada uno de los sitios. | 60 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1. | Mapa de los sitios de muestreo. | 32 |
| Figura 2. | Ríos de aguas ácidas. | 33 |
| Figura 3. | Ríos de aguas básicas. | 34 |
| Figura 4. | Lagos escogidos. | 35 |
| Figura 5. | Filtración pasiva en peceras de agua dulce, acuarios de NAOS. | 37 |
| Figura 6. | Ensayo de distintas horas de exposición al agua de filtros pasivos. | 37 |
| Figura 7. | Filtración activa de muestras recolectadas en el muelle de STRI, Gamboa. | 41 |
| Figura 8. | Recolección activa (A) y pasiva (B) de eDNA, una vez obtenidos los filtros en cada tratamiento se procede con la extracción de ADN (Creado con Biorender.com). | 42 |
| Figura 9. | Colocación de los filtros para la filtración pasiva en el Muelle de STRI, Lago Gatún. | 43 |
| Figura 10. | Filtros cortados. | 44 |
| Figura 11. | Hit de limpieza y purificación The Just-a-Plate para 96 platos. | 48 |
| Figura 12. | Limpieza y concentración de las bibliotecas con cuentas magnéticas. | 49 |
| Figura 13. | BioAnalyzer realizado a la biblioteca. | 49 |
| Figura 14. | Flujograma del trabajo de laboratorio. | 50 |
| Figura 15. | Resultados de las reacciones de PCR de 12 y 24 horas. | 52 |
| Figura 16. | Resultado de prueba de PCR para los tres primeros específicos para cianobacterias. | 53 |
| Figura 17. | Resultados de diferentes pruebas de PCR. | 54 |
| Figura 18. | Muestras de la filtración activas con sus respectivos Index. | 55 |
| Figura 19. | Muestras de la filtración pasiva con sus respectivos Index. | 55 |
| Figura 20. | Platos de 96 con las muestras para filtración activa (Plato color rosado) y filtraciones pasivas (Plato de color verde). | 56 |
| Figura 21. | Promedio de los valores obtenidos con el NanoDrop para cada uno de los sitios. | 57 |
| Figura 22. | Diversidad de las cianobacterias encontradas en cada uno de los métodos se colecta. | 59 |
| Figura 23. | Diversidad hallada por cada uno de los métodos utilizados en cada uno de los | |

| | | |
|------------|---|----|
| | sitios de muestreo..... | 60 |
| Figura 24. | Comunidades capturadas por los métodos utilizados en cada uno de los sitios..... | 62 |
| Figura 25. | Abundancia de las comunidades (a nivel de género) capturadas por cada uno de los métodos en cada uno de los sitios..... | 62 |
| Figura 26. | Alfa diversidad presente en ríos y lagos. | 64 |
| Figura 27. | Diversidad capturada por cada uno de los métodos en ríos y lagos..... | 64 |
| Figura 28. | Abundancia relativa de las comunidades (por familia) de cianobacterias capturadas para ríos y lagos. | 65 |
| Figura 29. | Alfa Diversidad de los pH presentes en los sitios estudiados. | 67 |
| Figura 30. | Comparación entre las comunidades de Cianobacterias encontradas en diferentes rangos de pH. | 67 |
| Figura 31. | Alfa diversidad con respecto a la salinidad presente en salinidad baja (<1) y salinidad alta (>1). | 69 |
| Figura 32. | Comunidades presentes en las salinidades altas y bajas de los sitios muestreados..... | 69 |

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ASV: Amplicon Sequence Variants o variantes de secuencia de amplicones.

eDNA: ADN ambiental por sus siglas en inglés, environmental DNA (eDNA).

rRNA: ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal (ARNr o sus siglas en inglés rRNA).

UTM: sistema de coordenadas universal transversal de Mercator (en inglés Universal Transverse Mercator, UTM).

msnm: metros sobre el nivel del mar.

STRI: Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, por su nombre en inglés, Smithsonian Tropical Research Institute.

IDAAN: Instituto Nacional de Acueductos y Alcantarillados Nacionales.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

F: forward (iniciador hacia adelante).

R: reverse (iniciador reverso).

PCR: Polymerase Chain Reaction, en español Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RESUMEN

Los estudios de la diversidad genética de comunidades microbiológicas en agua dulce no son muy abundantes, siendo que estos aportarían gran información sobre la salud y ecología de ríos de importancia tanto ecológica como comercial y de consumo. Bajo ciertas condiciones ambientales (como lo es el pH), algunas cianobacterias tienen la capacidad de originar "floraciones algales", proliferaciones masivas protagonizadas una o pocas especies que dominan el fitoplancton, que pueden representar un serio riesgo para el hombre y para toda la biota asociada a los cuerpos de agua afectadas. Por lo que en este proyecto se determinara si las condiciones de los ríos o lagos influyen en la diversidad capturada de cianobacterias utilizando el ADN ambiental o eDNA y el 16s como marcador genético.

SUMMARY

Studies of the genetic diversity of microbiological communities in freshwater are not very abundant, and these would provide important information on the health and ecology of rivers of ecological, commercial, and consumer importance. Under certain environmental conditions (such as pH), some cyanobacteria can cause “algal blooms,” massive proliferations led by one or a few species that dominate the phytoplankton, which can represent a serious risk for humans and the entire biota. Associated with the affected water bodies. Therefore, in this project, it will be determined whether the conditions of the rivers or lakes influence the captured diversity of cyanobacteria using environmental DNA or eDNA and 16s as a genetic marker.

I INTRODUCCIÓN

El agua es una de las limitaciones más importantes en el desarrollo del ser humano, es necesaria para crear y mantener los puestos de trabajo en todos los sectores de la economía. La mitad de la mano de obra mundial está empleada en ocho sectores, que dependen del agua y de los recursos naturales: agricultura, bosques, pesca, energía, producción con uso intensivo de recursos, reciclaje, construcción y transportes; por lo tanto, mantener su equilibrio debería ser una prioridad, dado que, su escasez y contaminación es una amenaza para los seres humanos. La creciente demanda de agua en la agricultura, la industria y el consumo doméstico han creado competencias que se observan en el crecimiento demográfico y a la falta de planificación, educación y conciencia para el manejo y uso adecuado del agua, lo que genera consecuencias como acidez de los suelos, enormes cantidades de sedimentos en ríos y lagos, enfermedades gastrointestinales derivadas de su consumo y aumento de abortos y malformaciones genéticas por la presencia de metales pesados en aguas (Agudelo, 2005). Lo realmente preocupante es que las decisiones de gestión se basan en información muy limitada y en ocasiones sesgada, generada por enfoques que no reflejan nuestra comprensión de cómo los ecosistemas y las especies interactúan (Woodward *et al.*, 2013). Determinar el tipo de microorganismos presentes en el agua y su concentración proporciona herramientas indispensables para conocer la calidad de ésta, y para la toma de decisiones con relación al control de vertidos, tratamiento de aguas y conservación del ecosistema, evitando así el riesgo de contaminación de las personas y el ambiente (Pulido, 2005).

El análisis de las estructuras de las comunidades microbianas, las características de la distribución microbiana y la función en los ecosistemas acuáticos es importante para los estudios ecológicos (Li *et al.*, 2015). No obstante, existe una gran dificultad para

determinar la presencia de todos los microorganismos patógenos implicados en los procesos de contaminación ambiental. Los agentes patógenos implicados en la transmisión hídrica de enfermedades son bacterias, virus, protozoos, helmintos y cianobacterias. Estos microorganismos pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde una gastroenteritis simple hasta cuadros graves de diarrea, disentería, hepatitis o fiebre tifoidea. Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos, concentración y reacción frente a factores ambientales, pero son más fáciles, rápidos y económicos de identificar (Pulido, 2005).

Las Cyanophyta también conocidas como Cianobacterias o algas verdes azules, son un grupo de organismos procariotas que presentan el mismo aparato fotosintético que las algas eucariotas y de las plantas superiores, incluyendo las dos fotosíntesis y la clorofila-a. Se asume que los cloroplastos de los grupos eucariotas derivan de las cianobacterias, como el resultado del establecimiento de relaciones simbióticas en el pasado (Teoría endosimbiótica de Lynn Margulis). Podemos encontrar representantes en ecosistemas terrestres pero la mayoría pueden encontrarse en ecosistemas acuáticos y marinos. Bajo ciertas condiciones ambientales, algunas cianobacterias tienen la capacidad de originar "floraciones algales", proliferaciones masivas protagonizadas por una o pocas especies que dominan el fitoplancton. En algunas ocasiones estas floraciones son acompañadas por la síntesis y liberación de compuestos tóxicos (cianotoxinas), también compuestos volátiles que alteran las características organolépticas del agua, todos estos metabolitos secundarios representan un serio riesgo para el hombre y para toda la biota asociada a los cuerpos de agua afectadas. Algunas son consideradas beneficiosas por sus diversas aplicaciones

biotecnológicas, son fuentes de sustancias de uso industrial y farmacológico de gran valor económico (Aguilera, 2020).

Afortunadamente, los avances tecnológicos ofrecen la oportunidad de generar datos de biodiversidad de alta calidad de manera coherente, automatizando cada vez más las canalizaciones de procesamiento, y radicalmente ampliar el alcance del monitoreo de los ecosistemas (Bush *et al.*, 2017). El ADN ambiental (*environment DNA* o *eDNA*), es una técnica que permite analizar muestras de diferentes sustratos del ambiente para detectar especies o evaluar su diversidad total (Reyes, 2018). El método de recolección de *eDNA* más común en los sistemas acuáticos es filtrar activamente el agua a través de una membrana (Bessey, 2021), porque se produce ADN de alta pureza (Li *et al.*, 2015). El primer reporte de uso de ADN ambiental aplicado a ecosistemas acuáticos se utilizó para analizar la presencia de la rana toro americana *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) en humedales y ambientes controlados. Posteriormente se han realizado investigaciones en más grupos de organismos incluyendo peces, peces invertebrados, reptiles, parásitos, mamíferos, plantas, hongos, entre otros. Para realizar el muestreo de aguas, usualmente se sumergen tubos de centrifugas ligeramente por debajo de la superficie o la profundidad que se desee hasta completar alrededor de 15 ml (Reyes, 2018).

Las técnicas de *eDNA* se encuentran estrechamente relacionadas con las metodologías para la identificación de especies mediante marcadores moleculares. Estas últimas pueden clasificarse en función de si se identifica una o varias especies simultáneamente (*barcoding* o *metacording*, respectivamente) y el marcador molecular a utilizar dependerá del nivel taxonómico al que se quiera llegar en la identificación (Huerta, 2020).

Un resultado común de la investigación sobre *metabarcoding* son las tablas de variantes de secuencias de amplicones, llamadas ASV (Callahan et al., 2017). El uso de ASVs permite distinguir la variación de secuencia de al menos un solo cambio de nucleótido, lo que los hace especialmente útiles en la clasificación de grupos de especies, en la búsqueda de variaciones biológicas o ambientales y en la determinación de patrones ecológicos. (Rodríguez. 2022).

Pero en la filtración activa a través de membrana se lleva mucho tiempo y presenta algunas complicaciones como:

- La obstrucción de los filtros, debido a las aguas turbias, lo que reduce el ADN capturado.
- La necesidad de mantener las muestras frías hasta que se filtren para que el ADN no se degrade durante su transporte y almacenamiento.
- Los estudios ecológicos que investigan la abundancia o distribución de especies a menudo requieren más muestras de ADN extracelular que las recolectadas con los métodos de filtración actuales.

En los últimos años se han propuestos nuevos métodos para recoger el ADN de forma pasiva, como el de filtros fijos para recoger ADN (Bessey, 2021). En este proyecto se contrastará la eficacia del método tradicional contra el método de filtro fijo (Método pasivo) en ecosistemas de agua dulce, donde cada río posee diferentes características fisicoquímicas, para poder probar ambos métodos bajo diferentes condiciones, y como influyen estas a la hora de la recolección del *eDNA*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar la eficacia de dos métodos de filtración para documentar la diversidad genética de cianobacterias en ríos de Bahía Almirante, utilizando el marcador 16s rRNA.

Objetivos específicos

1. Identificar la diversidad y comunidades de cianobacterias capturadas por cada método.
2. Contrastar la diferencia de diversidad y comunidades en cianobacterias capturadas entre ríos y lagos.
3. Determinar si las condiciones físicas de los ríos influyen en los diferentes métodos de recolección.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Clasificación de las aguas de un río

Los ríos se pueden dividir en tres partes principales: (1) flujos superiores en áreas montañosas, (2) flujos medios con erosión y deposición de sedimentos, y (3) tramos inferiores en áreas más planas que forman meandros y sedimentos. Los ríos se pueden clasificar según su patrón de caudal y el tipo de agua que contienen: agua potable, agua dulce, agua salada, agua salobre, agua dura, agua blanda, agua destilada y aguas residuales, cada uno con características y usos específicos (*PH and water* | U.S. Geological Survey, 2019). Para actividades como el riego agrícola, puede resultar más útil clasificar por industria, considerando el porcentaje de sodio y la conductividad eléctrica. Por último, es importante recordar que la clasificación de las aguas de los ríos no es precisa, pero gestionar y comprender las propiedades de las aguas es útil. Por lo que el agua de los ríos se puede clasificar según su contenido ácido y alcalino de la siguiente manera: ácida, básica o neutra según el contenido de iones de hidrógeno (H^+) e iones de hidróxido (OH^-). El pH afecta la solubilidad y biodisponibilidad de sustancias químicas como nutrientes y metales pesados. (Flowers, 2022; Indicadores De Calidad Del Agua: Variables Convencionales - Programa Regional De Monitoreo De Los Acuáticos (RAMP), n.d.):

- **Aguas Ácidas:** Son aguas con un pH inferior a 7, lo que indica acidez. El rango de acidez va de 0 a 14, siendo 7 neutro. Un pH inferior a 7 indica la presencia de iones de hidrógeno (H^+), lo que da como resultado una condición más ácida. El término "ácido" suele reservarse para sistemas de agua dulce con una alcalinidad inferior a cero. Los ácidos se diluyen bien con los alcalinos y forman precipitaciones con los metales.

- **Aguas Básicas:** Son aguas con un pH mayor a 7, lo que indica basicidad. El rango de pH va de 0 a 14, siendo 7 neutro. Un pH superior a 7 indica la presencia de iones hidroxilo (OH⁻), lo que resulta en una condición más básica.

Para identificar si un agua es ácida, básica o neutra, se pueden utilizar kits de análisis de agua en casa o en laboratorios (Flowers, 2022). La clasificación de las aguas es crucial para comprender sus usos y posibles impactos en el medio ambiente y la salud humana. Las aguas clasificadas como 'ácidas' pueden usarse para algunos procesos industriales, mientras que las clasificadas como 'básicas' pueden tener diferentes usos, como para beber o procesar alimentos (*Classifications* | NC DEQ, s. f.).

Es importante controlar periódicamente la calidad del agua, especialmente si está clasificada como "ácida". Esto se debe a que un cambio en los factores ambientales o las actividades humanas pueden afectar el nivel de pH. La mayoría de los organismos acuáticos y algunos procesos bacterianos requieren que el pH esté en un rango específico. Por ejemplo, la actividad de las bacterias nitrificantes es óptima en un rango estrecho de pH de 7 a 8. Si el pH cambia por encima o por debajo del rango preferido de un organismo (incluidos los microbios), los procesos fisiológicos pueden verse afectados negativamente. La mayoría de los organismos pueden sobrevivir y desarrollarse si los niveles del pH del agua se mantienen entre 6,5 a 8.5. Si el pH cambia puede llegar a ocurrir daño físico, por ejemplo, en los peces, las branquias, la piel y los ojos, pueden verse afectadas, cuando el pH es subóptimo para ellos, y el daño a la piel aumenta la susceptibilidad a los hongos e infecciones como la enfermedad de las manchas rojas. El pH se lleva con mayor frecuencia a extremos mayores en condiciones eutróficas, lo que permite que las especies de algas con

tolerancia a niveles extremos de pH crezcan y dominen las comunidades, y potencialmente formen floraciones de algas. Los cambios de pH también pueden tener impactos indirectos en los organismos acuáticos. Por ejemplo, los cambios de pH pueden alterar la disponibilidad biológica de los metales, la especiación de los nutrientes y las toxicidades del amonio, el aluminio y el cianuro. Los aumentos del pH también pueden hacer que se superen las fuerzas electrostáticas que unen los virus a las partículas, facilitando así su liberación a la columna de agua. El pH es importante en la solubilidad del carbonato de calcio (calcita o aragonita), que es importante para los organismos que forman conchas. El crecimiento de la cáscara (es decir, la calcificación) se inhibe si el agua se vuelve demasiado ácida (Holopainen & Lehtikoinen, 2022; OzCoasts, 2018, Folleto Informativo PH ¿Qué Es El PH?, n.d.).

