



UNAP



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AMBIENTALES CON
MENCIÓN EN INDUSTRIA DEL PETRÓLEO Y MEDIO AMBIENTE**

TESIS

**DIVERSIDAD DE COMUNIDADES MICROBIANAS EN
SUELOS Y AGUAS DEL ÁREA DE CONCESIÓN
PARA LA CONSERVACIÓN CUENCA ALTA
RÍO ITAYA, IQUITOS-PERÚ 2020**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS Y
TECNOLOGÍAS AMBIENTALES CON MENCIÓN EN INDUSTRIA DEL
PETRÓLEO Y MEDIO AMBIENTE**

PRESENTADO POR: SEGUNDO LEVI ESTELA MORENO

**ASESORES: BLGA. MARIANELA COBOS RUÍZ, DRA.
BLGO. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, DR.**

IQUITOS, PERÚ

2022



UNAP



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AMBIENTALES CON
MENCIÓN EN INDUSTRIA DEL PETRÓLEO Y MEDIO AMBIENTE

TESIS

DIVERSIDAD DE COMUNIDADES MICROBIANAS EN
SUELOS Y AGUAS DEL ÁREA DE CONCESIÓN
PARA LA CONSERVACIÓN CUENCA ALTA
RÍO ITAYA, IQUITOS-PERÚ 2020

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS Y
TECNOLOGÍAS AMBIENTALES CON MENCIÓN EN INDUSTRIA DEL
PETRÓLEO Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTADO POR: SEGUNDO LEVI ESTELA MORENO

ASESORES: BLGA. MARIANELA COBOS RUÍZ, DRA.
BLGO. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, DR.

IQUITOS, PERÚ

2022



UNAP

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

**Escuela de Postgrado
"Oficina de Asuntos
Académicos"**



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
N° 030-2022-OAA-EPG-UNAP

En Iquitos, en el auditorio de la Escuela de Postgrado-EPG de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana-UNAP, a los quince días del mes de junio de 2022 a horas 15:00, se dió inicio a la sustentación de la tesis denominada "DIVERSIDAD DE COMUNIDADES MICROBIANAS EN SUELOS Y AGUAS DEL ÁREA DE CONCESIÓN PARA LA CONSERVACIÓN CUENCA ALTA RÍO ITAYA, IQUITOS-PERÚ 2020", aprobado con Resolución Directoral N°0509-2022-EPG-UNAP, presentado por el egresado SEGUNDO LEVI ESTELA MORENO, para optar el Grado Académico de Maestro en Ciencias y Tecnologías Ambientales con mención en Industrias del Petróleo y Medio Ambiente, que otorga la UNAP de acuerdo a la Ley Universitaria N° 30220 y el Estatuto de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

El jurado calificado designado mediante Resolución Directoral N°0344-2022-EPG-UNAP, esta conformado por los profesionales siguientes:

Ing. Duma Luz Rengifo Pinedo, Dra.	Presidenta
Blgo. Freddy Orlando Espinoza Campos, Dr.	Miembro
Ing. Jorge Aquiles Vargas Fasabi, MSc.	Miembro

Después de haber escuchado la sustentación y luego de formuladas las preguntas, éstas fueron respondidas: A SATISFACCION

Finalizado la evaluación; se invitó al público presente y al sustentante abandonar el recinto; y, luego de una amplia deliberación por parte del jurado, se llegó al resultado siguiente:

La sustentación pública y la tesis han sido: APROBADA con calificación BUENA

A continuación, el Presidente del Jurado da por concluida la sustentación, siendo las 4:50 pm del quince de junio del 2022; con lo cual, se le declara al sustentante APTO, para recibir el Grado Académico de Maestro en Ciencias y Tecnologías Ambientales con mención en Industrias del Petróleo y Medio Ambiente.

Ing. Duma Luz Rengifo Pinedo, Dra.
Presidenta

Blgo. Freddy Orlando Espinoza Campos, Dr.
Miembro

Ing. Jorge Aquiles Vargas Fasabi, MSc.
Miembro

Blgo. Juan Carlos Castro Gómez, Dr.
Asesor

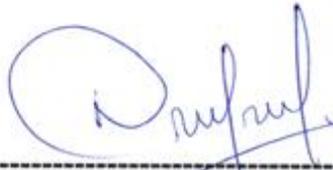
Blga. Marianela Cobos Ruiz, Dra
Asesora

Somos la Universidad licenciada más importante de la Amazonía del Perú, rumbo a la acreditación

Calle Los Rosales cuadra 5 s/n, San Juan Bautista, Maynas, Perú
Teléfono: (5165) 261101 Correo electrónico: postgrado@unapiquitos.edu.pe www.unapiquitos.edu.pe



TESIS APROBADA EN SUSTENTACIÓN PÚBLICA EL 15 DE JUNIO
DEL 2022, EN EL AUDITORIO DE LA ESCUELA DE POSTGRADO DE
LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, EN LA
CIUDAD DE IQUITOS-PERÚ



**ING. DUMA LUZ RENGIFO PINEDO, DRA.
PRESIDENTE**



**BLGO. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, DR.
MIEMBRO**



**ING. JORGE AQUILES VARGAS FASABI, MSc.
MIEMBRO**



**BLGA. MARIANELA COBOS RUÍZ, DRA.
ASESORA**



**BLGO. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, DR.
ASESOR**

A Dios, quien me conduce diariamente por el camino correcto, a mis padres Levi y Ruth, mis hermanos Daniel y Tabita, a Cristiano Levi mi hijo y mi esposa Ana Isabel, quienes son mi mayor motivación para seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología por financiar la tesis, bajo el marco del Proyecto: “Adquisición de un Sistema de Secuenciamiento Masivo NextSeq 550 Como Soporte para Estudios Genómicos y Metagenómicos de la Biodiversidad de la Amazonía Peruana”. (Convenio 018-2018-FONDECYT/BM).

A mis asesores, Dra. Marianela Cobos Ruíz y Dr. Juan Carlos Castro Gómez, por conducirme y guiarme a descubrir este mundo de la investigación científica; que por cierto es muy fascinante.

A mis compañeros y amigos de Laboratorio, Hicler Napoleón Rodríguez Mashacuri, Joe Brian Petterman Vílchez, Milagros Margarita Torres Vásquez, Miguel Ángel Grandez Mavila, Marjorie Tatiana Del Aguila Ríos, Ruth Celestina Condori Mamani, Paula Alessandra Gálvez Zagaceta y muchos otros, por el apoyo incondicional brindado durante nuestras interminables jornadas de aprendizaje constante en el laboratorio.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú, por brindarme todas las facilidades, las instalaciones y materiales para desarrollar la tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Páginas
Carátula	i
Contra carátula	ii
Acta de sustentación	iii
Jurados	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice de contenido	vii
Anexos	vii
Índice de tablas	viii
Índice de Figuras	ix
Resumen	x
Abstract	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	
1.1. Antecedentes	3
1.2. Bases teóricas	7
1.2. Definición de términos básicos	8
CAPÍTULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS	
2.1. Variables y su operacionalización	11
2.2. Formulación de la hipótesis	11
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	
3.1. Tipo y diseño de la investigación	12
3.2. Población y muestra	12
3.3. Técnicas e instrumentos	13
3.4. Procedimientos de recolección de datos	13
3.5. Técnicas de procesamientos y análisis de los datos	16
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	18
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	25
CAPÍTULO VI. PROPUESTA	28
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES	29
CAPÍTULO VIII. RECOMENDACIONES	30
CAPÍTULO IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS	
Gel de agarosa al 1% mostrando las bandas de ADN metagenómico purificado.	
Amplificación del ADN metagenómico.	
Ficha de registro de datos de colecta de muestras.	
Ficha de registro de análisis de Laboratorio.	
Flujograma experimental de la tesis.	
Galería de fotos.	

ÍNDICE DE TABLAS

		Páginas
Tabla 1.	Análisis de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelos colectadas del CCCARI.	20
Tabla 2.	Parámetros fisicoquímicos de las muestras de aguas colectadas del CCCARI.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

		Páginas
Figura 1.	Mapa de ubicación del Área del CCCARI, donde se ubican los puntos de muestreo.	14
Figura 2.	Dominios de microorganismo identificados en las muestras de suelo del CCCARI por secuenciación masiva.	22
Figura 3.	Filos de microorganismos identificados en las muestras de suelo del CCCARI por secuenciación masiva	23
Figura 4.	Géneros de microorganismos identificados en las muestras de suelo del CCCARI por secuenciación masiva.	23
Figura 5.	Análisis de rarefacción y Diversidad microbiana alfa de la muestra de suelo obtenido por secuenciación masiva.	24
Figura 6.	Dominios de microorganismos identificados en las muestras de agua del CCCARI por secuenciación masiva.	25
Figura 7.	Filos de microorganismos identificados en las muestras de agua del CCCARI por secuenciación masiva.	26
Figura 8.	Géneros de microorganismos identificados en las muestras de agua del CCCARI por secuenciación masiva.	26
Figura 9.	Análisis de rarefacción y Diversidad microbiana alfa de la muestra de agua obtenido por secuenciación masiva	27

RESUMEN

El análisis metagenómico es muy valioso, ya que nos permite obtener la información genética de los microorganismos presentes en una muestra. El objetivo principal, fue determinar la diversidad de las comunidades microbianas en los suelos y aguas del Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta río Itaya (CCCARI). El criterio de selección de las muestras de suelos fue su tipología, topografía y relieve, para las muestras de agua, estas fueron colectadas de quebradas cochas y el río Itaya, se determinaron los parámetros fisicoquímicos de ambas muestras. El ADN metagenómico de suelos y aguas fueron purificados con métodos estándares, se prepararon las librerías para luego ser secuenciados en la plataforma de Illumina NextSeq™ 550. Las secuencias se procesaron utilizando el servidor MG-RAST. Los resultados indican que los suelos son de clase textural franco y ligeramente ácidos. Las muestras de agua presentaron características fisicoquímicas típicas de aguas negras. Adicionalmente, el secuenciamiento masivo nos indica una alta diversidad microbiana en los suelos y aguas del CCCARI con predominancia de bacterias. En conjunto, estos resultados nos indican que la diversidad microbiana registrada en las muestras de suelo y aguas del CCCARI en parte se atribuyen a las características fisicoquímicas de estos ambientes.

Palabras clave: ADN, Metagenómas, Microbioma, Secuenciamiento.

ABSTRACT

Metagenomic analysis is very valuable because it allows us to obtain the genetic information of the microorganisms present in a sample. The main objective was to determine the diversity of microbial communities in the soils and waters of the Upper Itaya River Basin Conservation Concession Area (CCCARI). The selection criteria for the soil samples were their typology, topography and relief; for the water samples, these were collected from cochas streams and the Itaya River, and the physicochemical parameters of both samples were determined. Metagenomic DNA from soils and water were purified with standard methods, libraries were prepared and then sequenced on the Illumina NextSeq™ 550 platform. The sequences were processed using the MG-RAST server. The results indicate that the soils are of loam and slightly acidic textural class. The water samples exhibited physicochemical characteristics typical of black waters. Additionally, the massive sequencing indicates a high microbial diversity in the soils and waters of the CCCARI with a predominance of bacteria. Taken together, these results indicate that the microbial diversity recorded in the CCCARI soil and water samples is partly attributed to the physicochemical characteristics of these environments.

Keywords: DNA, Metagenomes, Microbiome, Sequencing.

INTRODUCCIÓN

Se calcula que en nuestro planeta habitan millones de microorganismos ⁽¹⁾, los cuales son capaces de habitar en ambientes extremos de la tierra ⁽²⁾, logrando ser encontrados en el suelo, el agua, fuentes termales, minas de carbón y ecosistemas gélidos ⁽³⁾. Pero de toda esta cantidad de microbios, solamente se ha logrado cultivar, identificar y utilizar algunas especies en procesos biotecnológicos ⁽⁴⁾. El Perú es uno de los pocos países, que posee una gran diversidad de ecosistemas, divididas en sus regiones geográficas de costa, sierra y selva ⁽⁵⁾. En la selva se encuentra la Amazonía, la cual por su ubicación, es considerada una zona prometedora para identificar nuevas especies ⁽⁶⁾, algunos factores naturales como la variabilidad del pH de los suelos, influye mucho en la abundancia de microfauna ⁽⁷⁾.

La obtención y aprovechamiento de la biomasa microbiana puede ser una fuente generadora de material genético, el cual puede ser utilizado como materia prima para la elaboración de diversos metabolitos de interés comercial ⁽⁸⁾. Todo esto, debido a que, tradicionalmente nuestra región ha dependido económicamente de la extracción directa de sus recursos naturales, el cual en el tiempo tiene como resultados una serie de problemas ambientales que son difíciles y costosos de tratar ⁽⁹⁾. Estos problemas van desde la deforestación de los bosques provocado por la extracción de madera ⁽¹⁰⁾, la contaminación de los suelos y aguas por derrames de hidrocarburos y la minería ilegal ^(11, 12). Debido a ello es importante encontrar alternativas que nos permitan explotar nuestros recursos con actividades que sean rentables y amigables con el ambiente.

Una alternativa que viene teniendo mucho interés en la actualidad, es la identificación de microorganismos que presenten principios activos y puedan ser utilizados por la bioindustria ⁽¹³⁾. Pero aún existen limitaciones para lograr aislar y cultivar nuevas cepas bacterianas, el desconocimiento de los requerimientos nutricionales y la medición de los parámetros de crecimiento son factores claves que determinan que una especie pueda ser o no utilizada ⁽¹⁴⁾. Además, a esto se suma que el estudio de la microfauna

en la Amazonía peruana es incipiente, en el registro de los bancos de genes a nivel mundial, no se reportan muchas especies que se hayan descritas en este lugar, convirtiendo esta falta de estudio en una necesidad urgente, que debe ser resuelta por la comunidad científica local y nacional. El estudio e identificación de los microorganismos hoy es posible, gracias a la tecnología de Secuenciamiento de Próxima Generación (NGS) ⁽¹⁵⁾. Entre ellos se encuentra los análisis metagenómicos, el cual es una técnica que se utiliza en biología molecular, para lograr la identificación de especies nuevas, a partir de estudiar el material genético ⁽¹⁶⁾. Esta técnica es independiente del cultivo, por lo que disminuye el tiempo que se requiere para estudiar la comunidad microbiana de cualquier ecosistema, además te permite conocer los potenciales metabolitos que son de interés en el mercado ⁽¹⁷⁾.

Actualmente la Universidad Científica del Perú, cuenta con un área en concesión cedida por el estado para ser utilizada en el desarrollo de investigación científica por un periodo de diez años, este predio consta de más de diez mil hectáreas de bosques, ubicada en la cuenca media-alta del río Itaya, la cual presenta diferentes estratos de suelos y cuerpos de aguas en los que habitan diversos microorganismos que necesitan ser estudiados, ya que muchos de estos podrían presentar enzimas claves para desarrollar plataformas biotecnológicas, que nos pueden servir como soporte para realizar futuras investigaciones, en beneficio de la población local y nacional.

Debido a esto, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la diversidad de las comunidades microbianas en los suelos y aguas del Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta río Itaya?, y como Objetivo general: Determinar la diversidad de las comunidades microbianas en los suelos y aguas del Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta río Itaya, y como Objetivos específicos; Evaluar las características fisicoquímicas de los suelos y aguas del Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta río Itaya y, Estimar la diversidad de las comunidades microbianas en los suelos y aguas del Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta río Itaya.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes.

Los resultados de diversos estudios científicos indican que aproximadamente la mitad de la biomasa de la tierra procede de microbios, estos microbios están determinados por las propiedades fisicoquímicas del suelo ⁽¹⁸⁾. Los microorganismos juegan un papel importante dentro de los ciclos biogeoquímicos, del suelo influyendo en la nutrición de las plantas, la estructura y fertilidad del suelo, sin embargo, se estima que solamente el 1% de estos microorganismos son cultivables ⁽¹⁹⁾, es decir, la gran mayoría aún no están descritas y por lo tanto no se puede acceder a la información genética y conocer sus potencialidades.

Desde los años noventa se viene desarrollando la metagenómica, una técnica totalmente independiente del cultivo ⁽²⁰⁾. Esta técnica puede describirse como el estudio de toda la comunidad microbiana y de los metabolitos, los cuales son aisladas directamente del medio natural. Al ser un método que no necesita del cultivo, nos ofrece una gran oportunidad para estudiar el ADN de todo un ecosistema. Solamente se necesita que el material genético presente buena cantidad y calidad, y con ella se pueden preparar las librerías y posteriormente secuenciarlas ⁽⁸⁾. Además, al secuenciar las regiones variables de genes bacterianos, altamente conservados, nos permite determinar la composición taxonómica de un microbioma. Al compararlos con las bases de datos existentes, se puede determinar a qué organismos pertenecen las secuencias, y evaluar el perfil y las proporciones bacterianas ⁽²¹⁾.

En este sentido, desde finales de la década de los noventa, cuando se comenzó a utilizar el término metagenómica, para denominar a los análisis estadísticos de metaanálisis y genómica ⁽²²⁾, esta técnica ha servido para múltiples investigaciones, desde la identificación de nuevos compuestos naturales o genes relacionados con la biocatálisis a partir de muestras ambientales, y basados en sus funciones ⁽²³⁾. Además de lograr el secuenciamiento completo de algunas especies bacterianas y de algunos organismos más complejos, llegando incluso a secuenciar el genoma humano completo ⁽²⁴⁾.

Por lo que; la metagenómica se ha convertido sin lugar a dudas en una herramienta valiosa para la identificación de especies, particularmente en los ecosistemas que presentan características únicas, como, por ejemplo; los bosques de arena blanca de la Amazonía peruana. En una investigación, Castro *et al.*,⁽²⁵⁾ realizaron análisis metagenómicos 16S, en donde evaluaron el perfil de la diversidad bacteriana a partir de muestras de suelos, encontrando que los filos más representativos fueron las actinobacterias, con un 21,21%, seguida de planctomicetos con un 16,61% y proteobacteria 11,01%, siendo estos tres los filos más abundantes.

Así mismo en 2015, como resultado de la secuenciación de metagenomas de comunidades microbianas de sitios antropogénicos de suelos oscuros de la Amazonía Brasileña, utilizando la secuenciación de Illumina-Miseq, se encontró un total de 3, 716, 966 secuencias directas, siendo los filos más abundantes Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Acidobacteria⁽²⁶⁾. En ese mismo año una investigación realizada en el bioma del cerrado en Brasil, utilizando secuenciación de 16S rRNA, para determinar la diversidad, obtuvieron como resultado que las arqueas en las gradientes de vegetación diferían en todos los tipos de suelos estudiados, logrando concluir que, los filos con mayor predominancia fueron; Crenarcheota, Nitrosphaerales, NRPJ y Euryarchaeota, incluidas las clases Metanocellales y Methanomassiliicoccaceae.

De igual forma, investigadores de Estados Unidos, Reino Unido y Brasil, recolectaron muestras de suelos intactos de tres tipos de uso de la tierra (bosque lluvioso primario, pastos y bosque lluvioso secundario) de dos áreas geográficamente distintas de la Amazonía brasileña (Santarém, Pará y Ariquemes, Rondônia) y realizaron sondeos de isótopos estables de ADN junto con metagenómica para identificar los metanótrofos y metanógenos activos, llegando a la conclusión que la conversión de bosque lluvioso en pastos estimula la metanogénesis del suelo en esos lugares⁽²⁷⁾. Además, en el 2018 Kroeger *et al.*⁽²⁸⁾; en la investigación denominada “Nuevos conocimientos biológicos sobre como la deforestación afecta a las comunidades microbianas del suelo en la Amazonía, utilizando análisis metagenómicos”, lograron ensamblar 28 metagenomas, abarcando 10 filos, entre ellos los más representativos fueron; acidobacterias,

Melainabacteria, Microgenomates y Parcubacteria, los cuales fueron encontradas en las muestras provenientes de áreas utilizados como pastos para ganado, mientras que el género *Candidatus Rokubacteria*, fue predominante en los suelos de la selva tropical adyacente.

Los análisis realizados en suelos rizosféricos asociados al cultivo de maní en Sudáfrica, utilizando la tecnología de secuenciación de Illumina-Miseq, de genes emparejados de 16S dio como resultado que las muestras del suelo a granel tenían el porcentaje de filos promedio más bajo, mientras que las muestras en la etapa de madurez de la semilla tenían el porcentaje de filos promedio más alto. La diversidad alfa en $p = 0,05$ fue el más alto en esta etapa en comparación con los otros y el control. *Rubrobacter* fue el género más predominante, después del cual se encuentran *Acidobacterium* y *Skermanella* ⁽²⁹⁾.