Las crecientes presiones antropogénicas han afectado el estado de los ecosistemas de agua dulce superficiales, incluidos efectos tanto a gran escala (lluvia ácida, cambio climático) como locales (silvicultura, zanjas, eutrofización, pardeamiento del agua, especies invasoras, contaminación). Por ejemplo, la eutrofización medida como un aumento en el fósforo total aumenta la proliferación de algas nocivas y reduce el valor nutricional del fitoplancton, lo que puede tener impactos en el valor nutricional del zooplancton, los peces y, además, otros animales acuáticos en niveles más altos de la red alimentaria (Holopainen & Lehtikoinen, 2022).

2.2.Muestreo de eDNA en ecosistemas de agua dulce

La metodología *eDNA* (ADN ambiental) es una poderosa herramienta para estudiar y conservar recursos en ecosistemas subacuáticos, como cuevas sumergidas o manantiales llenos de agua. La muestra de *eDNA* en ecosistemas de agua dulce se ha convertido en una

herramienta de monitoreo biológico de rápido crecimiento en los últimos años, especialmente en entornos acuáticos. El *eDNA* se extrae de cuerpos de agua y se utiliza para identificar la biodiversidad acuática, incluidos organismos como peces e insectos. Este método ofrece eficiencia en tiempo y sensibilidad, lo que lo hace ideal para evaluar la biodiversidad de forma no invasiva y eficiente. Sin embargo, sigue siendo un desafío interpretar los datos espaciales de *eDNA*, lo que ha llevado al desarrollo de marcos de modelado, como *eDITH*, para analizar los datos de *eDNA* de una cuenca fluvial y derivar patrones espaciales de riqueza de taxones acuáticos. Este enfoque también busca mejorar los métodos de muestreo y extracción de *eDNA*, la especificidad de los cebadores y las bases de datos de referencia para capturar taxones ecológicamente importantes en futuros estudios de biomonitoreo de *eDNA* (Takahashi *et al.*, 2023; Carraro *et al.*, 2020).

2.3. Diversidad y Clasificación de las cianobacterias

Las cianobacterias son algas fototróficas procariontas oxigénicas que pertenecen a ocho órdenes, agrupados en las clases Eubacteria, Phylum Cyanobacteria y Cyanophyceae. La especie prospera en diferentes hábitats como ambientes terrestres como pantanos, lagos y ríos, y exhiben una alta diversidad fenotípica (Terreros *et al.*, 2017). Algunas especies conocidas pueden desarrollar floraciones en diferentes tipos de agua, incluyendo agua dulce, salobre o marina. Estas floraciones implican una compleja interacción de variables biológicas y espaciales, y cada vez se reportan más floraciones en todo el mundo. Los componentes clave de las floraciones, los mecanismos mediante los cuales los nutrientes y la temperatura interactúan para mejorar las floraciones, varían ampliamente entre los grupos de cianobacterias (Fournier *et al.*, 2021). A diferencia de otras bacterias, las cianobacterias no necesitan nutrientes orgánicos complejos para crecer, sólo nitrógeno y

luz solar. También tienen una variedad de marcas, incluida una variedad de estilos y colores (Alcántara *et al.*, 2020). Además, la temperatura óptima de crecimiento y la disponibilidad de nutrientes de las cianobacterias son específicas de cada especie, lo que dificulta sacar conclusiones de estudios de otras especies. De hecho, dominan diferentes especies de cianobacterias dependiendo de la proporción de nitrógeno a fósforo (Fournier *et al.*, 2021).

2.3.1. Ejemplo de cianobacterias

Microsistis: produce una serie de toxinas como microcistinas, pueden provocar enfermedades por ingestión o contacto (Susana & García, n.d.).

Spirulina: una cianobacteria unicelular que se utiliza como suplemento alimenticio y tiene propiedades antioxidantes (Microscopio.Pro, 2023).

Nostoc: una cianobacteria colonial que se encuentra en suelos húmedos y es capaz de fijar nitrógeno atmosférico (Microscopio.Pro, 2023).

Anabaena: una cianobacteria colonial que se encuentra en agua dulce y es capaz de fijar nitrógeno atmosférico. También es conocida por producir toxinas, como la anabasina (Susana & García, n.d.; Microscopio.Pro, 2023).

Gloeocapsa: una cianobacteria unicelular que se encuentra en las rocas y los suelos y puede formar colonias mucilaginosas (Microscopio.Pro, 2023).

Prochlorococcus: una cianobacteria unicelular que se encuentra en los océanos y es responsable de una gran parte de la producción de oxígeno en el mundo (Microscopio.Pro, 2023).

2.4.Importancia de microorganismos en agua dulce

Los microorganismos en agua dulce son de gran importancia debido a su papel fundamental en los ecosistemas acuáticos. Estos organismos incluyen bacterias, algas y protozoos, y desempeñan diversas funciones vitales.

1. Descomposición de materia orgánica: Las bacterias de agua dulce tienen un papel importante en la descomposición de la materia orgánica producida por los autótrofos en los sistemas acuáticos, tanto terrestres como acuáticos (Cotner *et al.*, 2010). Estas bacterias descomponen los restos de plantas y animales muertos, liberando nutrientes esenciales de nuevo al agua.
2. Productores primarios: Las algas de agua dulce, como las cianobacterias, son organismos fotosintéticos que realizan la fotosíntesis y son responsables de la producción de oxígeno y la fijación de carbono en los ecosistemas acuáticos (BeCloud.com, n.d.). Estas algas son la base de la cadena alimentaria acuática y proporcionan alimento para otros organismos acuáticos.
3. Control de la calidad del agua: Los microorganismos en agua dulce también desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la calidad del agua. Algunas bacterias son capaces de degradar contaminantes y sustancias tóxicas, ayudando a purificar el agua (Cotner *et al.*, 2010). Además, ciertas algas de agua dulce pueden absorber nutrientes en exceso, como nitratos y fosfatos, reduciendo así la eutrofización (Sand-Jensen, 2001).
4. Ciclos biogeoquímicos: Los microorganismos en agua dulce participan en los ciclos biogeoquímicos, como el ciclo del nitrógeno y el ciclo del carbono. Estos ciclos son

cruciales para el equilibrio de los ecosistemas acuáticos y el mantenimiento de la vida en el agua (Cotner *et al.*, 2010, Sand-Jensen, 2001).

2.4.1.Importancia de las cianobacterias en ecosistemas de agua dulce

Las cianobacterias son de gran importancia en los ecosistemas de agua dulce debido a su papel en los ciclos biogeoquímicos y en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas acuáticos. Estas bacterias son capaces de llevar a cabo la fotosíntesis, convirtiéndose en productores primarios en la cadena alimentaria (Martínez, 2023). Al ser los principales productores de oxígeno en los cuerpos de agua dulce, las cianobacterias desempeñan un papel crucial en la producción de oxígeno y en la regulación del equilibrio de gases en el agua. Además, las cianobacterias también son importantes en la fijación de nitrógeno atmosférico, convirtiéndolo en formas utilizables por otros organismos (Martínez, 2023). Sin embargo, también es importante tener en cuenta que algunas cianobacterias pueden producir toxinas que pueden enfermar a las personas y los animales (Enfermedad Y Síntomas: Cianobacterias En Agua Dulce | La Proliferación De Algas Nocivas | CDC, n.d.).

2.5.Humedal San San Pond Sak

Gran Humedal San San Pond Sak es un gran humedal y estanque ubicado en la provincia de Bocas del Toro en Panamá. Este sitio ha sido reconocido por organizaciones internacionales, incluida su lista de sitios de importancia internacional según la Convención de Ramsar. La región está gestionada por la organización regional AAMVECONA (The Excellent Humedal San San Pond Sak Wetlands and AAMVECONA - Review of Aamvecona, Changuinola, Panama - Tripadvisor, n.d.).

El humedal San San Pond Sak tiene una superficie de 16.125 hectáreas (The Excellent Humedal San San Pond Sak Wetlands and AAMVECONA - Review of Aamvecona,

Changuinola, Panama - Tripadvisor, n.d.). Esta zona es hogar de una gran variedad de animales. Aquí podrás ver loros, halcones, garzas, manatíes antillanos, monos, lagartos, iguanas, monos, tortugas marinas y serpientes. La región también es hogar de los indígenas bocatorianos y chiricanos. Hay muchas actividades que puede disfrutar en la zona, incluida la observación de aves y la observación de la vida silvestre. Se puede llegar a la zona en barco desde Changuinola, famosa por su agua dulce y una de las colonias de manatíes más grandes de Centroamérica (The Excellent Humedal San San Pond Sak Wetlands and AAMVECONA - Review of Aamvecona, Changuinola, Panama - Tripadvisor, n.d.).

Las características clave del humedal San San Pond Sak incluyen:

1. Biodiversidad : El área alberga una amplia gama de vida silvestre. Es uno de los pocos hábitats centroamericanos conocidos para el manatí, y también está habitado por perezosos, nutrias de río, monos cara blanca, caimanes y varias especies de aves (The Excellent Humedal San San Pond Sak Wetlands and AAMVECONA - Review of Aamvecona, Changuinola, Panama - Tripadvisor, n.d.).

Otros mamíferos que se encuentran aquí incluyen el manatí de las Indias

Occidentales, los perezosos y las tortugas marinas (Humedal De San San Pond Sak | Bocas Del Toro Province, Panama | Attractions - Lonely Planet, n.d.).

2. Importancia cultural : El área es utilizada por pueblos indígenas, incluidas las comunidades bocatorianas y chiricanas. También forma parte del archipiélago de Bocas del Toro, que incluye 130 islas (The Excellent Humedal San San Pond Sak

Wetlands and AAMVECONA - Review of Aamvecona, Changuinola, Panama -
Tripadvisor, n.d.).

3. Importancia histórica : El establecimiento del parque marino en 1988 marcó el compromiso de Panamá con la preservación del medio ambiente (The Excellent Humedal San San Pond Sak Wetlands and AAMVECONA - Review of Aamvecona, Changuinola, Panama- Tripadvisor, n.d.).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sitio de muestreo

El muestreo se realizó en cuatro ríos que desembocan en la Bahía de Almirante o cerca de esta, por lo que contribuyen al caudal de la bahía, la cual es estacionalmente hipóxica (Figuerola et al., 2021). La Bahía de Almirante está ubicada en la provincia de Bocas del Toro, Panamá. Adicional se tomaron como sitios de muestreo dos lagos: Gatún (Muelle de STRI, Panamá) y Big Creek (Toma de agua del IDAAN, Bocas del Toro) (Figura 1). Se tomaron muestras en dos ocasiones en cada uno de los puntos de muestreo escogidos.



Figura 1. Mapa de los sitios de muestreo.

Los ríos utilizados para el muestreo han sido clasificados en estudios previos (Clark, 2022), en base a las diferencias geomorfológicas y de vegetación como:

- a) **Ríos pantanosos** de aguas ácidas, también denominados ríos negros, caracterizados por una alta acidez debido a los compuestos orgánicos, que le dan el color oscuro.

1. Río Negro

Ubicado en el distrito de Changuinola, en la provincia de Bocas del Toro (coordenada: 9.36103913.-82.399679 UTM). Se le denomina “Río Negro” por el color oscuro de sus aguas, está ubicado al oeste de la llanura aluvial del Río Changuinola, es parte del humedal San Pond Sak y desemboca en la Bahía Almirante. En condiciones normales la velocidad del río es lenta, y por lo general, siguió un flujo y reflujo de las mareas (Clark, 2022).

2. *Canal de Changuinola*

Ubicado en el distrito de Changuinola en la provincia de Bocas del Toro (coordenadas: 9.432370, -82.404910 UTM). El Canal de Changuinola es una zanja paralela a la costa en la región exterior del humedal San San Pond Sak. La Cuenca del Canal tiene como vegetación dominante, la vegetación palustre con palma de Rafia y un bosque mixto inundable.



Figura 2. Ríos de aguas ácidas.

b) Ríos montañosos de aguas básicas.

3. Río Nigua

Ubicado en el distrito de Almirante en la provincia de Bocas del Toro (coordenadas: 9.20531, -82.36469 UTM). La cuenca es de 13,4 km² y una elevación media de 128 msnm. Se cuenta con una planta de tratamiento de agua potable con una capacidad de procesamiento de 7.000 m³ D-1 (Clark, 2022).

4. Río Pastores

Localizado en el distrito de Almirante en la provincia de Bocas del Toro (coordenadas: 9.28978, -82.41661 UTM) Con un área de contribución de 6,3 km². El suelo de la cuenca del Río Pastores está dominado por bosque secundario, y matorral (Clark, 2022).

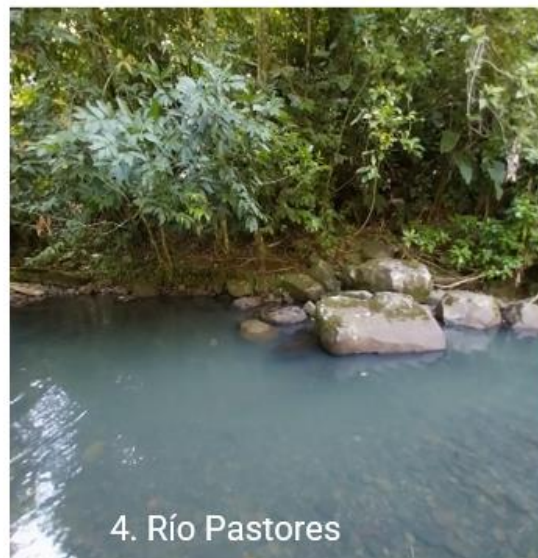
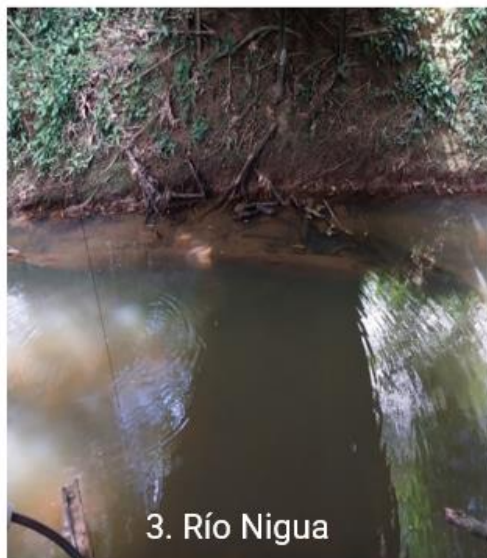


Figura 3. Ríos de aguas básicas.

c) **Lagos**

5. *Muelle de STRI*

Ubicado en el corregimiento de Gamboa en la provincia de Panamá (coordenadas: 9.1184420, -79.7150650 UTM). Forma parte de la cuenca del Canal de Panamá,

6. *Lago Big Creek*

Localizado en la Isla Bocas del Toro en la provincia de Bocas del Toro (coordenadas: 9.3650000, -82,2483333 UTM). Es el reservorio de la toma de agua del IDAAN.



Figura 4. Lagos escogidos.

Cuadro 1. Información adicional de los puntos de muestreo (Clark, 2022; De La Cruz-Cabrera et al., 2020, Recursos Naturales Y Biodiversidad Del Área Recreativa De Gatún, Colón, 2007, septiembre 2008, n.d.).

| Punto | Provincia | pH | T (°C) | Aporte mínimo | Elevación media (msnm) | Vegetación |
|--------------|------------------|-----------|---------------|----------------------|-------------------------------|---|
| Río Negro | Bocas del Toro | 6.04 | 25.4 | | 2,5 km | En su mayoría pantanos de palma rafia y bosques mixtos inundados. |

| | | | | | | |
|----------------------|----------------|------|-------|----------------------|-------------------------|--|
| | | | | ~46 km ² | | |
| Canal de Changuinola | Bocas del Toro | 6.27 | 25.6 | 21,8 km ² | Cerca del nivel del mar | Dominada por vegetación pantanosa, con palma rafia y bosque mixto inundable |
| Río Nigua | Bocas del Toro | 7.15 | 25.2 | 13,4 km ² | 128 m | Bosque secundario, con algunos matorrales/arbustos y pastos. |
| Río Pastores | Bocas del Toro | 7.30 | 24.3 | 6,3 km ² | 248 m | Bosques secundarios y matorrales/arbustos. |
| Gatún | Panamá | 7.88 | 25.00 | ---- | 26.00 m | Consiste principalmente de bosque perennifolio de tierras bajas con sectores con fincas. |
| Big Creek | Bocas del Toro | * | * | --- | * | * |

*No se encontró información disponible en la web para el Lago Big Creek.