La metagenómica también viene siendo aplicada para identificar la valiosa información comparativa de los microeucariotas del suelo. Esta investigación arrojó 52 grupos no clasificados y 96 familias bacterianas que ya están registrados en el Gen Bank ⁽³⁰⁾.

Los análisis metagenómicos realizadas a partir de muestras de aguas, nos demuestra que esta técnica puede ayudarnos a dilucidar los ecosistemas únicos, como es el caso de una investigación llevada a cabo por el Laboratorio de micología y biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina, quienes colectaron muestras procedentes de aguas termales, los cuales presentaban temperaturas entre 45 a 90°C, logrando clasificar 58 géneros de bacterias y 2 géneros de Arqueas. También, mediante análisis metagenómicos, se descubrió que las Proteobacterias eran los filos más representados (88,06%), seguidos de Thermi (6,43%), Firmicutes (3,41%) y Aquificae (1,10%), respectivamente, Mientras que Crenarchaeota y Euryarchaeota fueron los únicos 2 filos de arqueas detectados con menor abundancia ⁽³¹⁾.

De igual forma, una investigación realizada en aguas prístinas del río Amazonas, en el cual los taxones microbianos encontrados fueron dominados claramente por el linaje cosmopolita de agua dulce de las actinobacterias, Crenarchaea y el grupo hermano de agua dulce del clado marino SAR11, LD12, estos se encontraron junto a taxones de agua dulce

más exclusivos y conocidos, como *Polynucleobacterk* ⁽³²⁾. Así mismo, cuando se analizaron la microbiota en la temporada de inundaciones de los lagos de la cuenca del Amazonas, utilizando secuenciación de próxima generación (NGS QC Toolkit_v2.3.3) de Roche, encontraron 95,2% de bacterias y 0,7% de arqueas, los filos con mayor frecuencia fueron Proteobacteria, Actinobacteria y Cyanobacteria, estimando una diversidad alfa de 13,5% ⁽³³⁾.

Además cuando se analizó por medio del amplicon del gen 16S rRNA la regulación del pulso de inundación de la composición de la comunidad de bacterioplancton en un lago de llanura aluvial amazónica ⁽³⁴⁾, encontraron diferencias significativas de la presencia de Actinobacterias y proteobacterias, durante la vaciante y creciente de los ríos. Caso similar fue lo encontrado por Câmara dos Reis *et al.* ⁽³⁵⁾, quienes al realizar análisis metagenómico de alto rendimiento (Illumina MiSeq), en el lago Curuai, el cual está conectado al río Amazonas y presenta una temperatura y pH promedio de 30°C y 7,5 respectivamente, evidenció que los filos más abundantes presentes en este cuerpo de agua son las Actinobacterias, Cianobacterias, Proteobacterias y Planctomicetos.

Así mismo, el proyecto denominado, “Avanzando en la evaluación metagenómica de la salud del suelo y la calidad del agua dulce, llevado a cabo en Canadá en año 2019”, tuvo por finalidad aplicar la metagenómica para caracterizar mejor la biodiversidad microbiana e invertebrada para avanzar en las actividades de evaluación, monitoreo y remediación ambiental, obteniendo como resultado el inicio de dieciséis proyectos de investigación bajo los temas Microbioma del suelo, Microbioma acuático y Zoobioma de invertebrados. Toda esta información obtenida, permitirá al gobierno de dicho país planificar una mejor gestión de los recursos suelo y agua principalmente ⁽³⁶⁾.

De igual forma, en el año 2019 investigadores de la Universidad de Offa en Nigeria, abordaron un proyecto denominado; Conocimientos metagenómicos sobre la diversidad y las funciones de los conjuntos microbianos en los lagos, con la finalidad de conocer la diversidad y las funciones de los conjuntos microbianos en los lagos de agua dulce. Comenzaron su investigación con la aplicación y revisión de diversas

técnicas de estudios, concluyendo que en varios estudios metagenómicos en lagos de agua dulce, se incluyen floraciones de algas, cianobacterias tóxicas, metagenómica viral, metagenómica procariota y genes resistentes a los antibióticos ⁽³⁷⁾.

1.2. Bases teóricas

Los microorganismos que habitan la tierra están formados por una variedad microscópica de miles de millones de bacterias, hongos, protozoos y virus, estos presentan múltiples tamaños y formas. No todos los microbios son perjudiciales para el hombre, muchos de ellos cumplen un rol importante en los procesos biogeoquímicos del planeta; proporcionando oxígeno a la biosfera, descomponiendo la materia orgánica, mineralizando los componentes para beneficio de los productores y reinsertándolo de nuevo al ciclo de la materia ⁽³⁸⁾.

A lo largo de la historia, los microorganismos siempre han sido considerados como fuente importante para la elaboración de productos de interés comercial, y recientemente se han convertido en materia prima para la biotecnología. Estos procesos normalmente se basaban en los principios activos de los microorganismos, los cuales son cultivados en los laboratorios utilizando medios de cultivo como fuente nutricional. Esta forma tradicional de cultivo, solamente permite utilizar aquellos microorganismos que ya fueron estudiados y analizados su comportamiento y nutrición, dejando de lado a todos aquellos microorganismos de los que no se tiene información ⁽²⁾.

En la búsqueda continua de técnicas alternativas que ayuden a identificar microorganismos sin ser cultivados, los científicos pasaron por varias etapas. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (RPC) y la electroforesis, para estudiar el gen 16S, fueron algunos de ellos. Pero la mejora de las técnicas de aislamiento, la extracción del material genético, descubrir la secuenciación y el ensamblado de las secuencias, han sido factores claves para encontrar alternativa: es decir, la metagenómica. Esta técnica permite analizar los metagenómas, estudiar el material genético de diversos microorganismos que están presentes en un determinado hábitat. En la última década, esta tecnología ha revolucionado el estudio de la diversidad

microbiana, la obtención de metabolitos y el entendimiento de la dinámica de poblaciones microbianas ⁽³⁹⁾.

Estas técnicas se han convertido en una herramienta poderosa, buscando nuevos antibióticos, enzimas, rutas metabólicas y cualquier otra característica de importancia biotecnológica. Todo comienza con seleccionar cuidadosamente la muestra ambiental, extraer el ADN, la preparación de bibliotecas y la selección de la tecnología de secuenciación. Estos análisis nos pueden revelar tanto la diversidad microbiana, como los genes que codifican enzimas de diversas vías metabólicas y proteínas de interés ⁽²²⁾.

Además, los genes encontrados pueden ser clonados y expresados para inducir la producción de los metabolitos y/o crear nuevas cepas de organismos con mayores capacidades para sintetizar biomoléculas activas ⁽²⁰⁾.

1.3. Definición de términos básicos

ADN: es el nombre químico de la molécula que contiene la información genética en todos los seres vivos. La molécula de ADN consiste en dos cadenas que se enrollan entre ellas para formar una estructura de doble hélice. Cada cadena tiene una parte central formada por azúcares (desoxirribosa) y grupos fosfato. Enganchado a cada azúcar hay una de las siguientes 4 bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G), y timina (T) ⁽⁴⁰⁾.

Agua: es la sustancia más abundante en la tierra y es la única que se encuentra en la atmósfera en estado líquido, sólido y gaseoso. Sus moléculas están formadas por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno, constituye el componente más abundante de la superficie terrestre y el mayoritario de todos los organismos vivos. La mayor reserva de agua está en los océanos, que contienen el 97% del agua que existe en la tierra, el 3 % restante está contenida en los ríos, lagos, etc. ⁽⁴¹⁾.

ARN: Es una molécula similar a la del ADN. Es de cadena sencilla, una hebra de ARN tiene un eje constituido por un azúcar (ribosa) y grupos de fosfato de forma alterna. Unidos a cada azúcar se encuentra una de las cuatro bases adenina (A), uracilo (U), citosina (C) o guanina (G). Hay

diferentes tipos de ARN en la célula: ARN mensajero (ARNm), ARN ribosomal (ARNr) y ARN de transferencia (ARNt). Más recientemente, se han encontrado algunos ARN de pequeño tamaño que están involucrados en la regulación de la expresión génica ⁽⁴²⁾.

Bacterias: Son microorganismos procariotas unicelulares, pertenecientes al grupo moneras y carecen en general de pigmento asimilador; se reproducen por bipartición, posee un solo cromosoma disperso por el protoplasma (carecen de membrana nuclear); en algunos casos, existe un pequeño fragmento adicional denominado plásmido. Se encuentran en casi todas las partes de la Tierra. Son vitales para los ecosistemas del planeta. Algunas especies pueden vivir en condiciones realmente extremas de temperatura y presión ⁽⁴³⁾.

Biodiversidad: Se refiere a la pluralidad de seres vivos, más precisamente microorganismos, plantas y animales, que interactúan entre sí. Se estima que la variedad de especies que habitan el planeta tierra supera los treinta millones ⁽⁴⁴⁾.

Bioinformática: Es una subdisciplina de la biología y las ciencias computacionales que se encarga de adquirir, almacenar, analizar y diseminar la información biológica, en gran parte correspondiente a las secuencias de ADN y aminoácidos. La Bioinformática utiliza programas informáticos que tienen muchas aplicaciones, como por ejemplo: determinar las funciones de genes y proteínas, establecer relaciones evolutivas y predecir la conformación tridimensional de las proteínas ⁽⁴⁵⁾.

Biotecnología: Se refiere a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos ⁽⁴⁶⁾.

Comunidades microbianas: Son asociaciones microbianas naturales de dos o más especies que actúan como una comunidad, beneficiándose cada uno de ellos de la actividad de los demás. Es decir, se trata de sistemas naturales en los que microorganismos de distintas especies, a menudo de

distintos géneros, coexisten espacialmente y cooperan, posibilitando así la supervivencia de todos ellos ⁽⁴⁷⁾.

Concesión: Otorgamiento del derecho de explotación, por un período determinado, de bienes y servicios por parte de una Administración pública o empresa a otra, generalmente privada ⁽⁴⁸⁾.

Librerías genómicas: O también llamados genotecas, es una colección de fragmentos de ADN de un organismo, cada uno portado por un plásmido o un virus y clonado en un huésped adecuado. Para escrutar una genoteca de ADN y localizar una secuencia específica se utiliza una sonda de ADN ⁽⁴⁹⁾.