3.2. Estandarización del proyecto

Antes de realizar los muestreos en los sitios escogidos se realizaron ensayos para determinar el tiempo de exposición en el agua de los filtros y escoger el primer o cebador y Taq polimerasa.

3.2.1. Tiempo de exposición de los filtros al agua

Se realizó un ensayo en los acuarios de NAOS (Figura 5), con el objetivo de determinar la cantidad de tiempo que debían pasar los filtros de bajo de la superficie del agua, para recolectar la cantidad de ADN suficiente. Se colocaron filtros de mezcla de éster y celulosa con un poro de 0.8 µm (Millipore), en acuarios de 25 gal de agua dulce proveniente del IDAAN, que se dejó reposar por 2 días, para luego ser colocada en las peceras. Se evaluaron 5 diferentes tiempos de exposición: colocando los filtros debajo del agua y sacando cada uno de estos a 2, 4, 6, 12 y 24 horas, Colocando los filtros como se muestra en la Figura 6.



Figura 5. Filtración pasiva en peceras de agua dulce, acuarios de NAOS.

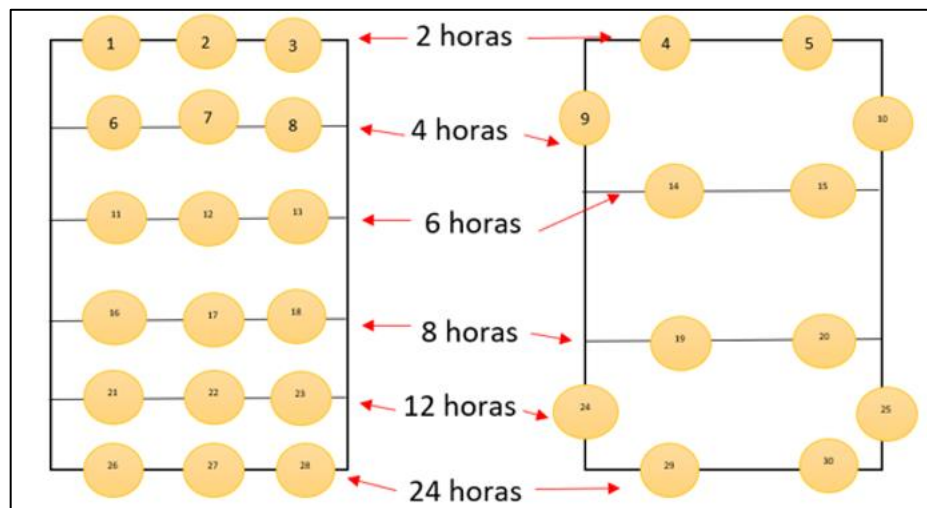


Figura 6. Ensayo de distintas horas de exposición al agua de filtros pasivos.

Se realizó la extracción de ADN con el kit DNeasy PowerSoil de Qiagen, donde se utilizaron 800 μ l del sobrenadante y por lo tanto se usó 1000 μ l del C4, se cuantificó el ADN en el espectrofotómetro Nanodrop One de THERMO SCIENTIFIC.

3.2.2. Selección del Primer

Se utilizaron tres juegos de primers o cebadores específicos para cianobacterias (PC β F

y PC α R, 1328 F y 1664 R, Pla 491 F y PP936 R) y un juego de primer para 16s para bacterias en general (515F y 806 R) (Cuadro 2). Se tomaron dos extracciones para filtraciones activas y dos extracciones para filtraciones pasivas, para probar los primers específicos para cianobacterias mediante una prueba PCR y se observaron los resultados en el gel de agarosa, para poder escoger uno. Luego se hizo una secuenciación prueba con varias muestras y verificar el primer seleccionado y el primer 16s para la comunidad bacteriana en general.

Cuadro 2. Primers utilizados durante la estandarización del proyecto.

| Set de Primer | Secuencia | Temperatura de anillamiento |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|
| PC β F | GGCTGCTTGTTTACGCGACA | 54 °C |
| PC α R | CCAGTACCACCAGCAACTAA | |
| 1328 F | GCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGG | 55 ° |
| 1664 R | GTCTCTCTAGAGTGCCCAACTTAATG | |
| Pla 491 F | GAGGAATAAGCATCGGCTAA | 62 °C |
| PP936 R | CCTTTGAGTTTCAYYCTTGC | |
| 515F | GTGCCAGCMGCCGCGGTAA | 50 °C |
| 806 R | GGACTACHVGGGTWTCTAAT | |

3.2.3. Selección de la Taq Polimerasa

Para esta se hizo pruebas con el mix 2x Platinum y 2x PCR Buffer + KAPA 3G taq, utilizando diferentes cantidades de muestra, alterando la cantidad de H₂O y extracción de ADN, y las dos polimerasas diferentes.

3.2.4. Limpieza de los equipos

Tanto el equipo que se utilizó en el campo como en la filtración (botellas recolectoras, pinzas, marco, bolsas de mallas, cristales, mangueras) se enjuagó antes y después de ir a alguno de los sitios de muestreo. Todo se limpió con detergentealconox y en caso de ser necesario se utilizó un cepillo para botellas. Luego se enjuagó con agua desionizada (agua DI). Las botellas se remojaron toda la noche en una solución de hipoclorito de sodio (Clorox de uso comercial) al 10-30% (1 parte de hipoclorito de sodio / 4 Partes de agua DI) y las pinzas y cristalería durante un mínimo de 20 minutos, para al final lavar cuatro veces con agua DI. Los adaptadores de goma, que se utilizaron para ajustar la bomba de vacío solo se lavaron con agua DI.

Luego de lavar la cristalería y botellas se envolvieron en papel aluminio para colocarlo en la autoclave 20 minutos a 120 °C, para luego dejar enfriar y poder utilizarlo.

3.2.5. Preparación de Blancos

Los blancos consistían en botellas con agua DI esterilizada, una vez las botellas se encontraban limpias y esterilizadas, a estas se llenaban con agua DI hasta 1/3 de su capacidad total, con la tapa de la botella ajustada (no cerrada) una vez se encontraba a temperatura ambiente el agua, la tapa se cerraba y solo era abierta en el sitio de muestreo, se colocaban cerca del sitio escogido mientras se recogían las muestras, con cuidado de

que no estorbaran a la hora de realizar el muestreo, y evitando que se derramen o algún otro accidente.

3.3.Recolección de muestras

3.3.1.Recolección activa de eDNA

Se recolectaron un total de 6 envases de un litro de agua cada una, por cada sitio de muestreo, las cuales se filtraron en el laboratorio. Las muestras se tomaron a un metro de la superficie, aproximadamente, utilizando una botella Van Dorn.

Las botellas se guardaron en un cooler con hielo, para que se mantuvieran frías durante su transporte hasta el laboratorio. Se utilizó un control, que solo se abrió en el sitio de recolecta, con el fin de detectar los posibles contaminantes. Una vez en el laboratorio se utilizó una bomba al vacío para conseguir las muestras de ADN, se utilizaron dos filtros de mezcla de éster y celulosa Millipore SAS, uno de 0.8 μm y otro de 0.2 μm , colocando el del poro más grande encima para recolectar los posibles contaminantes. Luego se colocaron los filtros en frascos de 5ml, con ayuda de pinzas, estas se flamearon con etanol y un encendedor, evitando tocar la película que se encuentra sobre el filtro, a la hora de doblar los filtros. Una vez cerrados los frascos, se colocó papel de parafina (Parafilm) alrededor de la tapa para sellarlo y evitar que las muestras se sequen al congelarlas. Las muestras se guardaron a -20°C hasta que se realizó extracción.



Figura 7. Filtración activa de muestras recolectadas en el muelle de STRI, Gamboa.

3.3.2. Recolección pasiva de eDNA

En un marco se colocaron 6 filtros, que se dejaron por 24 horas en cada sitio de muestreo. Se utilizaron filtros de mezcla de éster y celulosa de 0.8 μm (Millipore SAS). El marco se colocó a un metro de la superficie del agua, aproximadamente, de manera horizontal. Los filtros se manipularon con pinzas, que se flamearon con etanol en la llama directa de un encendedor, y se guardaron en tubos plásticos estériles para centrifuga de 5 ml (Eppendorf) con sus respectivas etiquetas, las cuales siguieron una codificación letras (JD) número. Se transportaron en un cooler con packs congelados hasta el laboratorio, se sellaron con papel parafina, para luego ser almacenados a -20°C , para su posterior extracción.

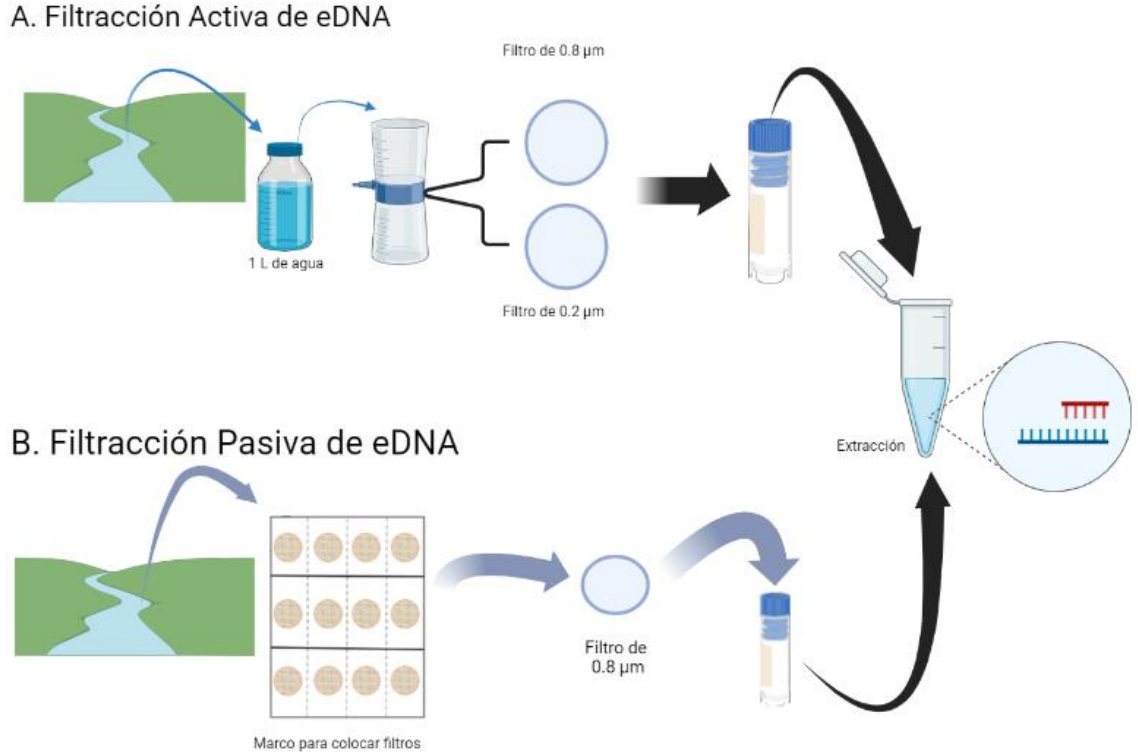


Figura 8. Recolección activa (A) y pasiva (B) de eDNA, una vez obtenidos los filtros en cada tratamiento se procede con la extracción de ADN (Creado con Biorender.com).

3.3.3. Toma de datos fisicoquímicos

Se tomaron datos fisicoquímicos antes de recolectar las muestras de agua: pH, Temperatura (°C), Conductividad (m3/cm), Sólidos Disueltos Totales (mg/L), Salinidad, Oxígeno Disuelto (mg/L) y Conductividad específica (m3/cm), de cada uno de los sitios de muestreo con un medidor de calidad de agua YSI (YSI Incorporated, 2009). Se utilizó el disco Secchi para medir la turbidez, y se anotó el color del agua. Todo esto se agregó a la tabla, donde también se encontraba las coordenadas y observaciones visuales como condición meteorológica, si había vegetación acuática cercana, coordenadas y horas de las filtraciones.



Figura 9. Colocación de los filtros para la filtración pasiva en el Muelle de STRI, Lago Gatún.

3.3.Extracción de ADN

3.3.1.Corte de filtros

Los filtros se cortaron en la cámara de flujo laminar con ayuda de tijeras y, en caso de que fuera necesario, se utilizaba una pinza para sujetar los filtros. Tanto las tijeras como las pinzas se esterilizaron sumergiéndolas en etanol (95%) y usando un mechero para quemar el etanol. Se realizaron los cortes en una lámina de papel aluminio, previamente autoclavada para recoger los pedazos. Mientras se cortaban los filtros se dejaban en hielo las muestras que no se estuvieran utilizando. Y una vez cortados se dejaban en la nevera a -4°C , mientras se preparaban los materiales de la extracción.

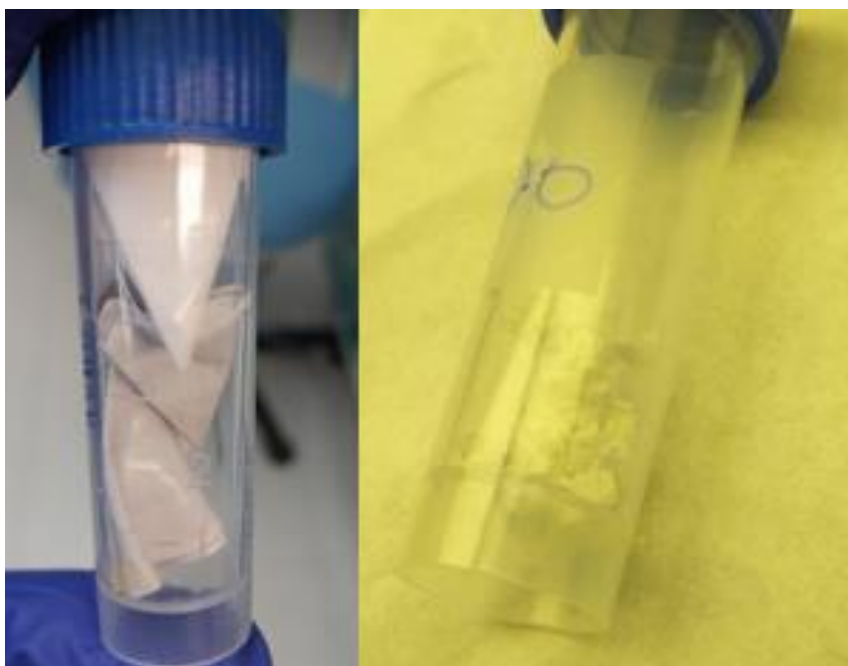


Figura 10. Filtros cortados.

3.3.2. Extracción de eDNA

El ADN total se extrajo de los filtros utilizando DNeasy PowerSoil Kit de QIAGEN (Qiagen; Venlo, Países Bajos).

Para la extracción se utilizó el protocolo del kit modificado para realizar extracción en muestras de agua por filtración, utilizando 90 μ l extras de H₂O libre de nucleasas. Esto se realizó en el mesón, el cual se limpió con la solución de hipoclorito de sodio al 10% y se secó con ayuda del alcohol al 70%. El ADN resultante se eluyó en 70 μ l de buffer C6.

3.3.3. Cuantificación de ADN

Se cuantificó 1 μ l de la muestra de ADN en el espectrofotómetro de NanoDrop One (ThermoFisher) para saber la cantidad de ADN presente en cada muestra, se hacen dos lecturas de cada una de las muestras, los datos obtenidos se anotaron en una tabla y se promediaron. Luego las muestras se guardaron a -20°C para su posterior amplificación.

3.4. Metabarcode del eDNA

3.4.1. PCR1

Se realizó en la campana de bioseguridad para PCR. Se descongelaron las muestras y reactivos en la nevera a -4°C durante aproximadamente una hora. Una vez la campana se esterilizó, las muestras y reactivos se mantuvieron en fríos con ayuda de hielo. Y se prepara el Mix, que contiene un conjunto de cebadores de 16s de ARN ribosómico la comunidad entera de bacterias.

| | Reactivos | Volumen | RX |
|----------------------------------|---------------|-----------------|----|
| Muestras de filtración Activa | H2O | 3.52 | |
| | 2X PCR Buffer | 5 | |
| | 515 F Primer | 0.2 | |
| | 806 R Primer | 0.2 | |
| | KAPA 3G Taq | 0.08 | |
| | Volumen Total | 9 μl | |

| | Reactivos | Volumen | RX |
|----------------------------------|---------------|-----------------|----|
| Muestras de filtración Pasiva | H2O | 2.52 | |
| | 2X PCR Buffer | 5 | |
| | 515 F Primer | 0.2 | |
| | 806 R Primer | 0.2 | |
| | KAPA 3G Taq | 0.08 | |
| | Volumen Total | 8 μl | |

Se colocó 9 µl de mix en cada uno de los tubos de PCR y 1 µl de ADN (para las muestras de las filtraciones activas) o 2 µl de ADN (para las muestras de filtración pasivas) para cada muestra haciendo un total de 10 µl de reacción para la PCR. Esto se llevaba al termociclador y se colocó a 35 ciclos en la siguiente configuración:

| | | |
|---|-----------------|--------|
| 1 | 95°C | 3 min |
| 2 | 95°C | 45 seg |
| 3 | 50°C | 45 seg |
| 4 | 72°C | 45seg |
| 5 | Paso 2 34 veces | |
| 6 | 72°C | 5 min |
| 7 | 15°C | ∞ |

Se utilizaron controles positivos y negativos en cada reacción. Obtenido el producto de la PCR se corre 2 µl del resultado de la PCR, en el gel de agarosa al 1% (porcentaje del gel) teñido con GelRed.

Se realizaron tres PCR1 por cada una de las muestras, esto es para obtener un mayor número de secuencias, una vez finalizados los triplicados se realizará la PCR2.

3.4.2.PCR2

Una vez obtenido los productos correctos de la PCR1 se realiza la PCR2 donde se agregaron los index y adaptadores de Illumina.

| Reactivos | Volumen | RX |
|-----------------------|---------|----|
| H2O | 2 | |
| Platinum Máster Mix | 5 | |
| F Primer | 1 | |
| R Primer | 1 | |
| DNA (producto de PCR) | 1 | |

Se colocaron en el termociclador por 6 ciclos con la siguiente configuración:

| | |
|------|----------|
| 94°C | 3 min |
| 94°C | 45 seg |
| 50°C | 1 min |
| 72°C | 1.30 min |
| 72°C | 10 In |

Se prepara el gel de agarosa y se corrió 1 µl de la PCR1 junto a 1 µl de la PCR2, para observar que la PCR2 funciono. Una vez todas las muestras estén listas se puede hacer la limpieza.

3.4.3.Bibliotecas

Se realizaron dos limpiezas. Primero, con el kit The Just-a-Plate™ 96 PCR Purification and Normalization (Charm Biotech), se dejaron las muestras incubando en el Binding Buffer (NB7) durante la noche a temperatura ambiente. Y la solución se decantó volteando rápidamente la placa y agitando enérgicamente. Luego se realizó un lavado con el buffer

de lavado (WB2), utilizando el mismo método para decantar, este wash se realizó dos veces. Al final se utilizó el buffer de elución (EB1).



Figura 11. Hit de limpieza y purificación The Just-a-Plate para 96 platos.

Se procedió a mezclar las muestras obteniendo un total de 1500 μ l, para realizar dos limpiezas con cuentas magnéticas (Ampure o KAPApure) con ETOH al 80% recién hecho. En la primera limpieza se obtuvieron 150 μ l y en la segunda 20 μ l de la biblioteca suspendido en buffer EB.

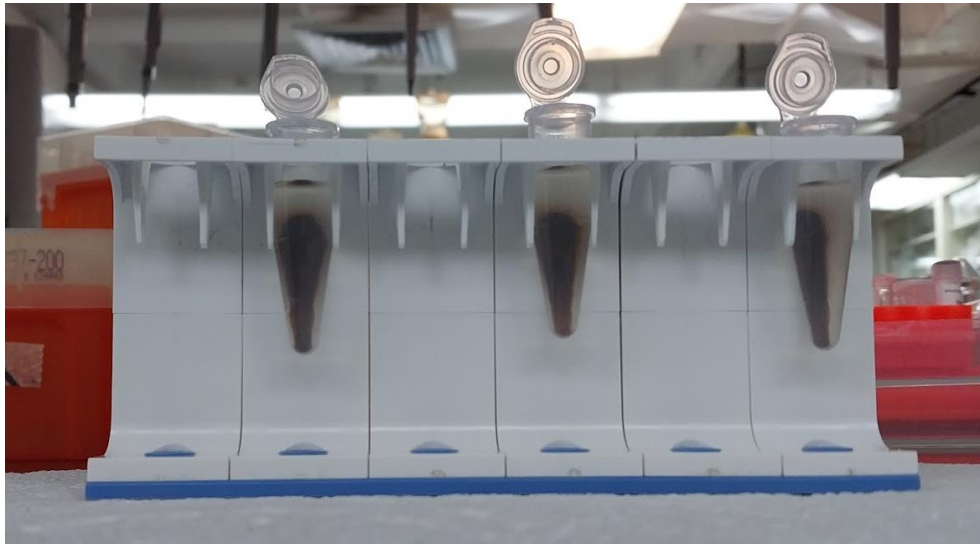


Figura 12. Limpieza y concentración de las bibliotecas con cuentas magnéticas.

Con el NanoDrop One se midió la concentración y una vez obtenida la biblioteca se procede a hacer una revisión en el BioAnalyzer, para comprobar la calidad de la biblioteca, si esta sale bien se procede a llevar la biblioteca a la plataforma MiSeq de Illumina.

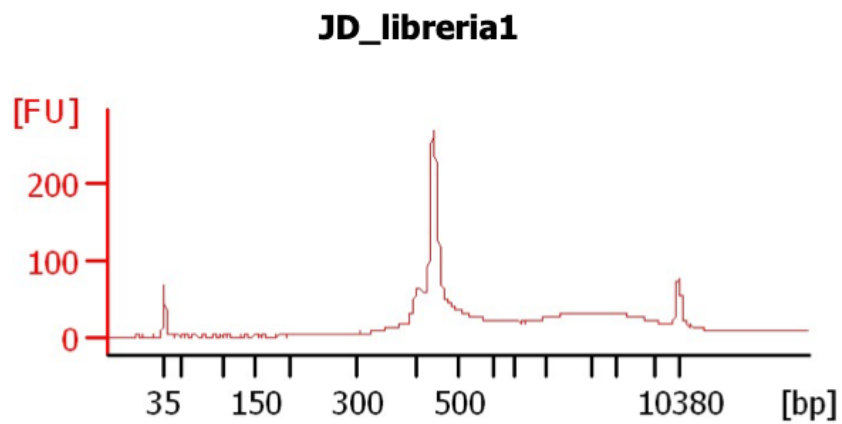


Figura 13. BioAnalyzer realizado a la biblioteca.

3.5. Bioinformática

Una vez obtenidas las secuencias, mediante extensiones de R y Bioconda se usó los programas Cutadapt (Martin, 2011) para encontrar y eliminar los adaptadores, los primers

y las N's producidas durante la lectura de Illumina. DADA2 (Callahan et al, 2016), donde se genera una tabla de variantes de secuencias de amplicon (ASVs) y compararlos con la base de datos de Silva v. 138.1 (Quast et al., 2013) , la cual contiene información taxonómica de bacterias y arqueas, basándose principalmente en filogenias de rRNA.

3.6. Análisis estadístico

Con ayuda de phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) se realizaron estadísticos de alfa y beta diversidad a los datos, para comprobar los taxones dentro de cada uno de los sitios y entre ellos. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos provienen de una distribución normal o no provienen de una distribución normal. Para alfa diversidad, si los datos provenían de una distribución normal ($p\text{-value} > 0.05$), se utilizó la prueba de ANOVA, y si los datos no provenían de una distribución normal ($p\text{-value} < 0.05$), se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Mientras que para Beta diversidad se hizo una prueba de Adonis y Anosim.

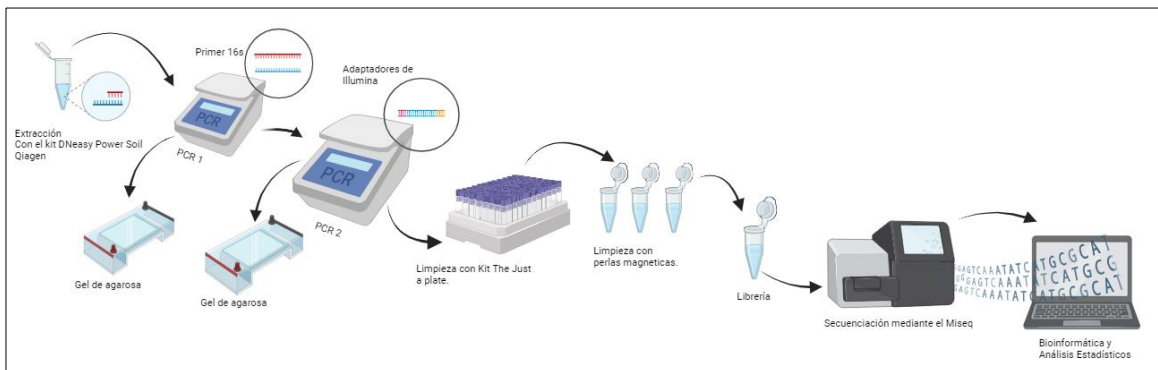


Figura 14. Flujograma del trabajo de laboratorio.

IV RESULTADOS

4.1.Estandarización del proyecto

4.1.1.Tiempo de exposición de los filtros al agua

Tabla 1. Promedio por hora de los resultados de la cuantificación de ADN con el NanoDrop.

| Horas | ng/ μ l | A260/A280 | A260/A230 |
|-------|-------------|-----------|-----------|
| 2 | 2.4 | 2.76 | 0.45 |
| 4 | 7.6 | 1.60 | 0.57 |
| 6 | 3.7 | 1.84 | 0.39 |
| 8 | 3.24 | 1.53 | 0.41 |
| 12 | 2.00 | 2.18 | 0.44 |
| 24 | 10.5 | 1.66 | 0.56 |

De los 5 grupos de horas se escogieron los dos tiempos de exposición más altos, es decir 12 y 24 horas, debido a que, a la hora de cuantificar la cantidad de ADN, estos salieron más uniformes.

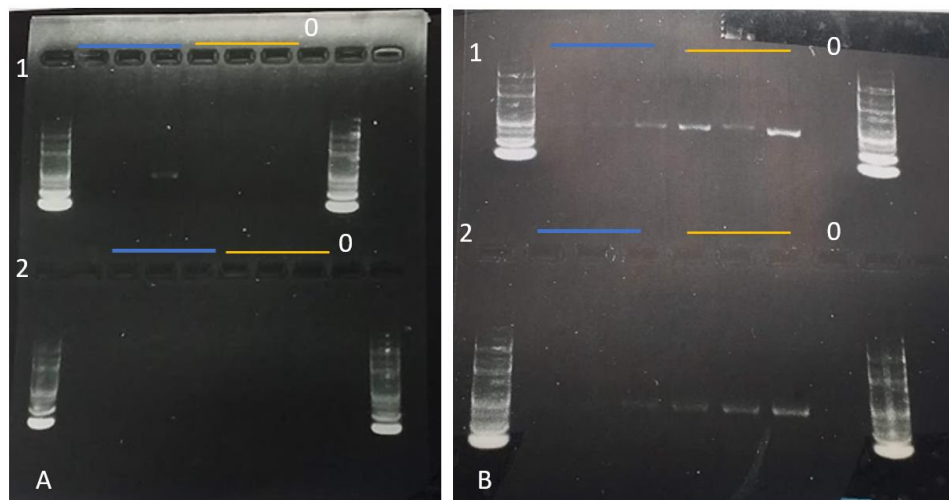


Figura 15. Resultados de las reacciones de PCR de 12 y 24 horas.

En la figura 15 se observan los resultados de las reacciones de PCR para 12 horas (línea azul) y 24 horas (línea amarilla), con (A) 1 μ l de muestra de ADN en la mezcla y (B) 3 μ l

de muestra de ADN en la mezcla. También se realizó la prueba con el primer escogido dirigido para cianobacteria (1) y el de 16s para la comunidad bacteriana en general (2). Podemos observar que las muestras de 3 µl de muestra para 24 horas se observaron de manera clara para 16s, por lo que se estableció que los filtros estarán expuestos bajo la superficie del agua un aproximado de 24 horas.

4.1.2. Selección del primer o cebador

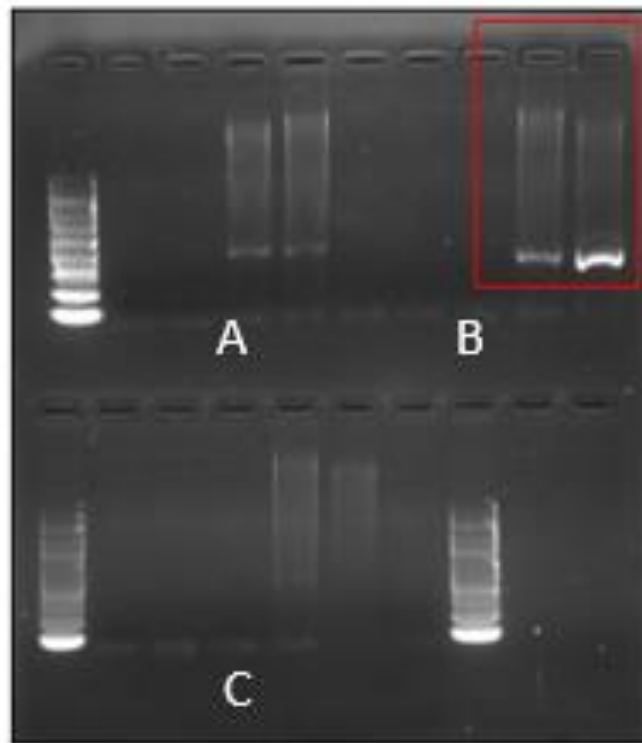


Figura 16. Resultado de prueba de PCR para los tres primeros específicos para cianobacterias.

En la figura 16 se muestra los resultados de la prueba de PCR para cada uno de los primers específicos para las cianobacterias: (A) PCβF y PCαR, (B) 1328F y 1664R, y, (C) Pla 491F y PP936R. Donde se puede observar que dos de los juegos de primers no corrieron en el gel de manera correcta (A y C), mientras que el juego de primer B corrió

correctamente y se observa con mucha claridad, por lo cual se seleccionó este primer como específico para cianobacteria. En la secuenciación prueba se decidió utilizar únicamente el cebador de 16s para comunidades bacterianas en general ya que proporciona más información , que el escogido como específico para cianobacterias.

4.1.3. Selección de la Taq polimerasa.

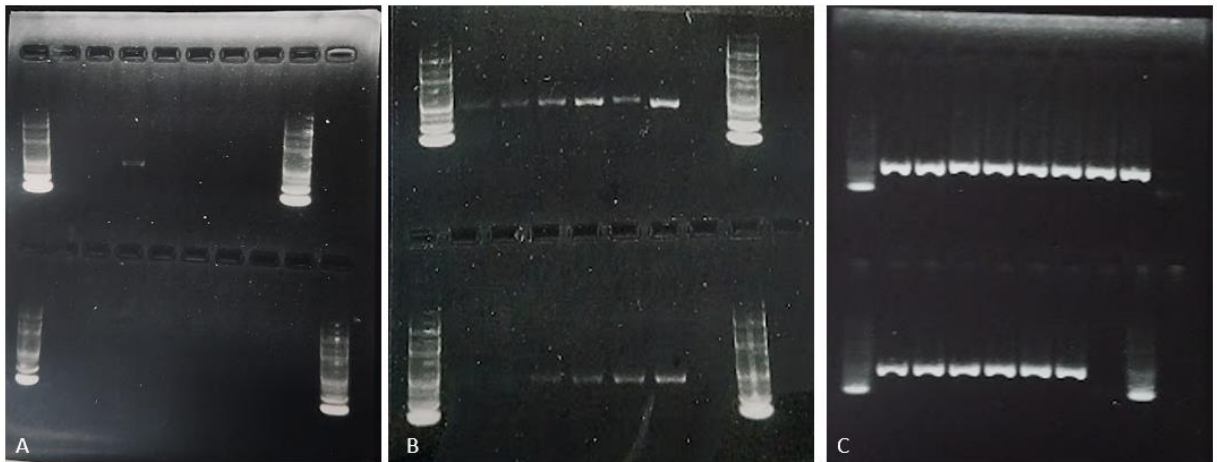


Figura 17. Resultados de diferentes pruebas de PCR.

En la figura 17 se observa los diferentes geles de resultados para pruebas de PCR de muestras tanto de filtración activa como filtración pasiva: (A) con 1 μ l de muestra de ADN en la mezcla con el máster mix 2 x Platinum, (B) con 3 μ l de muestra de ADN en la mezcla con máster mix 2 x Platinum, y, (C) ensayos con KAPA 3G Taq. Debido a esto se escogió la KAPA como polimerasa taq para continuar con el resto de las pruebas, ya que marco claramente para muestras de filtración pasiva y activas.