Metagenómica: Es la obtención de secuencias del genoma de los diferentes microorganismos, que componen una comunidad, extrayendo y analizando su ADN de forma global. Permite acceder al genoma sin ver a los microorganismos ni cultivarlos ⁽⁵⁰⁾.

Microorganismos: Organismo vivo unicelular, animal o vegetal, sumamente pequeño, invisible a simple vista. Son microorganismos las bacterias, algunos hongos, los protozoos y (en alguna clasificación) los virus ⁽⁵¹⁾.

Secuenciación de ADN: Es una técnica de laboratorio utilizada para determinar la secuencia exacta de las bases (A, C, G y T), en una molécula de ADN. La secuencia de bases de ADN lleva la información que una célula necesita para ensamblar proteínas y moléculas de ARN. La información de la secuencia de ADN es importante para los científicos que investigan las funciones de los genes ⁽⁵²⁾.

Suelo: Material no consolidado compuesto por partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire y organismos, que comprende desde la capa superior de la superficie terrestre hasta diferentes niveles de profundidad ⁽⁵³⁾.

CAPÍTULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS

2.1. Variables y su operacionalización.

Variables	Operacionalización	Indicadores	Índice
X ₁ Diversidad de las comunidades microbianas	Número de especies microbianas identificadas mediante el análisis metagenómico.	Especies bacterianas identificadas	Diversidad microbiana alfa de las secuencias obtenidas: 100 a 500 especies
Y ₁ Características fisicoquímicas de los suelos y aguas	Análisis fisicoquímicos de los suelos y aguas.	<p>Características físicas:</p> <p>Textura, Conductividad eléctrica, Temperatura</p> <p>Características químicas:</p> <p>pH Sólidos Totales Disueltos Nitrato (NO₃) Amonio (NH₄) Materia orgánica Fosforo (P) Potasio (K)</p>	<p>Franco, limo, arcilloso</p> <p>0 a 5 dS/m 15 – 25 °C</p> <p>4 a 7</p> <p>5 – 25 ppm 0 – 10 ppm 0 – 10 ppm 0 – 10 % 0 – 10 ppm 50 – 200 ppm</p>

2.2. Formulación de la hipótesis

Hipótesis general

La diversidad de las comunidades microbianas es variable y está relacionada con las características fisicoquímicas de los suelos y aguas del Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta río Itaya

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de la investigación

La investigación se desarrolló mediante el enfoque de la investigación cuantitativa, del tipo analítico.

El diseño de la investigación corresponde a un diseño experimental, el cual consistió en la recolección de muestras mixtas de suelos y aguas, procedentes de los diferentes tipos de bosques y cuerpos de agua del Área de Concesión para la Conservación, Cuenca Alta río Itaya.

3.2. Población y muestra

La población estuvo constituida por todas las comunidades microbianas presentes en los suelos y aguas del Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta Río Itaya.

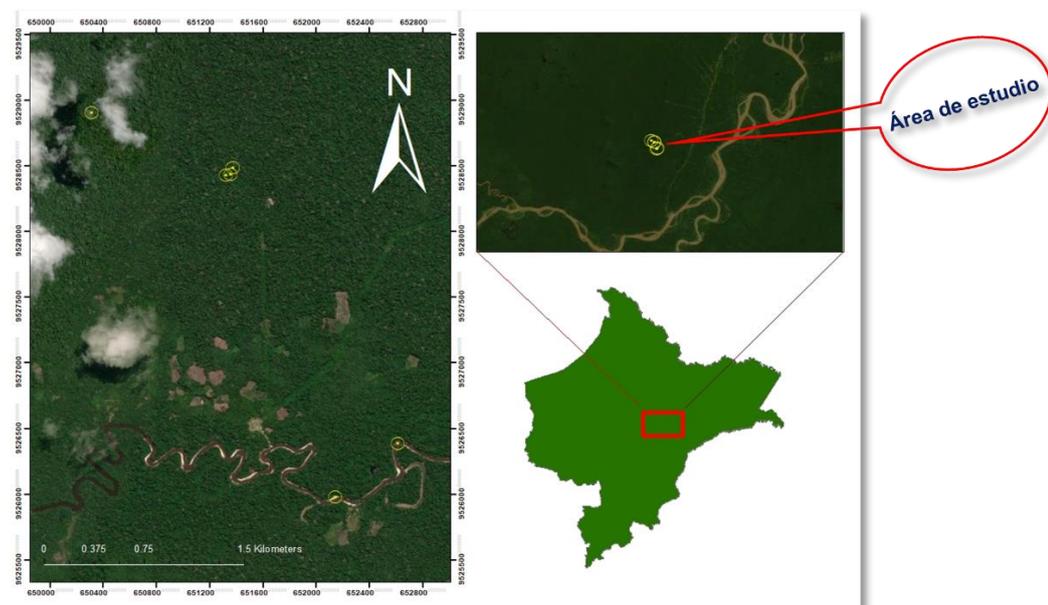


Figura 1. Mapa de ubicación del Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta Río Itaya, donde se ubican los puntos de colecta.

La muestra estuvo constituida por 1,5 kg de suelo y una muestra mixta de aguas (1,5 L) provenientes del CCCARI.

El principal criterio de selección para las muestras de suelo, fue la clase textural (limoso, franco limoso, franco arenoso, arcilloso, limo arcilloso, etc.), topografía y relieve (Ver anexos). Para las muestras de agua; los

puntos de muestreo se realizaron en diferentes cuerpos de agua: río Itaya, cochas y quebradas.

Las unidades de análisis fueron: las muestras representativas de suelos y cuerpos de agua, el ADN metagenómico íntegro, librerías de ADN limpias y el secuenciamiento de alta calidad.

Se realizó el muestreo por conveniencia, de acuerdo a los criterios de la investigación.

3.3. Técnicas e instrumentos

Para el cumplimiento de los objetivos de la investigación se estableció las técnicas para la colecta, purificación de ADN y Secuenciamiento de las muestras:

Los instrumentos que se utilizaron fueron los siguientes:

- a) Ficha de registro datos de campo (Ver Anexo)
- b) Ficha de evaluación de muestras en el Laboratorio (Ver Anexo)

Los equipos que se utilizaron, fueron los siguientes.

- Bomba de presión y Vacío Millipore, Merck, K48ZZFFD378 a 30 In Hg), para el filtrado de las muestras de agua.
- Centrífuga Thermo Scientific, Thermo Micro CL21R), para la centrifugación de las muestras.
- Espectrofotómetro UV/Vis (Thermo Scientific, NanoDrop 2000. Para cuantificar las absorbancias del ADN metagenómico.
- Fluorómetro Qubit TM (Thermo Fisher Scientific, dsDNA HS Assay Kit). Para cuantificar la cantidad y calidad del ADN.
- Termociclador (Eppendorf Mastercycler Nexus gradient). Para la amplificación del ADN.
- Secuenciador masivo (Illumina NextSeqTM 550), se utilizó para realizar el secuenciamiento masivo de las muestras.

3.4. Procedimientos de recolección de datos

La investigación se desarrolló de la siguiente manera:

3.4.1. Obtención de muestras de suelo

Para la obtención de una muestra representativa de la diversidad microbiana del suelo, se realizó un orificio en el suelo de 10 cm de diámetro y de profundidad de cada estrato de bosque (Cima, ladera y valle), y se realizó de la siguiente manera: el primer punto de muestreo fue designado como el punto principal de donde se tomó las coordenadas geográficas. Los puntos de colecta restantes se muestrearon a intervalos de 5 metros en cada dirección cardinal, obteniendo 3 puntos de muestreo de cada dirección (Ver anexo). Se unieron las 15 muestras de cada punto de referencia y se homogenizó en una sola muestra de suelo de cada estrato de bosque y se pasaron por un tamiz de malla de 2 mm. Las muestras de suelos tamizadas se conservaron temporalmente a -20 °C y se realizó la purificación del ADN metagenómico.

3.4.2. Obtención de muestras de agua

Las muestras de agua se colectaron utilizando galones de plástico estériles con filtros acoplados de 20 µm para atrapar la carga particulada de mayor tamaño. Se recogió 5 litros de agua de los tres puntos de muestreos seleccionados (quebrada, cocha y río) (Ver anexo). Seguidamente se montó el sistema de filtración (Bomba de presión y vacío Merck Millipore, K48ZZFFD3780 a 30 In Hg), en el cual se colocó filtros de 11 µm-47 mm de policarbonato y se dejó pasar 300 mL de la muestra de agua homogenizada de cada punto de muestreo. Se repitió este proceso con filtros de 5 y 3 µm, con la finalidad de remover microalgas y material particulado. Con la ayuda de una pinza estéril se puso un filtro de 0,22 µm (Millipore, Durapore PVDF Membrane). Se filtró la muestra de agua y el filtro, el cual contenía las células bacterianas, se transfirió a una placa petri estéril y se añadió 3 mL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8) y con la ayuda de una pipeta, se lavó el filtro para remover las bacterias atrapadas. Posteriormente, el filtro se seccionó en cuatro partes y transfirió a un tubo falcon estéril y resuspendió con tampón TE. Se homogenizó en vortex a máxima velocidad por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a microtubos de 2 mL para ser centrifugados a 21 000 xg por 5 min (Centrifuga Thermo Scientific, Thermo Micro CL21R). Se descartó el

sobrenadante y al precipitado se sometió a varios lavados, para la eliminación de ácidos húmicos.

3.4.3. Análisis fisicoquímico del suelo

Los análisis fisicoquímicos del suelo, como el: pH, Materia Orgánica, Fosforo, Potasio, Carbonatos, Capacidad de Intercambio Catiónico, Textura, Conductividad Eléctrica, Microelementos solubles (Fe, Cu, Zn, Mn) y elementos pesados Solubles (Pb, Cd, Cr); fueron analizados en el Laboratorio de Agua, Suelo, Medio Ambiente y Fertilización del Departamento de Recursos Hídricos de la Facultad de Ingeniería Agrícola de la Universidad Nacional Agraria la Molina ⁽⁵⁴⁾.

3.4.4. Análisis fisicoquímico del agua

Las propiedades fisicoquímicas de las muestras de agua, tales como: el pH y temperatura, fueron medidos en un potenciómetro (Hanna Instruments, HI2210-01), Hierro total, Nitrógeno amoniacal, hierro ferroso, nitritos, alcalinidad, Conductividad eléctrica, potencial de Oxido reducción, y salinidad fueron medidos utilizando kits de medición (LaMotte Company, Inc.; Industrial Test System, eXact iDip).