4.2. Muestras recolectadas

Las muestras se recolectaron en cuatro ríos de Bocas del Toro: Río Pastores y Río Nigua (Almirante) y Río Negro y Canal de Changuinola (Changuinola). Y de 2 lagos: Big Greek (Bocas del Toro) y Gatún (Panamá).

Se obtuvo 6 muestras para filtración pasiva y 6 muestras para filtración activa, dos veces en cada uno de los sitios escogidos, obteniendo 12 muestras para filtración pasiva por método por cada uno de los sitios, haciendo un total de 144 muestras (72 muestras para filtración pasivas y 72 muestras para filtración activas). Se secuenciaron 160 muestras en total, incluyendo controles y blancos. Para los controles se utilizaron controles negativos (para las PCR y los sitios, conocidos también como blancos) y para controles positivos se utilizaron muestras ya existentes en el laboratorio y cuantificadas de suelo. Están también se secuenciaron y analizaron.

4.2.1. Barcoding de las muestras

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|----|
| | | SA701 | SA702 | SA703 | SA704 | SA705 | SA706 | SA707 | SA708 | SA709 | SA710 | SA711 | |
| A | SD501 | JD005 | JD019 | JD039 | JD104 | JD054 | JD119 | JD069 | JD090 | JD142 | JD079 | JD157 | |
| B | SD502 | JD006 | JD020 | JD040 | JD105 | JD055 | JD120 | JD070 | JD091 | JD143 | JD080 | JD158 | |
| C | SD503 | JD007 | JD021 | JD041 | JD106 | JD056 | JD121 | JD129 | JD092 | JD144 | JD081 | JD159 | |
| D | SD504 | JD008 | JD022 | JD042 | JD107 | JD057 | JD122 | JD130 | JD093 | JD145 | JD082 | C+ | |
| E | SD505 | JD009 | JD023 | JD043 | JD108 | JD058 | JD065 | JD131 | JD094 | JD146 | JD083 | C-PCR1 | |
| F | SD506 | JD010 | JD024 | JD044 | JD109 | JD116 | JD066 | JD132 | JD095 | JD147 | JD154 | C-PCR2 | |
| G | SD507 | JD011 | JD025 | JD045 | JD052 | JD117 | JD067 | JD133 | JD096 | JD077 | JD155 | | |
| H | SD508 | JD012 | JD026 | JD103 | JD053 | JD118 | JD068 | JD134 | JD141 | JD078 | JD156 | | |

Figura 18. Muestras de la filtración activas con sus respectivos Index.

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|----|----|
| | | SA701 | SA702 | SA703 | SA704 | SA705 | SA706 | SA707 | SA708 | SA709 | SA710 | | |
| A | SB501 | JD013 | JD030 | JD051 | JD060 | JD126 | JD076 | JD098 | JD151 | JD089 | C-PCR1 | | |
| B | SB502 | JD014 | JD031 | JD110 | JD061 | JD127 | JD135 | JD099 | JD152 | JD160 | C-PCR2 | | |
| C | SB503 | JD015 | JD033 | JD111 | JD062 | JD128 | JD136 | JD100 | JD153 | JD161 | | | |
| D | SB504 | JD016 | JD036 | JD112 | JD063 | JD071 | JD137 | JD101 | JD084 | JD162 | | | |
| E | SB505 | JD017 | JD046 | JD113 | JD064 | JD072 | JD138 | JD102 | JD085 | JD163 | | | |
| F | SB506 | JD018 | JD047 | JD114 | JD123 | JD073 | JD139 | JD148 | JD086 | JD164 | | | |
| G | SB507 | JD027 | JD048 | JD115 | JD124 | JD074 | JD140 | JD149 | JD087 | JD165 | | | |
| H | SB508 | JD028 | JD050 | JD059 | JD125 | JD075 | JD097 | JD150 | JD088 | C+ | | | |

Figura 19. Muestras de la filtración pasiva con sus respectivos Index.

En la figura 18 y 19 se observa todas las muestras ordenadas en platos de 96 con sus respectivos controles positivos y negativos, además de cada una de las combinaciones de

los index para los platos donde se encuentran las filtraciones activas (Figura 18) y filtraciones pasivas (Figura 19).

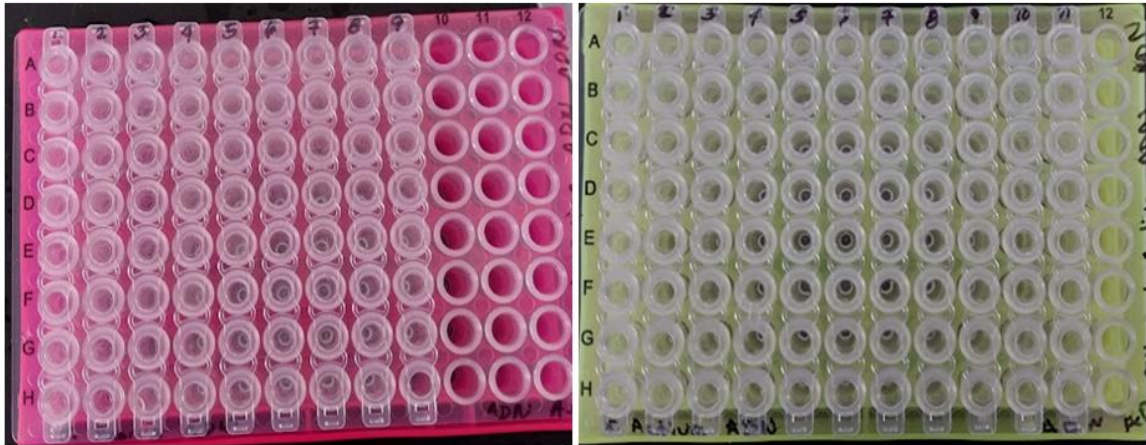


Figura 20. Platos de 96 con las muestras para filtración activa (Plato color rosado) y filtraciones pasivas (Plato de color verde).

En la Figura 20 se puede observar los platos de 96 con las muestras dispuestas como se muestra en el diagrama de las Figuras 18 y 19.

4.2.2. Cuantificación del ADN mediante en NanoDrop.

Tabla 2. Cuantificación promedio del ADN con el NanoDrop para cada uno de los sitios.

| Sitios | Activa | Pasiva |
|------------|------------------|------------------|
| Big Creek | 36.6 ng/ μ L | 10.2 ng/ μ L |
| ChangCanal | 20.1 ng/ μ L | 7.1 ng/ μ L |
| Gatún | 16.7 ng/ μ L | 2.5 ng/ μ L |
| Negro | 62.1 ng/ μ L | 4.3 ng/ μ L |
| Nigua | 19.5 ng/ μ L | 3.8 ng/ μ L |
| Pastores | 10.7 ng/ μ L | 5.7 ng/ μ L |

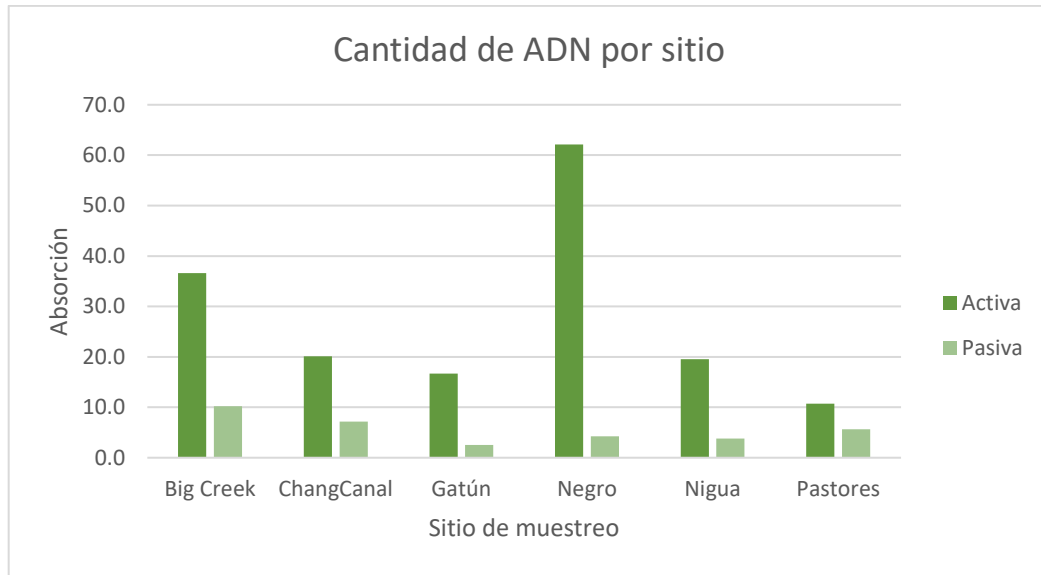


Figura 21. Promedio de los valores obtenidos con el NanoDrop para cada uno de los sitios.

Una vez realizadas las extracciones se procedió a cuantificar la cantidad de ADN con un espectrofotómetro (Figura 20 y 21), donde las filtraciones Activas se encontró una mayor cantidad de ADN, mientras que las filtraciones pasivas fueron muy por debajo de la mitad de los obtenido en cada uno de los puntos. Además, se puede observar que en la Filtración Activa el Río Negro (62.1 ng/μL) obtuvo una mayor cantidad de ADN, seguido del Lago Big Creek (36.6 ng/μL). En cuanto a ChangCanal (20.1 ng/μL) y Nigua (19.5 ng/μL) tienen una cantidad de ADN muy similar, seguido por Gatún (16.7 ng/μL) y el que menos cantidad obtuvo fue Pastores (10.7 ng/μL). Mientras que en la filtración pasiva el Lago Big Creek (10.2 ng/μL) obtuvo mayor cantidad de ADN, seguido de ChangCanal (7.1 ng/μL) y Pastores (5.7 ng/μL), a continuación, tenemos a Río Negro (4.3 ng/μL) y Nigua (3.8 ng/μL) y como ultimo con menor cantidad el Lago Gatún (2.5 ng/μL).

4.2.3. Estadísticos de las muestras

Tabla 3. Cantidad de secuencias obtenidas en cada uno de los sitios de muestreo.

| Sitios de muestreo | Número de muestras (cianobacterias) | Bacterias | Cianobacterias | % de cianobacterias |
|--------------------|-------------------------------------|------------------|----------------|---------------------|
| Lago Big Creek | 23 | 1,131,447 | 50,845 | 4.5 |
| ChangCanal | 21 | 529,812 | 7,416 | 1.4 |
| Lago Gatún | 24 | 1,350,628 | 37,925 | 2.8 |
| Río Negro | 14 | 676,724 | 5,204 | 0.8 |
| Río Nigua | 4 | 593,860 | 632 | 0.01 |
| Río Pastores | 19 | 768,258 | 9,498 | 1.2 |
| Total | 105 | 5,050,729 | 111,520 | 10.71 |

Se obtuvieron 51 574 taxas en 160 muestras, donde 2530 pertenecía a Archea, 49044 a Bacteria, 2 a Eukaryota y 3 a NA. Una vez aplicados los filtros se obtuvo 49 183 taxas, donde 1040 ASVs eran de las cianobacterias. Con un total de 5,050,729 secuencias donde 111,520 secuencias pertenecían al grupo de las cianobacterias, esto equivale a un porcentaje del 10.71% de las secuencias encontradas. En cuanto a las muestras luego de realizar la filtración de las cianobacterias y escogió muestras mayores a 50 secuencias, se obtuvo un total de 105 muestras donde; 24 pertenecían al Río Gatún, 23 al Lago Big Creek, 19 al Río Pastores, 14 al Río Negro, 21 al Canal de Changuinola y 4 al Río Nigua .

4.2.3. Diversidad de cianobacterias capturadas por cada método

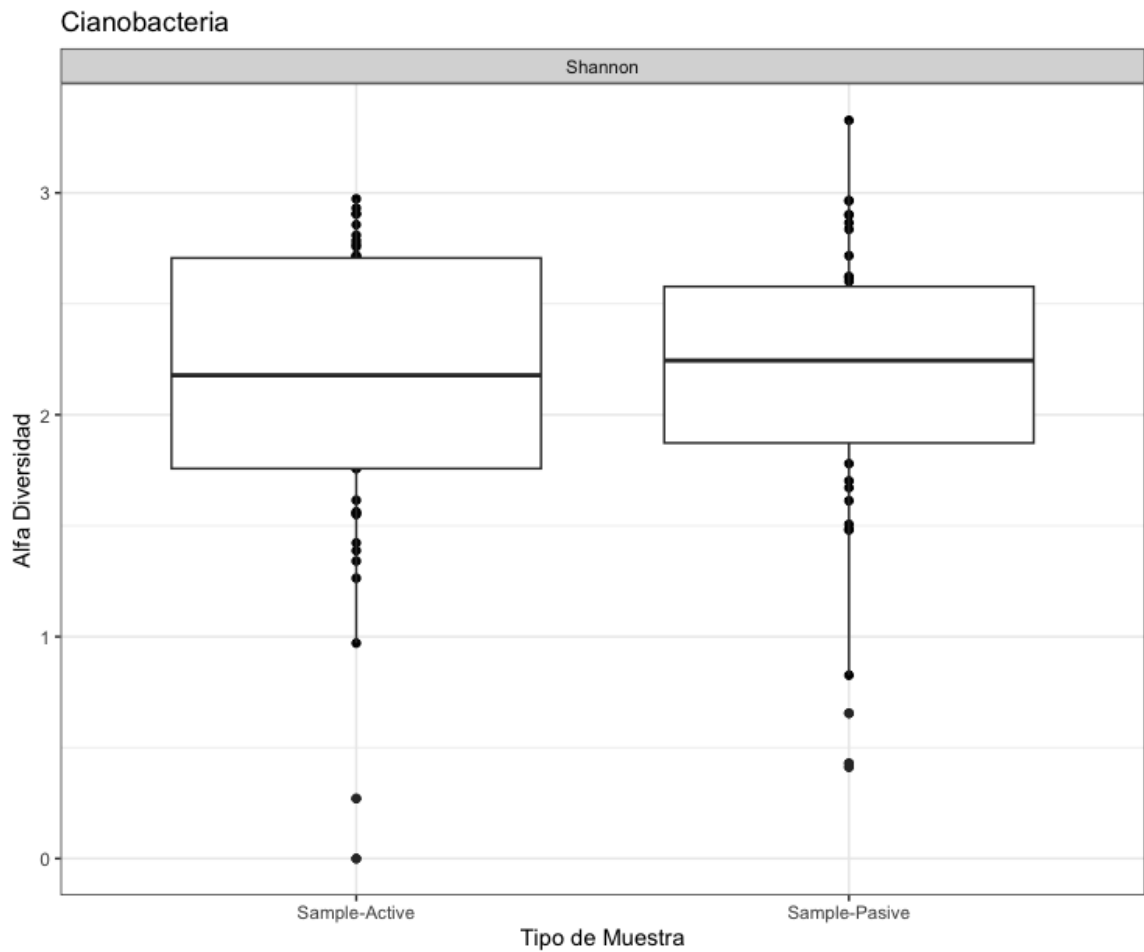


Figura 22. Diversidad de las cianobacterias encontradas en cada uno de los métodos de colecta.

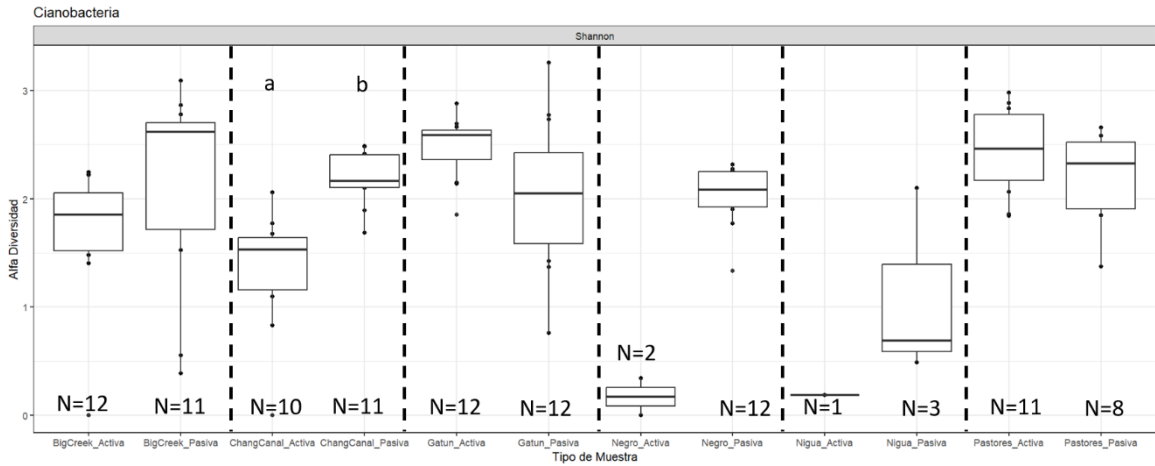


Figura 23. Diversidad hallada por cada uno de los métodos utilizados en cada uno de los sitios de muestreo.

Tabla 4. Comparación de las comunidades de Cianobacteria con una prueba de Wilcoxon entre las poblaciones de las muestras activas y pasivas para cada uno de los sitios.

| Sitio | Activa-Pasiva |
|-------------------|----------------------|
| Big Creek | 0.13652 |
| Gatún | 0.024 |
| Negro | 0.06907 |
| ChangCanal | 0.00225 |
| Nigua | 0.56897 |
| Pastores | 0.11137 |

Comparando las muestras pasivas y activas con una prueba de Kruska Wallis ($p < 0.05$), existe una diferencia significativa entre las muestras pasivas y activas.

La diversidad general encontrada para cada uno de los métodos de muestreo fue la misma (Figura 22), en cuanto a la diversidad de comunidades (Figura 23) capturada con ambos métodos en cada uno de los sitios de muestreo no es consistente, ya que en el Lago Big

Creek se puede observar que para filtración activa el número de muestras se mantuvo en 12 mientras que en la filtración pasiva se perdió una (11) muestras a la hora de buscar solo cianobacterias, aun así se ve una ligera diferencia pero no es significativa (prueba pareada de Wilcoxon, $p: 0.13652$). En el Canal de Changuinola se encontró 10 muestras para la filtración activa y 11 muestras para la filtración pasiva, entre estos métodos de filtración si se encontró una diferencia significativa (prueba pareada de Wilcoxon, $p:0.00225$), siendo la pasiva mejor para filtrar en este sitio. Para el lago Gatún ambos métodos de filtración se mantuvieron con 12 muestras, y se presenta una diferencia significativa entre ambos métodos (prueba pareada de Wilcoxon, $p:0.024$). Siendo la filtración activa la mejor. En el río Negro la filtración activa quedo con 2, mientras que la pasiva se mantuvo con las 12 muestras, pero las diferencias entre ambos métodos no son significativas (prueba pareada de Wilcoxon, $p:0.06907$). En el río Nigua hay muy pocas muestras, ya que para la activa se obtuvo 1 sola muestra mientras que para la filtración activa se obtuvieron 3. En el río Pastores se obtuvieron 11 para filtración activa y 8 para la filtración pasiva, más la diferencia no es significativa (prueba pareada de Wilcoxon, $p:0.11137$) (Tabla 4).

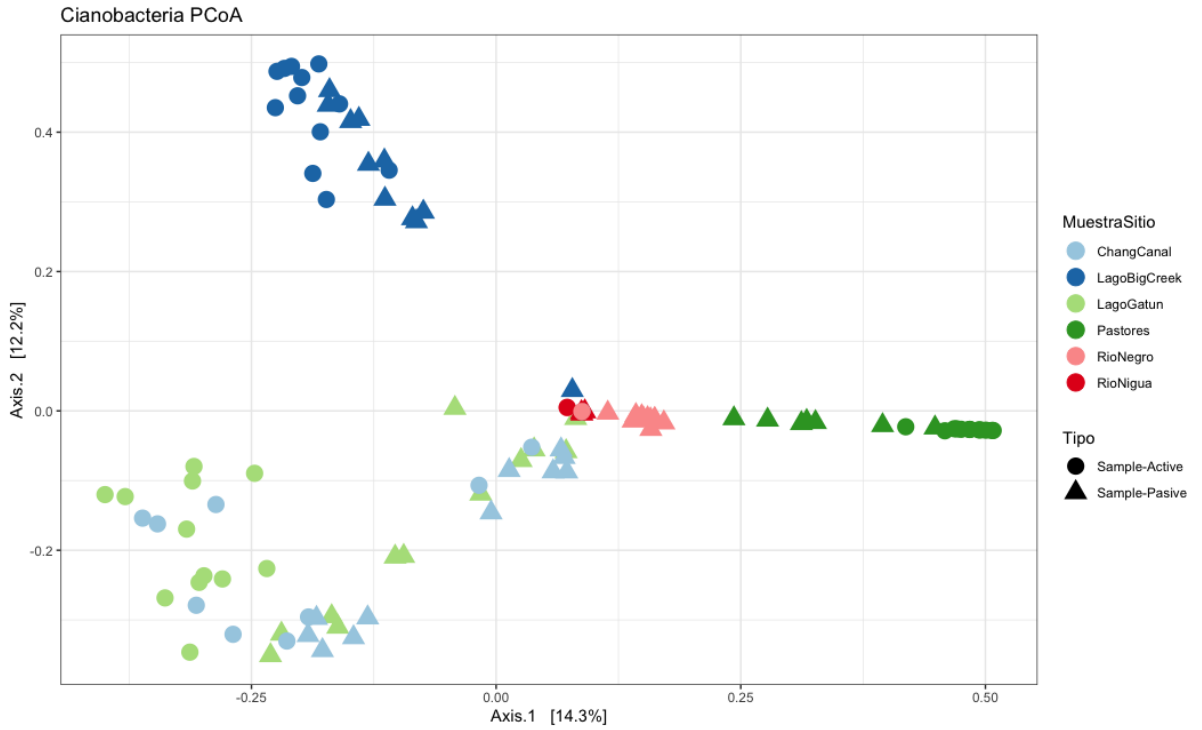


Figura 24. Comunidades capturadas por los métodos utilizados en cada uno de los sitios.

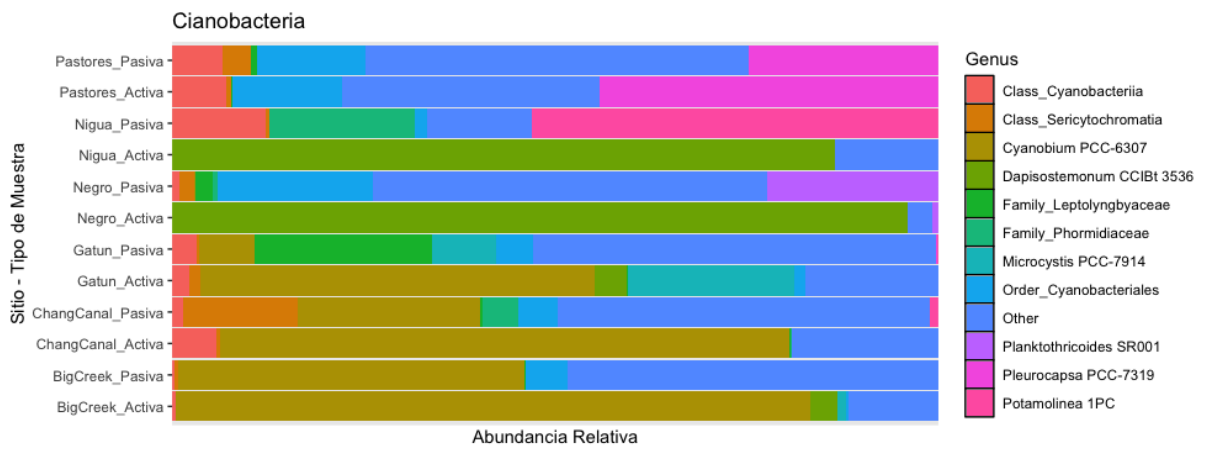


Figura 25. Abundancia de las comunidades (a nivel de género) capturadas por cada uno de los métodos en cada uno de los sitios.

En las comunidades capturadas por cada uno de los sitios podemos observar que existe una amplia variación (Figura 24), si comparamos en general, en el Río Pastores se capturaron los mismos géneros, pero en diferentes abundancias relativas, y dependiendo del género su captura fue más abundante con el método de filtración activa o filtración pasiva. Pero en los ríos Nigua y Negro, además del canal de Changuinola y el lago Big Creek se nota la diferencia en la abundancia entre los métodos de muestreo. Se observa que las comunidades de los ríos son muy diferentes entre sí. Mientras que la de los ríos es más similar entre si (Figura 25).

En cuanto a las comunidades más abundante, tomando en cuenta el tipo de muestreo en cada uno de los sitios podemos observar que:

En el Río Pastores: el género más dominante fue *Pleurocapsa*, que fue capturado con filtración activa, presente en la filtración pasiva solo que, en menor dominancia, siendo superados por otros géneros. En el Río Nigua Hay una gran abundancia del género *Dapisostemonun*, no estando presente en la filtración pasiva, y este siendo dominado por el género *Potamolinea*. : Hay una gran abundancia de *Dapisostemonun* en la filtración activa. En cuanto al Rio Negro en la filtración activa el género dominante es *Dapisostemonum* y en la filtración pasiva podemos encontrar *Planktothricoides*. Mientras que, en el Lago Gatún, Big Greek y ChangCanal podemos encontrar *Cynobium* en las muestras pasivas y activas, pero en mayor abundancia en las muestras activas.

4.2.2. Diferencia de diversidad en cianobacterias capturadas entre ríos y lagos

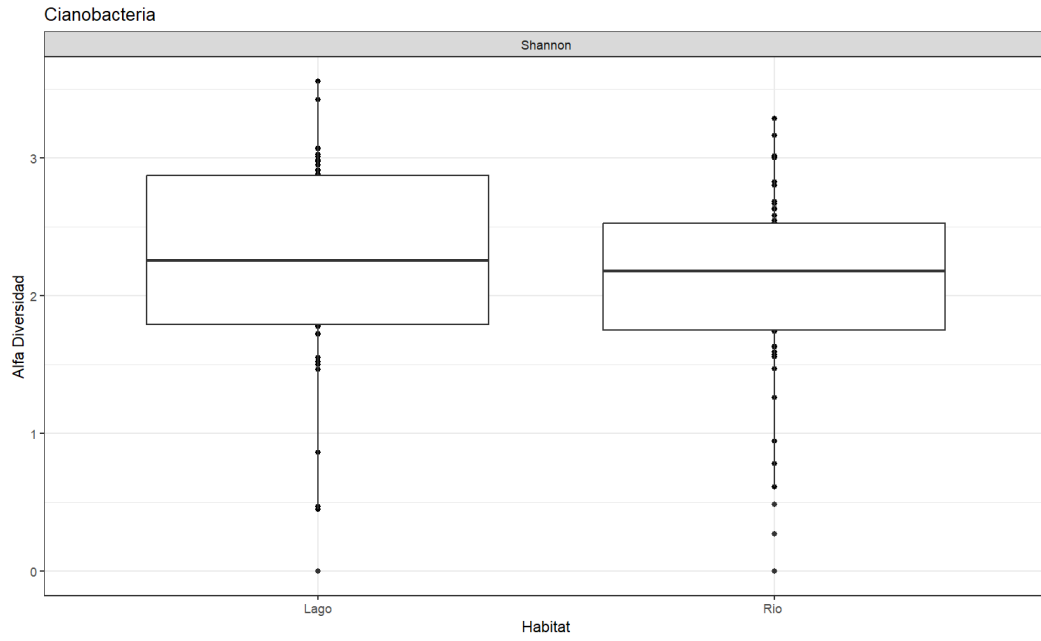


Figura 26. Alfa diversidad presente en ríos y lagos.

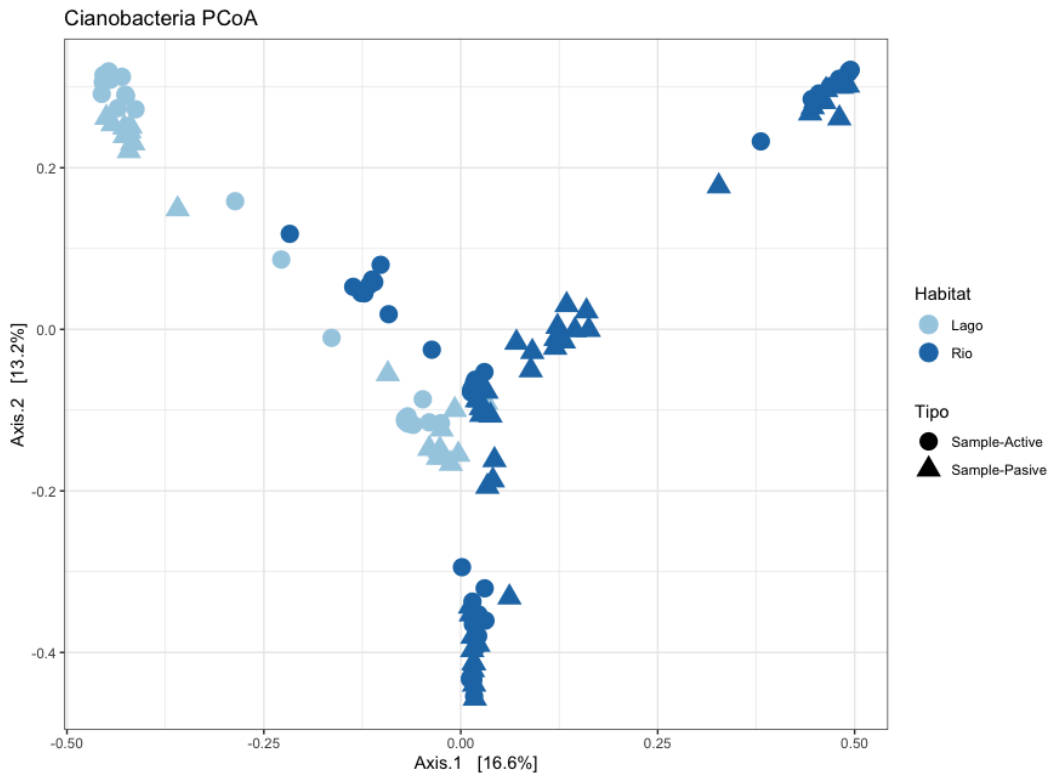


Figura 27. Diversidad capturada por cada uno de los métodos en ríos y lagos.

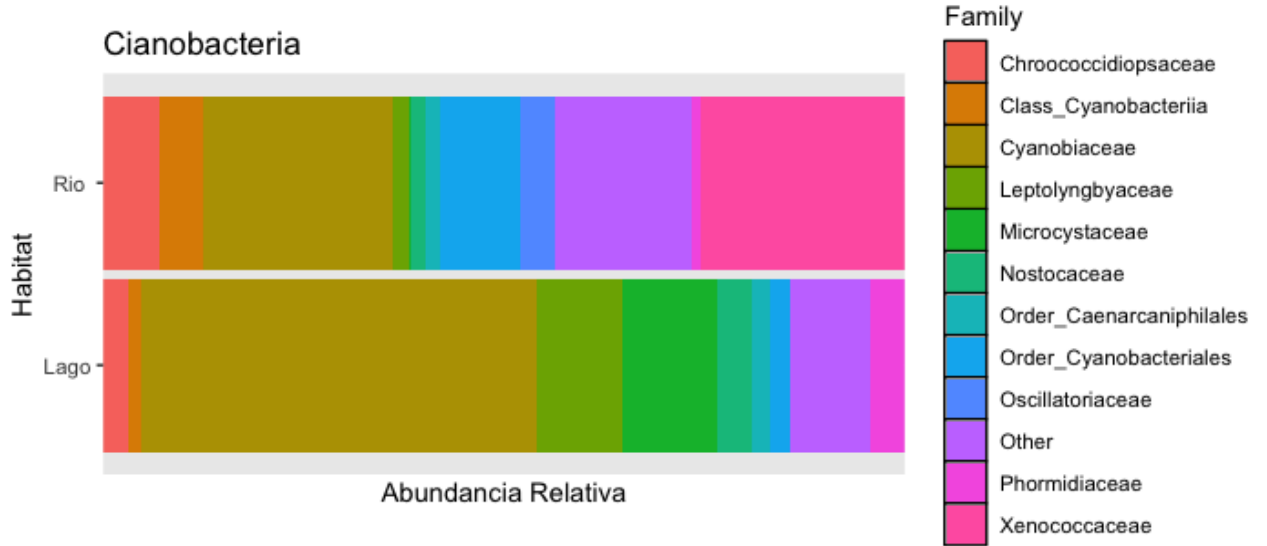


Figura 28. Abundancia relativa de las comunidades (por familia) de cianobacterias capturadas para ríos y lagos.