3.4.5. Purificación de ADN metagenómico

Para la purificación del ADN metagenómico de las muestras de suelo y agua, primero se eliminaron los ácidos húmicos mediante lavados. Para ello, el precipitado bacteriano se resuspendió con 1,5 mL de tampón TE, se centrifugó a 12 000 x g por 3 minutos y descartó el sobrenadante. El proceso de lavado se continuó con dos tampones (TL1 [Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 200 mM, Fosfato de Sodio 50 mM, PVP-40 1 %, Tritón X-100 0,2 %] y TL2 [Tris-Hcl 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 200 mM, Triton X-100 0,05 %] y un lavado final con TE.

Después de obtener las células bacterianas sin ácidos húmicos, se purificó el ADN metagenómico utilizando el DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante ⁽⁵⁵⁾.

La calidad y cantidad del ADN metagenómico purificado fue determinado mediante espectrofotometría con un espectrofotómetro UV/Vis (Thermo

Scientific, NanoDrop 2000) y fluorimetría con el Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) empleando un fluorómetro Qubit 4 (Invitrogen). El análisis electroforético, se realizó en un gel de agarosa al 1 % y se corrió a 100 V por 30 min en un equipo de electroforesis horizontal. Para corroborar la calidad del ADN metagenómico purificado, este fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) de una región perteneciente a los genes ribosomales 16S (ADNr). La reacción se realizó empleando el Platinum PCR Super Mix (Invitrogen), los cebadores degenerados 515F (5'-TGTGNCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 926R (5'-CCGTCAATTCMTTRAGT-3'), bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial a 95,0°C x 5 min, 35 ciclos a 95,0°C x 40 s, 55,0°C x 40 s y 72,0°C x 1 min y una extensión final a 72,0°C x 7 min que fueron programadas en un Termociclador (Eppendorf Mastercycler Nexus gradient) (Ver anexos).

3.4.6. Preparación de librerías y secuenciación masiva

A partir del ADN metagenómico obtenido de las muestras mixtas de suelo y agua se procedió a preparar las dos librerías empleando el Nextera™ DNA CD indexes (Illumina) y Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) en base a las indicaciones del fabricante. Luego, las librerías obtenidas se cuantificaron usando el Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) con un fluorómetro Qubit 4 (Invitrogen). Posteriormente, las librerías se normalizaron y mezclaron para su secuenciación masiva de extremos emparejados con el NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (300 Ciclos) y empleando como plataforma de secuenciación el NextSeq™ 550 de Illumina.

3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Los datos de los análisis físicoquímicos fueron almacenados en Microsoft Excel y exportados al programa SPSS v25⁽⁵⁶⁾, para los análisis estadísticos básicos. Entre los análisis realizados tenemos, la Prueba de Kolmogorov-Smirnov^(57,58) para determinar si los datos tienen una distribución normal y posteriormente se determinaron el promedio y la desviación estándar.

Los datos de secuenciación crudas emparejadas se cargaron como archivos FASTQ y se analizaron utilizando el servidor MG-RAST v4.0.3 ⁽⁵⁹⁾. Las lecturas obtenidas tras el control de calidad se sometieron a un análisis taxonómico mediante la comparación con diferentes bases de datos de ARN ribosómico utilizando la estrategia de selección de unidades taxonómicas operativas (OTU). Las OTU se clasificaron utilizando la base de datos de referencia Greengene 13_8 16S ⁽⁶⁰⁾. Las asignaciones taxonómicas se hicieron a cada OTU utilizando el clasificador RDP ⁽⁶¹⁾, y Silvangs ⁽⁶²⁾. Por último, la cobertura de la secuencia mediante el análisis de rarefacción y la diversidad alfa de las especies se produjo mediante el pipeline MG-RAST ⁽⁵⁹⁾. Las vías metabólicas microbianas se determinaron a partir de los datos del gen 16S rDNA utilizando el software Parallel-Meta3 v 3.5.3. ⁽⁶³⁾.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Características fisicoquímicas de los suelos y aguas del CCCARI

4.1.1. Suelos

De acuerdo a los análisis realizados, los resultados obtenidos nos muestran que los suelos del CCCARI, tienden a clasificarse como suelos extremadamente ácidos. Según los porcentajes de clasificación de arena, limo y arcilla, está dentro de la clase textural de suelo Franco.

Tabla 01: Análisis de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelos colectadas del CCCARI. Las tres muestras de suelos están representadas por las claves S1al S3.

Parámetros	Unidad de medida	S1	S2	S3	Promedio	Desviación Estándar	
Conductividad Eléctrica (Relación 1:1)	(dS/m)	0,12	0,10	0,12	0,11	0,01	
Análisis mecánico	Arena (%)	48,24	49,24	49,24	48,9	0,58	
	Limo (%)	31,28	40,28	38,28	34,78	4,95	
	Arcilla (%)	20,48	10,48	12,48	14,48	5,29	
	Textura	-	Franco	Franco	Franco	-	-
pH (Relación 1:1)	-	4,05	4,26	4,18	4,16	0,11	
Materia Orgánica (MO)	(%)	2,82	2,23	2,36	2,47	0,31	
Fósforo (P)	ppm	1,15	1,61	1,98	1,58	0,42	
Potasio (K)	ppm	100,40	77,40	88,20	88,67	11,51	
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	(%)	-	-	-	-	-	
Cambiables	CIC	19,45	18,26	6,49	14,73	7,16	
	Calcio (Ca ⁺⁺)	0,80	1,30	1,55	1,22	0,38	
	Magnesio (Mg ⁺⁺)	(Cmol (+) / Kg)	0,20	0,38	0,35	0,31	0,10
	Sodio (Na ⁺)	0,26	0,07	0,06	0,13	0,11	
	Potasio (K ⁺)	0,20	0,07	0,08	0,12	0,07	
	Al ⁺³ +H ⁺¹	18,00	16,45	4,45	12,97	7,42	
Microelementos solubles	Hierro (Fe)	246,30	235,40	229,70	237,13	8,43	
	Cobre (Cu)	0,88	0,74	0,85	0,82	0,07	
	Zinc (Zn)	2,56	2,03	2,28	2,29	0,27	
	Manganeso (Mn)	35,45	24,03	50,53	36,67	13,29	
Elementos pesados solubles	Plomo (pb)	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	
	Cadmio (Cd)	ppm	<0,012	<0,012	<0,012	<0,012	
	Cromo (Cr)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	

El porcentaje de materia orgánica disponible en las muestras de suelo, fue > a 2, el cual nos indica que es de fertilidad media, y la cantidad de fosforo y potasio que es de fertilidad baja.

4.1.2. Aguas

Los resultados del análisis fisicoquímico de las muestras de aguas, nos indican que el pH, tiende a ser ligeramente ácido.

Tabla 02: Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua colectadas del CCCARI. Las tres muestras están representadas por las claves A1 al A3. Los datos fueron medidos utilizando el Kit LaMotte y Test System.

Parámetros	Unidad de medida	A1	A2	A3	Promedio	Desviación Estándar
pH		6,5	6,0	6,0	6,17	0,29
Oxígeno (O ₂)	ppm	5,6	6,8	6,4	6,27	0,61
Temperatura (T)	°C	25	26	26	25,67	0,58
Sólidos Totales Disueltos (STD)	ppm	18,7	8,2	7,4	11,43	6,31
Alcalinidad (Alc.)	ppm	12	52	8	24,00	24,33
Conductividad eléctrica (CE)	µS	26,3	11,3	10,7	16,10	8,84
Hierro ferroso (Fe ⁺²)	ppm	0,5	0,5	0,5	0,50	0
Nitrato (NO ₃)	ppm	1	1	1	1,00	0
Amonio (NH ₄)	ppm	0,05	0,05	0,05	0,05	8,5E-18

La cantidad de Sólidos totales Disueltos no superó en promedio el 12 %. Así mismo la cantidad de Hierro, nitrato y amonio, presentaron niveles de concentración mínimos.

4.2. Diversidad de las comunidades microbianas de los suelos del CCCARI

Para lograr la estimación de la diversidad microbiana de los suelos y aguas del CCCARI, el primer paso fue purificar el ADN metagenómico, logrando obtener valores aceptables de cantidad, calidad e integridad del material genético para preparar las librerías y ser secuenciadas (Ver Anexo).

Con la secuenciación masiva de las muestras de suelo, obtuvimos 12 344 131 534 pb de secuencias, con una longitud promedio de 150 ± 7 pb de secuencias. A nivel de dominios (Figura 2), los resultados nos señalan que más del 98% de las secuencias obtenidas correspondieron a bacterias y el resto de secuencias pertenecieron a otros tipos de microorganismos (Arqueas, Eucariotas, etc).

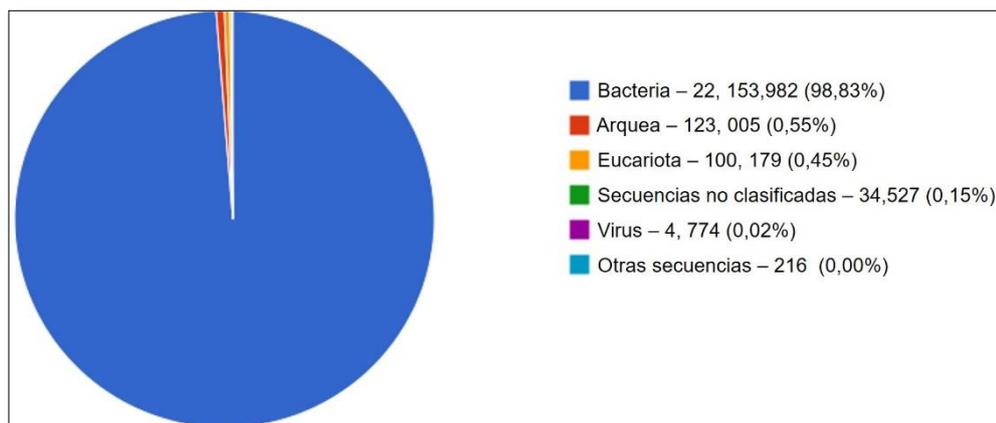


Figura 2. Dominios de microorganismos identificados en las muestras de suelo del CCCARI por secuenciación masiva.