La diversidad entre los ríos y lagos es muy similar entre sí (Figura 26 y 27), sin embargo, tanto la prueba de Kruskal-Wallis ($H = 0.0599$) como la de Wilconxon ($p = 0.06$), mostrando que existen diferencia significativa en cuanto a la diversidad alfa de entre los ríos y los lagos es la misma (Figura 28), pero cuando vamos a ver las comunidades de ambos sitios (ríos y lagos). En los lagos, predomina la familia de los *Cyanobiaceae*, mientras que en los ríos está presente casi en la misma cantidad que la familia de los *Xenococcaceae*.

En cuanto a la diversidad por hábitat podemos notar que:

Los lagos tienen una mayor cantidad de *Cyanobiceae* y los ríos tienen una mayor abundancia de *Xenococcaceae*. Ambos tienen presencia de *Chroococciopsaceae*,

Leptolyngbyaceae, *Nostococales*, *Microcystaceae* (aunque en lagos hay mayor diversidad) y *Oscillatoriaceae*.

4.2.4. Determinar si las condiciones físicas de los ríos influyen en los diferentes métodos de recolección.

4.2.4.1. pH en cada uno de los ríos y lagos

El pH de los sitios de muestreo se dividió en 4 rangos (6-6.5, 6.5-7, 7-7.50 y 7.50-8). Se encontró diferencia significativa relacionado a este factor (Kruska-wallis, $H=0.008698$), al realizar una prueba comparativa de pairwise se puede notar que la diferencia es entre los rangos de 7-7.5 y 7.5-8 (Figura 29), pero en el resto de los rangos no existe una diferencia significativa (Figura 30). En los pH que van de 7.00 a 8.00 el género más abundante *Leptolyngbyaceae*, en el rango de 6.00 a 6.50 está presente, pero en mayor abundancia, los géneros más abundantes en este rango son *Xenococcaceae* y *Oscillatoriaceae*. En los pH que van de 7.00 a 8.00 el género más abundante *Leptolyngbyaceae* (Color verde-chocolate), en el rango de 6.00 a 6.50 está presente, pero en mayor abundancia, los géneros más abundantes en este rango son *Xenococcaceae* (Color rosado) y *Oscillatoriaceae* (Color turquesa) (Figura 30).

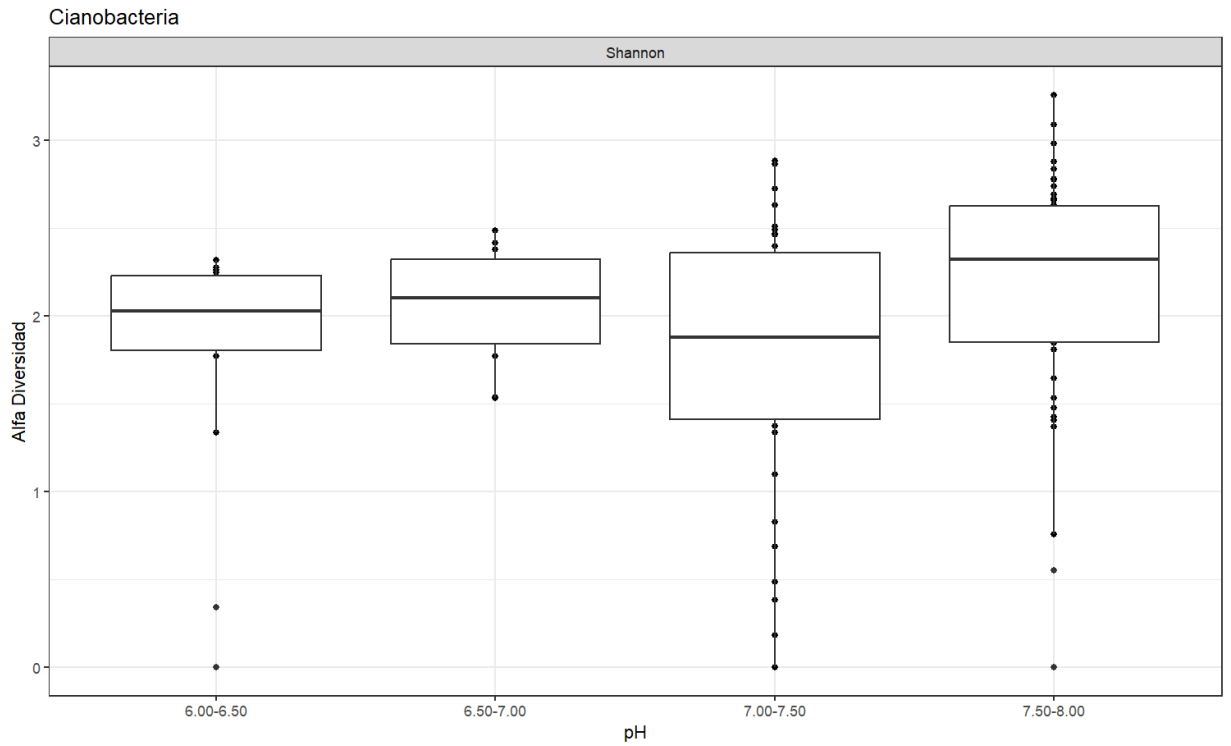


Figura 29. Alfa Diversidad de los pH presentes en los sitios estudiados.

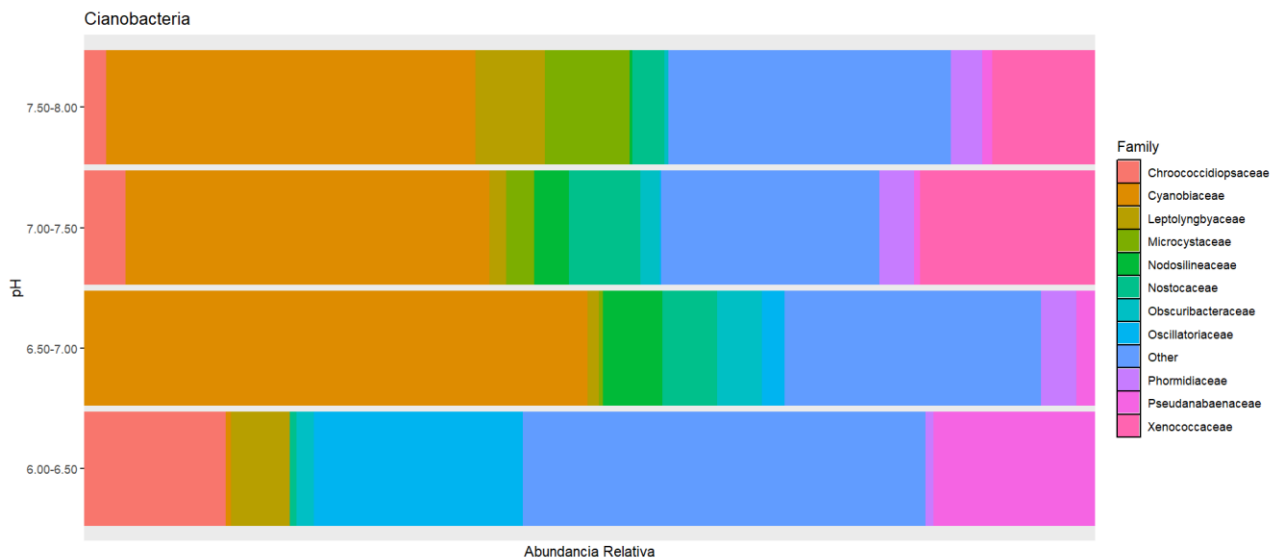


Figura 30. Comparación entre las comunidades de Cianobacterias encontradas en diferentes rangos de pH.

4.2.4.2. Salinidad presente en los sitios de muestreo

La salinidad de los sitios se dividió en baja para los valores inferiores a 1 y alta para el resto que solo estaría el río Negro, debido a que este contaba con salinidades que iban entre 8 y 12. Para la salinidad no hubo diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $H = 0.2998$) (Figura 31). Sin embargo, hubo diferencia entre las comunidades de ambos grupos (Figura 32). En salinidades bajas predominó *Cyanobiaceae* (Color naranja), mientras que a salinidades altas están en más abundancia *Chroococcidiopsaceae* (Color rojo) y *Oscillatoriaceae* (Color celeste).

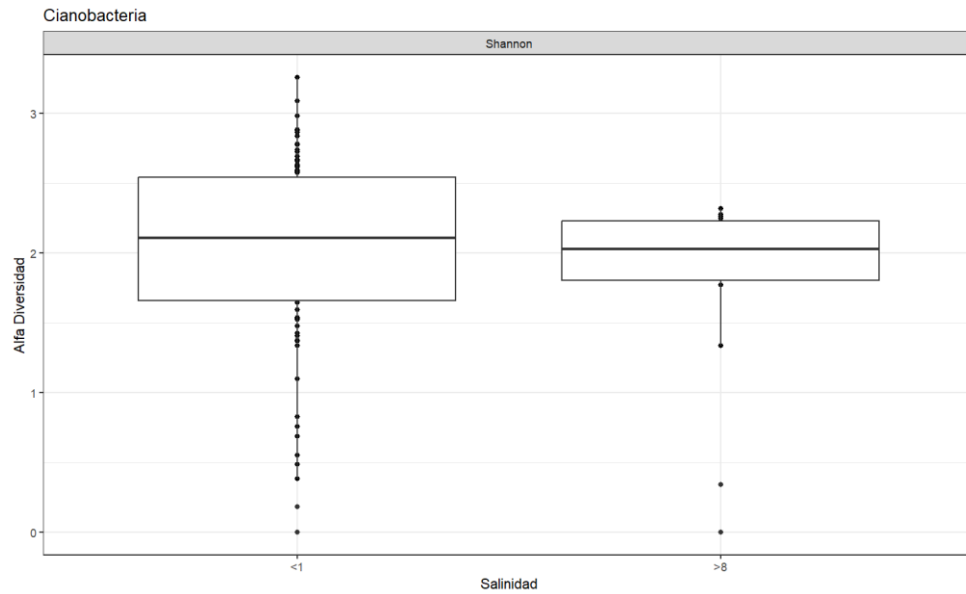


Figura 31. Alfa diversidad con respecto a la salinidad presente en salinidad baja (<1) y salinidad alta (>1).

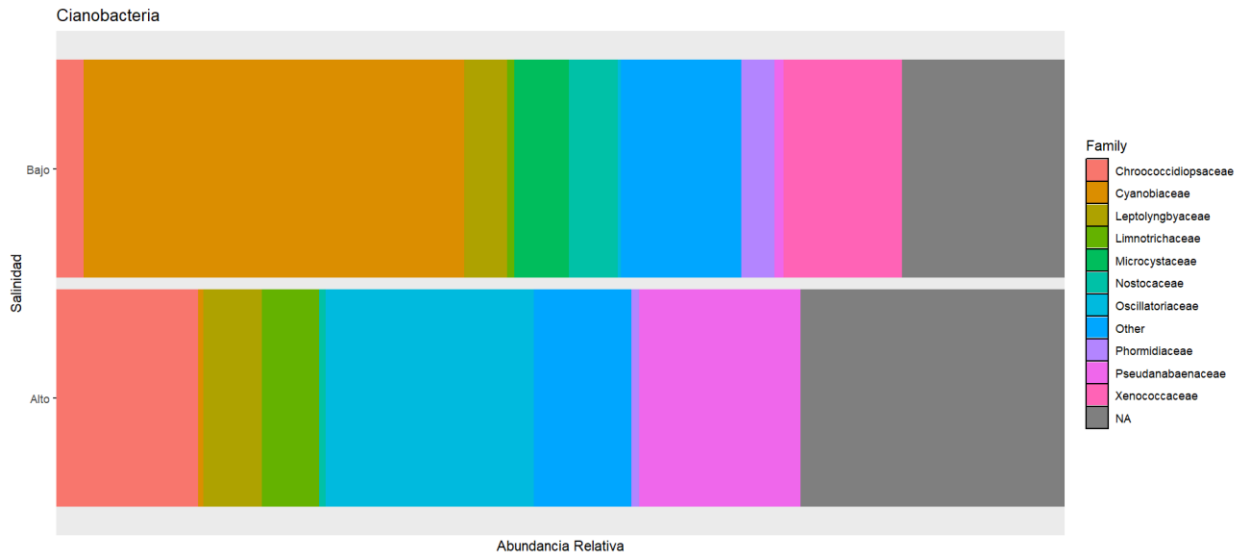


Figura 32. Comunidades presentes en las salinidades altas y bajas de los sitios muestreados.

V DISCUSIÓN

La filtración activa permitió la recolección de eDNA, así como identificación de cianobacterias en cada uno de los sitios de muestreo, con esto se concluye que el método de filtros fijos (filtración pasiva) es una opción viable para la detección de cianobacterias en sistemas de agua dulce, al igual que los datos obtenidos por Bessey (2021). Lo que lo convierte en una gran alternativa a la hora de detectar grupos de cianobacteria, eliminando la tediosa tarea de coleccionar y filtrar agua, esto reduce el tiempo empleado en el muestreo, y también se evita usar equipo o energía, permitiendo utilizar el tiempo en el despliegue de membranas permitiendo un muestreo a gran escala y una mayor replicación. Con lo cual nos permite aumentar el muestreo biológico, pudiendo hacer evaluaciones de beta diversidad más profundas, lo cual es una deficiencia en la mayoría de los estudios de eDNA acuático, debido a su baja replicación biológica, limitación impuesta por el tiempo y costo de filtración (Bessey, 2021).

5.1. Diversidad de cianobacterias capturadas por cada método

La filtración pasiva es una gran alternativa para la detección de especies de cianobacterias en ecosistemas de agua dulce del trópico; ya que, ambos métodos resultaron muy diversos, sin embargo, al observar con más detalle las comunidades en cada sitio para cada uno de los métodos se observa que las comunidades capturadas es muy diferente, lo que puede explicarse con factores como la capacidad de los filtros bajo ciertas condiciones, lo cual puede abordarse mediante una mayor replicación, al igual que el aumento del volumen del agua filtrada aumenta la diversidad de especies identificadas por colección activa, o mediante el uso de materiales alternativos como carbón activado o arcilla (Bessey, 2021). Esto también puede explicar la incongruencia de la captura de eDNA en cada uno de los métodos, pero por sitio, siendo en unas mejor la filtración activa y en otras la filtración

pasiva. Otro factor que pudo influir en las diferencias de especies capturadas fue el tiempo de colecta, debido a que, aunque si bien el agua para la filtración activa se colectó el mismo día que se recolectaron los filtros, estos estuvieron desde 24 horas antes, expuesto a el clima e intemperie y al ambiente teniendo más oportunidad de recolectar eDNA.

5.2.Diferencia de diversidad en cianobacterias capturadas entre ríos y lagos

Entre los lagos y ríos no se encontró una gran diferencia en cuando a diversidad, pero si una diferencia en la comunidad de cada uno de ellos. Esto podría deberse que a pesar de que las cianobacterias se encuentran en todo el mundo (especialmente en lagos y ríos), esta suele variar debido a que, en los ríos, las condiciones físicas y químicas favorecen la floración de cianobacterias debido a la alta concentración de nutrientes y la alta actividad hidrolítica (Causas Y Efectos En El Ecosistema | La Proliferación De Algas Nocivas | CDC, n.d.). En cambio, en los lagos, las condiciones físicas y químicas pueden restringir la floración de cianobacterias. Los lagos suelen ser más pequeños que los ríos y pueden verse a través del agua, lo que permite una mejor observación y control de las cianobacterias (Susana & García, n.d.). Además, la luz ultravioleta de baja intensidad, la deshidratación y las temperaturas extremas pueden disminuir la actividad de las cianobacterias en los lagos (Causas Y Efectos En El Ecosistema | La Proliferación De Algas Nocivas | CDC, n.d.).

5.3.Determinar si las condiciones físicas de los ríos influyen en los diferentes métodos de recolección.

5.3.1.pH

Entre los rangos encontrados no se encontró una diferencia notoria en la diversidad de cianobacterias, y las comunidades son muy similares en cada uno de los rangos, lo que

coincide con la literatura, donde nos dice que las cianobacterias pueden mantener un crecimiento sostenido entre un pH de 6,0 a 10,0 (Venezolana De Microbiología et al., n.d.). Su crecimiento es completamente inhibido en hábitats con valores de pH por debajo de 5, con óptimos entre 7,5 y cerca de 10 (G et al., 2009). Los valores más bajos encontrados fueron de 6.00 y lo más altos de 8.00, por lo que es congruente con la bibliografía encontrada.