Con respecto a los filos (Figura 3), las proteobacterias fueron las más abundantes (>53%), seguido por Acidobacteria (15%) y Planctomicetos (6,63%). Es preciso indicar que las proteobacterias son Gram negativas y morfológicamente pueden ser cocos o bacilos.

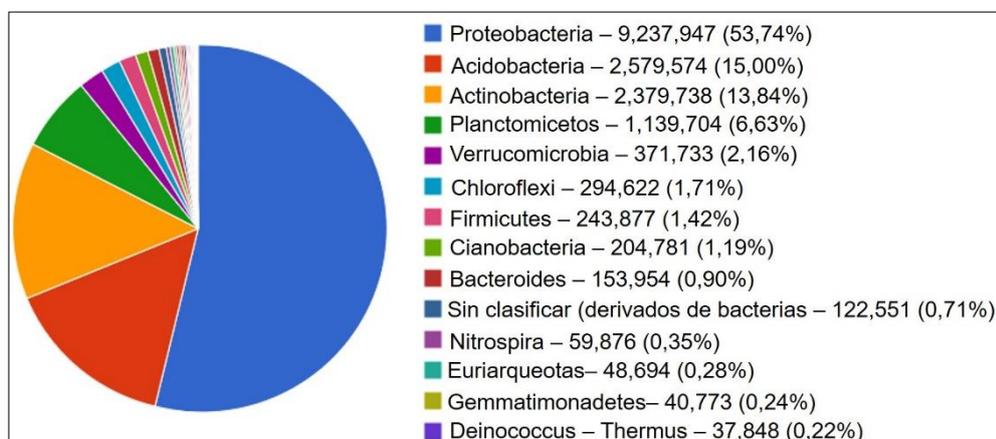


Figura 3. Filos de microorganismos identificados en las muestras de suelo del CCCARI por secuenciación masiva.

Con respecto a los géneros (Figura 4), el género *Candidatus solibacter* representó el 13,47%, seguidos por *Mycobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Candidatus koribacter*, entre otros.

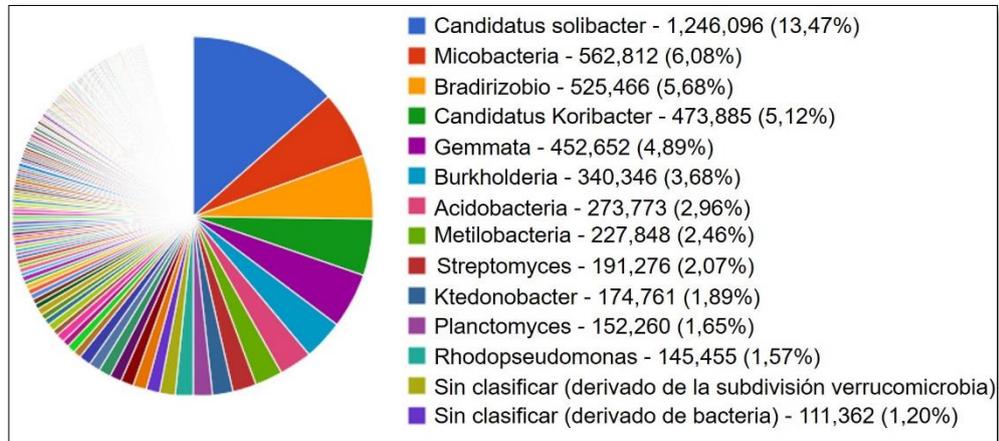


Figura 4. Géneros de microorganismos identificados en las muestras de suelo del CCCARI por secuenciación masiva.

El análisis de rarefacción nos muestra que la secuenciación tuvo la suficiente profundidad, permitiéndonos así detectar la mayor cantidad de especies presentes en la muestra de suelo (Figura 5). Asimismo, el análisis de diversidad alfa nos indica que este fue de 406 especies.

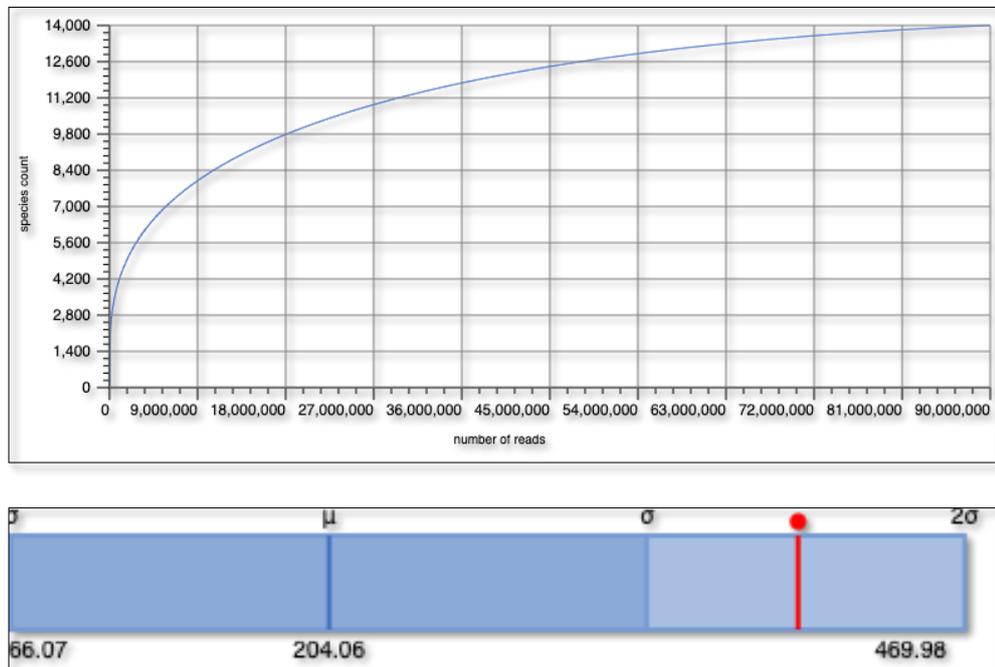


Figura 5. Análisis de rarefacción y Diversidad microbiana alfa de la muestra de suelo obtenido por secuenciación masiva.

4.3. Diversidad de las comunidades microbianas de las aguas del CCCARI.

Los resultados de la secuenciación masiva nos dieron como resultados 9 432 726 661 pb de secuencias, los cuales presentaron una longitud promedio de 149 ± 8 pb.

Las bacterias fueron los microorganismos con mayor abundancia en las muestras de agua (Figura 6), representando más del 98% de las secuencias obtenidas. El 1% restante pertenecieron a otros tipos de microorganismos (Eucariotas, Arqueas, Virus, etc).

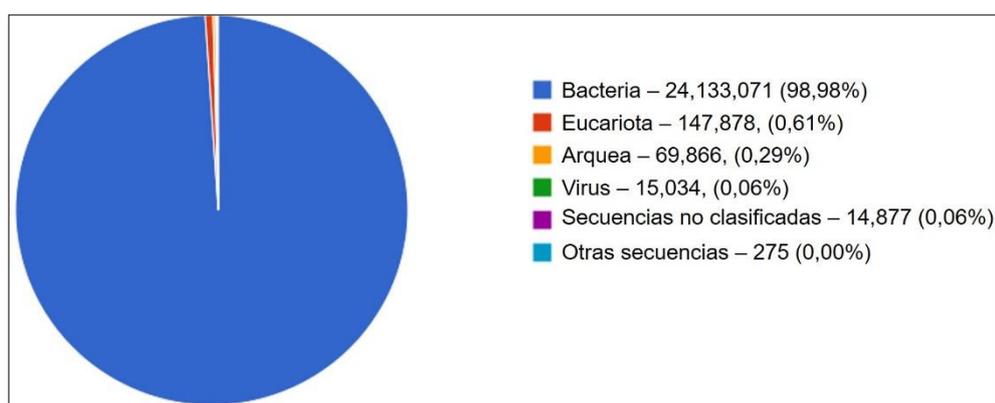


Figura 6. Dominios de microorganismos identificados en las muestras de agua del CCCARI por secuenciación masiva.

Los filos con mayor abundancia (Figura 7), fueron las proteobacterias (>77%), seguido por las actinobacterias (11,23%), bacteroidetes (3,83%), Firmicutes (1,32%), etc. Cabe señalar que las proteobacterias juegan un papel importante en la fijación de nitrógeno y oxidación de amonio para producir, productos químicos importantes en el desarrollo de las plantas.

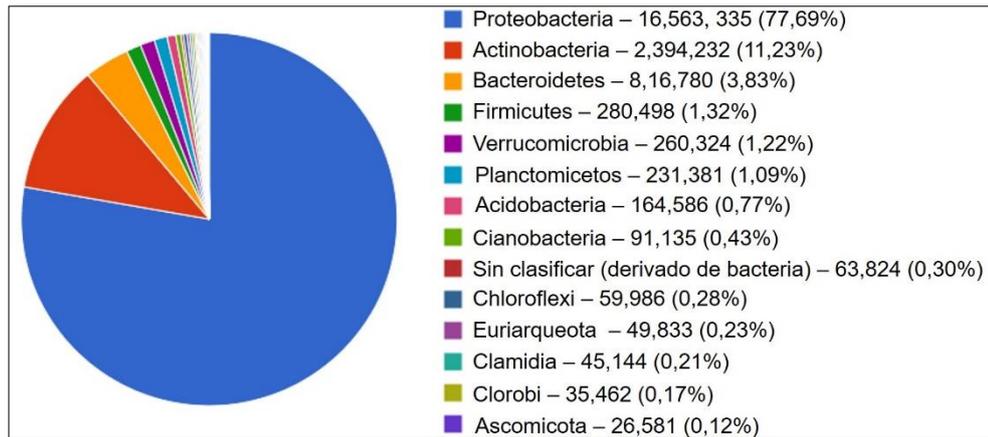


Figura 7. Filos de microorganismos identificados en las muestras de agua del CCCARI por secuenciación masiva.

En el caso de los géneros (figura 8), los que presentaron mayor dominancia fueron *Polynucleobacter* (>14%), *Acinetobacter*, *Methylocystis*, etc.