5.3.2.Salinidad

Las salinidades que se encontraron en cada uno de los puntos de muestreo no fue un factor limitante en el crecimiento, y esto se debe a que la salinidad puede tener un impacto positivo en el crecimiento y la producción de energía de las cianobacterias (Del Zulia et al., n.d.).

5.4.Diversidad de Cianobacterias en Bocas del Toro

En este estudio se encontró diversidad de cianobacterias en los sitios estudiados. Entre las especies capturadas por cada uno de los métodos las más comunes fueron:

Pleurocapsa, el cual podemos encontrar en agua dulce, en especial en arroyos de montañas y aguas claras y no contaminado (CyanoDB 2, 2023), lo que es una buena noticia debido a que fue encontrado en el Río Pastores.

Planktothricoides, que es encontrada generalmente en el plancton de cuerpos de agua dulce y también estuarios, estas pueden producir compuestos que cambian el olor y sabor del agua, así como sustancias tóxicas para la vida acuática (Te et al., 2017), lo que tiene sentido que fuera encontrado en el Río Negro, el cual se caracteriza por su color oscuro y en ocasiones olores bastante desagradables.

Dapisostemonum es una cianobacteria Gram negativa, inmóvil y no fotosintética. Forma parte de la colección de cianobacterias del Instituto Nacional de Estudios Ambientales (NIES), pero, aunque sugiere que puede desempeñar un papel importante en su hábitat natural, este no se detalla (Hirose et al., 2021).

Potamolinea este género se ha encontrado en diversos ecosistemas, tanto dulces como marinos, es un nuevo género de cianobacteria genética y morfológicamente diverso (Martins & Branco, 2016; *Potamolinea Aerugineocaerulea* (Gomont) MDMartins & LHZBranco :: AlgaeBase, n.d.).

Cynobium genero formador de floraciones en ecosistemas de agua dulce, además de ser rico en ficocianina (Jezberová & Komárková, 2007).

VI CONCLUSIÓN

1. La filtración pasiva es una opción viable para la recolección de cianobacterias en ecosistemas de agua dulce, ya que pudimos capturar una diversidad parecida o en algunos puntos superior a la de la filtración activa.
2. Las comunidades capturadas variaron en cada uno de los métodos de filtración (activa y pasiva), lo cual puede deberse a las características de los mismos sitios de estudio y tiempo de exposición de los filtros, permitiendo una mayor oportunidad de capturar eDNA.
3. No existe diferencia en cuanto a la riqueza de la diversidad entre ríos y lagos, pero si entre las comunidades, esto puede deberse a las diferencias físicas, químicas de ambos hábitats. A parte de los aportes antropomórficos que recibe cada río y lago.
4. No se encontró evidencia que en los sitios de estudio que la salinidad o el pH fuera un factor determinante para impedir la captura de eDNA.
5. En el río Nigua se obtuvo la menor cantidad de secuencias y de muestras. Esto puede deberse a alteraciones en el agua debido a intervenciones antropomórficas, pero esto necesitaría un poco más de estudio.

VII RECOMENDACIONES

1. Analizar y tomar más factores fisicoquímicos. Debido a que se encontró que existen diferencias significativas aun entre distintitos métodos, pero el mismo sitio.
2. Estudiar con mayor detenimiento el Río Nigua, pues se capturo una menor cantidad de eDNA y no solo de cianobacteria, si no de bacterias en general, esto puede deberse a algún factor físico-químico o característica propia del propio río.
3. Estudiar la importancia ecológica de muchos géneros, pues en la literatura se muestran muchas características morfológicas, mas en cuanto a su genética o importancia ecológica la información es muy escasa.

VIII LITERATURA CITADA

“Ácidos, bases, pH y soluciones amortiguadoras” (artículo) | Khan Academy. (s. f.). Khan Academy, accedido: two de noviembre del 2023,es.khanacademy.org/science/biology/water-acids-and-bases/acids-bases-and-ph/a/acids-bases-ph-and-buffers

“Agua, ácidos y bases” | Lecciones de Biología | Ciencia | Khan Academy. (s. f.). Khan Academy, accedido: 3 de noviembre del 2023,es.khanacademy.org/science/biology/water-acids-and-bases

Aguilera, A., Echenique, R.O., & Hansen, M. (2011). Consideraciones generales de Cianobacteria aspectos ecológicos y taxonómicos. Serie: Temas de Salud Ambiental, 5.

Alcántara, M. G. C., Jiménez, J., & Urizar, E. P. (2020). Aspectos ecológicos, taxonómicos y de distribución de cianobacterias bentónicas en ríos de la región central de México. *Acta Botanica mexicana*, 127. <https://doi.org/10.21829/abm127.2020.1639>

BeCloud.com. (n.d.). Micro-organisms for which freshwater is their natural habitat. Degremont Suez. <https://www.suezwaterhandbook.com/water-and-generalities/aquatic-organisms/importance-of-aquatic-micro-organisms-for-the-water-treatment-specialist/micro-organisms-for-which-freshwater-is-their-natural-habitat>

Bessey, C; Jarman Simon, N; Simpson, T; Miller, H; Steward, T; Keesing, J
Berry, O. 2021. Passive eDNA collection enhances aquatic biodiversity analysis. Artículo: <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01760-82>.

Callahan BJ , McMurdie PJ , Holmes SP , et al. (2017). Las variantes de secuencia exacta deberían reemplazar las unidades taxonómicas operativas en el análisis de datos de genes marcadores. La revista ISME 11(12):2639-2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>

Carraro, L., Mächler, E., Wüthrich, R., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA allows upscaling spatial patterns of biodiversity in freshwater ecosystems. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17337-8>

Causas y efectos en el ecosistema | La proliferación de algas nocivas | CDC. (n.d.). <https://www.cdc.gov/habs/es/environment.html>

Classifications | NC DEQ. (s. f.). <https://www.deq.nc.gov/about/divisions/water-resources/water-planning/classification-standards/classifications>

Cotner, J. B., Hall, E. K., Scott, T., & Heldal, M. (2010). Freshwater Bacteria are Stoichiometrically Flexible with a Nutrient Composition Similar to Seston. *Frontiers in Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00132>

CyanoDB 2. (2023). [Cyanodb.cz. http://www.cyanodb.cz/#/Pleurocapsa](http://www.cyanodb.cz/#/Pleurocapsa)

De La Cruz-Cabrera, V., Taylor, F., & Farnum, F. (2020). Calidad y disponibilidad del recurso hídrico del Lago Gatún, Provincia de Colón, República de Panamá. *Revista Científica Orbis Cognitiona*, 4(2), 41–65. <https://doi.org/10.48204/j.orbis.v4n2a3>

Del Zulia, U., Jonte, V., Rosales, L., Briceño, N., & Morales, B. (n.d.). <https://www.redalyc.org/pdf/904/90430102.pdf>

Dvořák, P., Hindák, F., Hašler, P., Hindáková, A., & Poulíčková, A. (2014). Morphological and molecular studies of *Neosynechococcus sphagnicola*, gen. et sp. nov. (Cyanobacteria, Synechococcales). *Phytotaxa*, 170(1), 024. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.170.1.3>

Enfermedad y síntomas: Cianobacterias en agua dulce | La proliferación de algas nocivas | CDC. (n.d.). https://www.cdc.gov/habs/es/illness-symptoms_freshwater.html

Figuerola, B., Grossman, E. L., Lucey, N., Leonard, N. D., & O’Dea, A. (2021). Millennial-scale change on a Caribbean reef system that experiences hypoxia. *Ecography*, 44(9), 1270–1282. <https://doi.org/10.1111/ecog.05606>

Folleto Informativo pH ¿Qué es el pH? (n.d.). https://www.waterboards.ca.gov/water_issues/programs/swamp/docs/cwt/guidance/3140sp.pdf

Frigaard, N. (2018). Sugar and sugar alcohol production in genetically modified cyanobacteria. In Elsevier eBooks (pp. 31–47). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811519-0.00002-9>

Flowers, P. (2022, 2 junio). 14.2 PH y POH - Química 2eD | OpenStax. <https://openstax.org/books/qu%C3%ADmica-2ed/pages/14-2-ph-y-poh>

Fournier, C., Riehle, E., Dietrich, D. R., & Schleheck, D. (2021). Is Toxin-Producing *Planktothrix* sp. an Emerging Species in Lake Constance? *Toxins*, 13(9), 666. <https://doi.org/10.3390/toxins13090666>

Furniturewalla, A., & Barve, K. (2023). Marine antioxidants in the management of atherosclerosis. In Elsevier eBooks (pp. 273–284). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-95086-2.00033-3>

G, F., L, J., Loaiza, N. R., & Morales, E. D. (2009). Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 en relación con el pH en cultivos discontinuos. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/216459837_Crecimiento_de_la_cianobacteria_marina_Oscillatoria_sp_MOF-06_en_relacion_al_pH_en_cultivos_discontinuos

Gilbride, K. (2021). Molecular methods for the detection of waterborne pathogens. In Elsevier eBooks (pp. 237–292). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64319-3.00008-3>

Harke, M. J., Steffen, M. M., Gobler, C. J., Otten, T. G., Wilhelm, S. W., Wood, S. A., & Paerl, H. W. (2016). A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae*, 54, 4–20. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.007>

Hirose, Y., Ohtsubo, Y., Misawa, N., Yonekawa, C., Nagao, N., Shimura, Y., Fujisawa, T., Kanasaki, Y., Katoh, H., Katayama, M., Yamaguchi, H., Yoshikawa, H., Ikeuchi, M., Eki, T., Nakamura, Y., & Kawachi, M. (2021). Genome sequencing of the NIES Cyanobacteria collection with a focus on the heterocyst-forming clade. *DNA Research*, 28(6). <https://doi.org/10.1093/dnares/dsab024>

Holopainen, S., & Lehtikoinen, A. (2022). Role of forest ditching and Agriculture on Water quality: Connecting the long-term physico-chemical subsurface state of lakes with landscape and habitat structure information. *Science of The Total Environment*, 806, 151477. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151477>

Huertas, A; Centenos-Cuadros, A. (2020). Aplicaciones de las técnicas de ADN ambiental al estudio y conservación de los recursos naturales. *Revistas de ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, ISSN-e 2173-0903,Nº40,20203.

Humedal de San San Pond Sak | Bocas del Toro Province, Panama | Attractions - Lonely Planet. (n.d.). Lonely Planet. <https://www.lonelyplanet.com/panama/mainland/attractions/humedal-de-san-san-pond-sak/a/poi-sig/1332667/1328840>

Indicadores de Calidad del Agua: Variables Convencionales - Programa Regional de Monitoreo de los Acuáticos (RAMP). (n.d.). <http://www.ramp-alberta.org/river/water+sediment+quality/chemical/conventional.aspx>

Iled Rodriguez, Kristin Saltonstall y Andrés Martínez Lage. Septiembre 2022. Estudio inicial de Identificación de Invasiones de Peces Marinos en el Canal de Panamá: un enfoque de metabarcoding”. Trabajo de fin de máster en Biología Molecular, Celular y Genética. Universidad de Coruña. Recuperado el 13 de marzo de 2024, de https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/32183/RodriguezDelgado_IlledIndira_TFM_2022.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Invivo - Museu da Vida. (2022, August 3). Cianobactérias: ¿cómo transformarían la vida en la Terra? - Invivo. Invivo. <https://www.invivo.fiocruz.br/biodiversidade/cianobacterias/>

Jezberová, J., & Komárková, J. (2007). Morphological transformation in a freshwater *Cyanobium* sp. induced by grazers. *Environmental Microbiology*, 9(7), 1858–1862. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01311.x>

Liu, Q., Zhang, Y., Wu, H., Liu, F., Peng, W., Zhang, X., Chang, F., Xie, P., & Zhang, H. (2020). A review and perspective of eDNA application to eutrophication and HAB control in freshwater and marine ecosystems. *Microorganisms*, 8(3), 417. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030417>

Liu, Q., Zhang, H., Chang, F., Xie, P., Zhang, Y., Wu, H., Zhang, X., Peng, W., & Liu, F. (2022). eDNA revealed in situ microbial community changes in response to *Trapa japonica* in Lake Qionghai and Lake Erhai, southwestern China. *Chemosphere*, 288, 132605. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132605>

Martins, M. D., & Branco, L. H. Z. (2016). *Potamolinea* gen. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria): a phylogenetically and ecologically coherent cyanobacterial genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(9), 3632–3641. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001243>

Martínez, J. G. (2023, August 28). Importancia ecológica de las cianobacterias - microbacterium. *Microbacterium*. <https://microbacterium.es/importancia-ecologica-de-las-cianobacterias>

Mattson, M. D. (2006). Acid lakes and rivers. En Kluwer Academic Publishers eBooks (pp. 6-9). https://doi.org/10.1007/1-4020-4494-1_4

Microscopio.Pro. (2023, June 17). Descubre Las Fascinantes Características Y Ejemplos De Cianobacterias » Microscopio.pro. Microscopio.pro. <https://www.microscopio.pro/descubre-las-fascinantes-caracteristicas-y-ejemplos-de-cianobacterias/>

OzCoasts. (2018, May 23). pH of coastal waterways - OzCoasts. https://ozcoasts.org.au/indicators/biophysical-indicators/ph_coastal_waterways/

pH y agua | Servicio Geológico de EE. UU. (2019, October 22). <https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/ph-and-water>

Potamolinea aerugineocaerulea (Gomont) MDMartins & LHZBranco :: AlgaeBase. (n.d.). https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=166981

Recursos Naturales y Biodiversidad del Área Recreativa de Gatún, Colón. (2007, September 8). Biota Panama. <https://biota.wordpress.com/2007/09/08/recursos-naturales-y-biodiversidad-del-area-recreativa-de-gatun-colon/>

Septiembre 2008. (n.d.). Retrieved December 2, 2023, from <http://www.cich.org/publicaciones/07/chagres.pdf>

Sand-Jensen, K. (2001). Freshwater Ecosystems, Human Impact on. In Elsevier eBooks (pp. 89–108). <https://doi.org/10.1016/b0-12-226865-2/00131-0>

Susana, D., & García, I. (n.d.). CIANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS. IMPACTOS SOBRE LA SALUD HUMANA 1.

https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/cianobacterias_y_cianotoxinas.pdf

Takahashi, M., Saccò, M., Kestel, J. H., Nester, G. M., Campbell, M. A., Van Der Heyde, M., Heydenrych, M. J., Juszkiwicz, D. J., Nevill, P., Dawkins, K. L., Bessey, C., Fernandes, K., Miller, H. C., Power, M., Mousavi-Derazmahalleh, M., Newton, J. P., White, N. E., Richards, Z. T., & Allentoft, M. E. (2023). Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *Science of the Total Environment*, 873, 162322. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322>

Te, S. H., Tan, B. F., Boo, C. Y., Thompson, J. R., & Gin, K. Y. (2017). Genomics insights into production of 2-methylisoborneol and a putative cyanobactin by *Planktothricoides* sp. SR001. *Standards in Genomic Sciences*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0247-1>

Terreros, H. M., Gómez, C., Mariano, A. M., Jara, P., Mayta, H., & Benavente, P. M. (2017). Diversidad fenotípica de la cianobacteria *Pseudophormidium tenue* (Oscillatoriales, Microcoleaceae), nuevo reporte para el Perú. *Arnaldoa*, 24(1). <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.241.24119>

The Editors of Encyclopaedia Britannica. (1998, July 20). Anabaena | Nitrogen Fixation, Symbiosis & Photosynthesis. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/Anabaena>

The excellent Humedal San San Pond Sak Wetlands and AAMVECONA - review of Aamvecona, Changuinola, Panama - Tripadvisor. (n.d.). Tripadvisor. https://www.tripadvisor.com/ShowUserReviews-g679534-d4114628-r227350620-Aamvecona-Changuinola_Bocas_del_Toro_Province.html

Venezolana De Microbiología, S., Fuenmayor, V., Jonte, G., Rosales-Loaiza, L., & Morales, N. (n.d.). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. <https://www.redalyc.org/pdf/1994/199416353005.pdf>

Wang, P., & Wang, C. (2014). Water Quality in Taihu Lake and the Effects of the Water Transfer from the Yangtze River to Taihu Lake Project. In Elsevier eBooks (pp. 136–161). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382182-9.00071-2>

YSI Incorporated, Abel, L.M. (Marzo, 2009). Professional Plus User Manual. <https://www.yei.com/File%20Library/Documents/Manuals/605596-YSI-ProPlus-User-Manual-RevD.pdf>

Zhang, W., Li, J., Zhang, Z. et al. Evaluación integral de un método rentable de cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* con aguas residuales de cerdos no esterilizados para la producción de biocombustibles. *Biocombustibles biotecnol* 12 , 69 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1407-x>