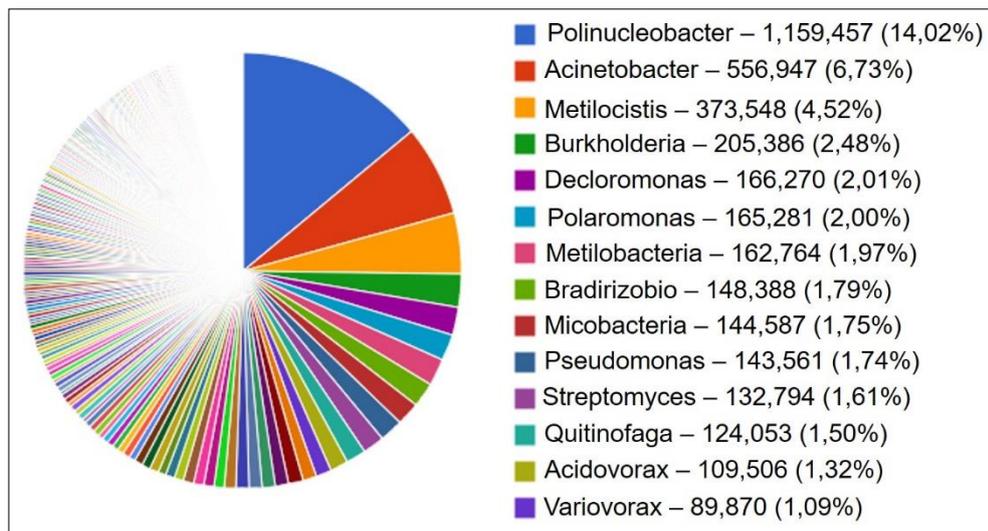


Figura 8. Géneros de microorganismos identificados en las muestras de agua del CCCARI por secuenciación masiva.

Los análisis de rarefacción, tuvieron una profundidad muy buena, el cual nos indicó que la secuenciación fue correcta permitiéndonos detectar la mayor cantidad posible de especies presentes en la muestra de agua (Figura 9). El análisis de la diversidad alfa fue de 470 especies.

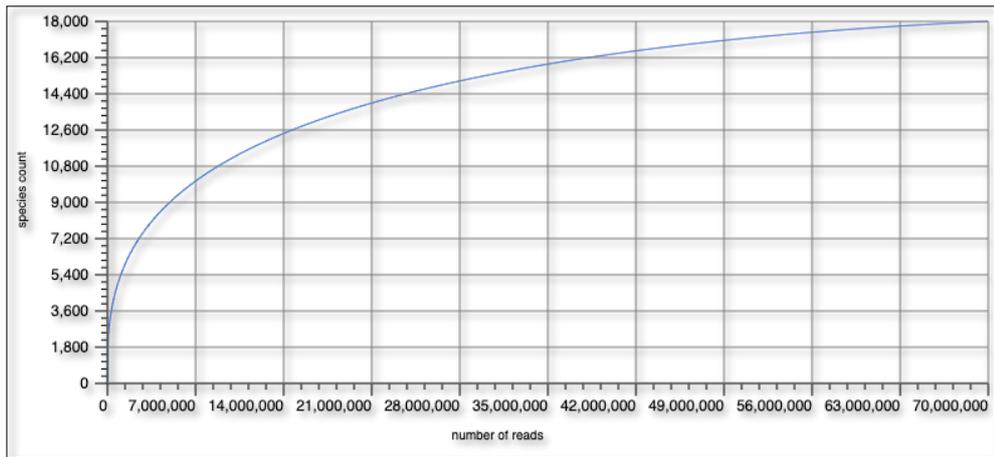


Figura 9. Análisis de rarefacción y Diversidad microbiana alfa de la muestra de agua obtenido por secuenciación masiva.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La diversidad biológica del planeta está constituida aproximadamente por dos tercios de microorganismos, casi todos los procesos que ocurren en el mundo vivo, está relacionado con algún tipo de microbio. Así mismo, en la actualidad la biotecnología utiliza microorganismos en diferentes procesos, como por ejemplo; La mejora de la producción agrícola, la seguridad alimentaria, elaboración de productos farmacéuticos y la biorremediación de contaminantes del suelo y agua ⁽⁶⁴⁾. Debido a esto, la metagenómica, hoy en día sin lugar a dudas se ha convertido en una herramienta muy importante para el estudio e identificación de microorganismos, sin importar si estos estén aislados o no, solamente conociendo sus potencialidades, se pueden aprovechar para desarrollar plataformas biotecnológicas.

5.1. Características fisicoquímicas de los suelos y aguas del CCARI

En esta investigación, los resultados evidenciaron que las características fisicoquímicas de los suelos y aguas, tienen relación con la diversidad de microorganismos. Uno de los factores más influyentes es el pH, con respecto a los factores abióticos, en la disponibilidad de nutrientes y solubilidad de los metales alcalinotérreos tales como magnesio, calcio, bario, etc. y lo más relevante es que la disponibilidad de estos metales influye, en mayor o menor medida, la existencia de diversos microorganismos como bacterias y hongos ⁽¹⁸⁾. El resultado obtenido es similar a lo reportado por Kroeger *et al* ⁽²⁸⁾., quien encontró valores de pH de 4,40 cuando analizaron con metagenómica, las comunidades microbianas de los suelos de la Amazonía Brasileña afectados por la deforestación.

En nuestra investigación, las muestras de agua tuvieron un pH promedio de 6,17, de oxígeno disuelto de 6,27 ppm y la temperatura fue de 25,7°C respectivamente. Este resultado concuerda por lo obtenido por Ghai *et al.* ⁽³²⁾, quienes analizaron tres tipos de aguas en la cuenca amazónica (aguas claras, aguas blancas y aguas negras) y registran un pH promedio de 7,09, oxígeno disuelto de 5,05 ppm y una temperatura de 29,8°C. Asimismo, nuestros resultados son similares a lo reportado por Melo *et al.* ⁽³⁴⁾, cuando

evaluaron el efecto del pulso de inundación en las comunidades bacterianas de un lago de llanura aluvial amazónica, el pH fue de 6,12 a 7,28, la temperatura osciló de 28,6 a 32,6 °C.

Sin embargo, nuestros resultados muestran diferencias con lo publicado por Câmara dos Reis *et al.* ⁽³⁵⁾, quienes al evaluar un lago conectado al Amazonas en Brasil, encontraron valores de los parámetros fisicoquímicos ligeramente más altos, en el cual el pH fluctuó de 7,3 a 8,6, el oxígeno de 4,6 a 7,6 ppm y la temperatura fluctuó de 29,8°C a 31,3°C.

5.2. Diversidad de las comunidades microbianas en los suelos del CCCARI

Los resultados de estimación de la diversidad de las comunidades microbianas presentes en los suelos, nos muestran predominancia de las bacterias, siendo los filos de proteobacterias, acidobacterias y actinobacterias las más representativas. Con respecto a los géneros, el que presentó mayor dominancia fue *Candidatus Solibacter*, *Mycobacterium* y *Bradirizobio* (Figuras 2 a 4). Estos resultados son similares a los reportados por Castro *et al.* ⁽²⁵⁾, quienes reportaron que los dominios más representativos también fueron las Bacterias (98,4%) y las Arqueas (0,26%). Mientras que, a nivel de filos, existen diferencias respecto a la cantidad de Proteobacterias encontradas (11,01%), siendo superadas por las Actinobacterias (21,21%) y Planctomicetos (16,61%). Estos resultados los obtuvieron analizando el perfil de la diversidad bacteriana en los suelos arenosos de la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana en Loreto, para lo cual utilizaron bibliotecas metagenómicas de rDNA 16S y la plataforma MiqSeq de Illumina, para el secuenciamiento.

De igual manera, los resultados obtenidos de los análisis realizados a los suelos antropogénicos oscuros de la Amazonía brasileña, utilizando secuenciación de Miseq-Illumina, encontraron que, los filos con mayor predominancia, fueron las proteobacterias, Actinobacterias, Firmicutes y Acidobacterias ⁽²⁶⁾. Además, Kroeger *et al.* ⁽²⁸⁾, analizando como la deforestación afecta las comunidades microbianas del suelo mediante análisis metagenómicos, identificó 10 filos bacterianos, entre ellos los más

representativos fueron acidobacteria, Melainabacteria, Microgenomates y Parcubacteria.

5.2. Diversidad de las comunidades microbianas en las aguas del CCCARI

Los resultados del secuenciamiento de las muestras de agua, nos dieron como resultado una longitud media de secuencias de 149 ± 8 pb, en el cual a nivel de dominio las Bacterias representaron más del 98%, seguido por Eucariotas y Arqueas, en cuanto a los filos las proteobacterias representaron el 78%, seguido de las actinobacterias (11%). Estos resultados son idénticos a los filos reportados por Paul *et al.* ⁽³¹⁾, quienes al realizar secuenciamiento de las regiones hipervariables V3-V4 rRNA 16S, utilizando la plataforma HiSeq de Illumina, utilizando muestras de aguas procedentes de un manantial geotérmico en la Amazonía registraron un 88,6% de Proteobacterias en sus muestras, seguidos de Thermi (6,43%) y Firmicutes (3,41%).

De igual forma se corrobora la presencia de actinobacterias y proteobacterias, en diferentes investigaciones realizadas en lagos amazónicos, por ejemplo: las aguas del curso superior prístino del río Amazonas, en el cual los taxones microbianos encontrados fueron las actinobacterias (47%), proteobacterias y betaproteobacterias ⁽³²⁾. Así mismo cuando se analizaron la microbiota en la temporada de inundación de los lagos de la cuenca Amazónica, utilizando tecnología de la compañía Roche (NGS QC Toolkit_v2.3.3), de próxima generación, encontraron un 92.5% de bacterias, siendo los filos más representativos las proteobacterias y actinobacterias ⁽³³⁾. Además, en el estudio realizado el bacterioplancton en un lago de llanura aluvial, se reportó diferencias significativas para la presencia de actinobacterias y proteobacterias ⁽³⁴⁾.

CAPÍTULO VI: PROPUESTA

Los análisis metagenómicos obtenidos por secuenciación masiva, se han convertido en una herramienta valiosa para el estudio de las comunidades bacterianas presentes en las muestras de aguas y suelos. El Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta Río Itaya, es una zona que encierra recursos de flora, fauna y microfauna, los cuales son muy atractivos para la conservación, además presenta características propias en el suelo y en las aguas. En los suelos, debido a que presenta diferentes estratos de bosques con colinas bien definidas, creando condiciones ambientales favorables para el desarrollo de microorganismos y las aguas porque, está enmarcada en la regulación del recurso hídrico, además es parte de la cabecera de cuenca del río Itaya.

Con los resultados obtenidos en nuestra investigación, se propone reconstruir las vías metabólicas a partir de las secuencias bacterianas obtenidas en los metagenomas de suelo y aguas. Con las secuencias ensambladas, se pueden anotar los genomas con la finalidad de ser utilizados en la producción de nutraceuticos, prevención y diagnóstico de enfermedades, biorremediación de suelos y aguas contaminadas, etc.

Por ejemplo, una de las vías metabólicas que se logró reconstruir y que estuvo presente tanto en los metagenomas de suelos y aguas, es la del ascorbato y el aldarato, la cual esta involucrado en la Biosíntesis y degradación de Vitamina C, (Ver anexos). En base a esta información obtenida se pueden desarrollar procesos biotecnológicos para la producción de la mencionada vitamina.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

- Las propiedades fisicoquímicas de los suelos del Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta río Itaya son típicos de bosques húmedos tropicales, caracterizado por ser de la clase textural de suelo franco, con pH extremadamente ácido y contenido de materia orgánica media. Asimismo, las propiedades fisicoquímicas de las muestras de agua del área de estudio corresponden al tipo de aguas negras con pH ácido.
- La diversidad de las comunidades microbianas en los suelos del Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta río Itaya fue alta (diversidad alfa = 406 especies) con predominancia de bacterias (>98%).
- La diversidad de las comunidades microbianas en las aguas del Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta río Itaya fue alta (diversidad alfa = 470 especies) con predominancia de bacterias (>98%).

CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES

- Se sugiere contar con una mayor cantidad de muestras y puntos de colecta, con la finalidad de comparar los resultados del secuenciamiento realizado.
- Para la colecta de muestras de agua procedentes de quebradas, se recomienda que el volumen colectado sea mayor a 10 litros, debido a que la cantidad de ADN metagenómico que se obtiene es mínima, lo cual dificulta la amplificación del material genético.
- Realizar el monitoreo continuo de las aguas y afluentes del río Itaya, utilizando análisis metagenómico, con la finalidad de contar con los registros de la diversidad bacteriana existente durante las épocas de vaciante y creciente de este importante río Amazónico.

CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Whitman WB. Genomic Encyclopedia of Bacterial and Archaeal Type Strains, Phase III: the genomes of soil and plant-associated and newly described type strains. 2015;6.
2. Dumorné K, Córdova DC, Astorga-Eló M, Renganathan P. Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(4):649-59.
3. Dhakar K, Pandey A. Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* marzo de 2016;100(6):2499-510.
4. Singh J, Vyas A, Wang S, Prasad R, editores. *Microbial Biotechnology: Basic Research and Applications.* Singapore: Springer Singapore; 2020. (Environmental and Microbial Biotechnology).
5. Perú es uno de los países con mayor biodiversidad del mundo. Disponible en: <https://www.peru.travel/en/news/peru-is-one-of-the-most-biodiverse-countries-in-the-world>
6. Teixeira TF, Melo MRS. A new species of *Characidium* Reinhardt (Characiformes: Crenuchidae) from the Río Huallaga, central Peruvian Amazon, with a review of secondary sexual characters in the genus. *J Fish Biol.* enero de 2021;98(1):178-88.
7. Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2006;103(3):626-31.
8. Brahmachari G, Demain A, Adrio J. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications.* Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications. 2016.
9. Monge C, Alayza A, Gudynas E, Centro Peruano de Estudios Sociales, Red Peruana por una Globalización con Equidad, editores. *Transiciones: post extractivismo y alternativas al extractivismo en el Perú.* 1. ed. Lima: Centro Peruano de Estudios Sociales: Red Peruana por una Globalización con Equidad; 2011. 216 p.
10. Rojas Briceño NB, Barboza Castillo E, Maicelo Quintana JL, Oliva Cruz SM, Salas López R. Deforestación en la Amazonía peruana: índices de cambios de cobertura y uso del suelo basado en SIG. BAGE.
11. Yusta-garcía R, Orta-Martinez M, Mayor P, Gonzalez-Crespo C, Rosell-Melé A. Water contamination from oil extraction activities in Northern Peruvian Amazonian rivers. *Environmental Pollution.* 2017;225.

12. Velásquez Ramírez MG, Barrantes JAG, Thomas E, Gamarra Miranda LA, Pillaca M, Tello Peramas LD, et al. Heavy metals in alluvial gold mine spoils in the peruvian amazon. *CATENA*. 2020;189:104454.
13. Dufossé L, Fouillaud M. Editorial: Microbial Biotechnology Providing Bio-based Components for the Food Industry. *Front Microbiol*. 2019;10:2843.
14. Norgan NG, Bogin B, Cameron N. Nutrition and Growth. En: *Human Growth and Development*. Elsevier; 2012. p. 123-52.
15. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics*. septiembre de 2018;34(9):666-81.
16. Giani AM, Gallo GR, Gianfranceschi L, Formenti G. Long walk to genomics: History and current approaches to genome sequencing and assembly. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2020;18:9-19.
17. Ahmad T, Singh RS, Gupta G, Sharma A, Kaur B. Metagenomics in the Search for Industrial Enzymes. En: *Advances in Enzyme Technology* [Internet]. Elsevier; 2019. p. 419-51.
18. Dasgupta D, Brahma Prakash GP. Soil Microbes are Shaped by Soil Physico-chemical Properties: A Brief Review of Existing Literature. *IJPSS*. 2021;59-71.
19. Zaccardelli M, De Nicola F, Villecco D, Scotti R. The development and suppressive activity of soil microbial communities under compost amendment. *J Soil Sci Plant Nutr*. 2013;(ahead):0-0.
20. Kimura N. Novel Biological Resources Screened From Uncultured Bacteria by a Metagenomic Method. En: *Metagenomics*. Elsevier; 2018. p. 273-88.
21. Di Bella JM, Bao Y, Gloor GB, Burton JP, Reid G. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *J Microbiol Methods*. 2013 Dec; 95(3):401-14.
22. Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*. Octubre de 1998;5(10):R245-9.
23. Almeida JM, Alnoch RC, Souza EM, Mitchell DA, Krieger N. Metagenomics: Is it a powerful tool to obtain lipases for application in biocatalysis? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2020;1868(2):140320.
24. Lappalainen T, Scott AJ, Brandt M, Hall IM. Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. 2019;177(1):70-84.

25. Castro JC, Maddox JD, Rodríguez HN, Orbe RB, Grandez GE, Feldheim KA, et al. Metagenomic 16S rDNA amplicon data on bacterial diversity profiling and its predicted metabolic functions of varillales in Allpahuayo-Mishana National Reserve. *Data in Brief* 2020;30:105625.
26. Lemos LN, de Souza RC, de Souza Cannavan F, Patricio A, Pylro VS, Hanada RE, et al. Metagenome sequencing of the microbial community of two Brazilian anthropogenic Amazon dark earth sites, Brazil. *Genomics Data*. 2016;10:167-8.
27. Kroeger ME, Meredith LK, Meyer KM, Webster KD, de Camargo PB, de Souza LF, et al. Rainforest-to-pasture conversion stimulates soil methanogenesis across the Brazilian Amazon. *ISME J*. 2021;15(3):658-72.
28. Kroeger ME, Delmont TO, Eren AM, Meyer KM, Guo J, Khan K, et al. New Biological Insights Into How Deforestation in Amazonia Affects Soil Microbial Communities Using Metagenomics and Metagenome-Assembled Genomes. *Front Microbiol*. 2018;9:1635.
29. Ajilogba CF, Babalola OO. Bambara groundnut soil metagenomics data. *Data in Brief*. 2020;30:105542.
30. Jacquiod S, Stenbæk J, Santos SS, Winding A, Sørensen SJ, Priemé A. Metagenomes provide valuable comparative information on soil microeukaryotes. *Res Microbiol*. 2016;167(5):436-50.
31. Paul S, Cortez Y, Vera N, Villena GK, Gutiérrez-Correa M. Metagenomic analysis of microbial community of an Amazonian geothermal spring in Peru. *Genomics Data*. 2016;9:63-6.
32. Ghai R, Rodríguez-Valera F, McMahon KD, Toyama D, Rinke R, Cristina Souza de Oliveira T, et al. Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the Amazon River. Lopez-Garcia P, editor. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e23785.
33. Santos Júnior CD, Toyama D, de Oliveira TCS, Pellon de Miranda F, Henrique-Silva F. Flood Season Microbiota from the Amazon Basin Lakes: Analysis with Metagenome Sequencing. Stewart FJ, editor. *Microbiol Resour Announc*. 2019:
34. de Melo ML, Bertilsson S, Amaral JHF, Barbosa PM, Forsberg BR, Sarmiento H. Flood pulse regulation of bacterioplankton community composition in an Amazonian floodplain lake. *Freshw Biol*. 2019;64(1):108-20.
35. Câmara dos Reis M, Lacativa Bagatini I, de Oliveira Vidal L, Bonnet M-P, da Motta Marques D, Sarmiento H. Spatial heterogeneity and hydrological fluctuations drive bacterioplankton community composition in an Amazon floodplain system. Casotti R, editor. *PLoS ONE*. 2019;14(8): e0220695.

36. Edge TA, Baird DJ, Bilodeau G, Gagné N, Greer C, Konkin D, et al. The Ecobiomics project: Advancing metagenomics assessment of soil health and freshwater quality in Canada. *Science of The Total Environment*. 2020;710: 135906.
37. Salam LB. Chapter 5 - Metagenomic insights into the diversity and functions of microbial assemblages in lakes. En: Bandh SA, Shafi S, Shameem N, editores. *Freshwater Microbiology*. Academic Press; 2019.
38. Cortés-López N, Montor-Antonio J, Olvera-Carranza C, Peña-Castro J. Metagenómica: una ventana de oportunidad a nuevos genes y genomas microbianos. 2014;1(7):15.
39. Kumar Awasthi M, Ravindran B, Sarsaiya S, Chen H, Wainaina S, Singh E, et al. Metagenomics for taxonomy profiling: tools and approaches. *Bioengineered*. 2020;11(1):356-74.
40. ADN (Ácido Desoxirribonucleico) | NHGRI. Genome.gov. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ADN-acido-Desoxirribonucleico>
41. ASALE R-, RAE. agua | Diccionario de la lengua española. «Diccionario de la lengua española» - Edición del Tricentenario. Disponible en: <https://dle.rae.es/agua>
42. ARN (ácido ribonucleico) | NHGRI. Genome.gov. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ARN>
43. Bacteria | NHGRI. Genome.gov. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bacteria>
44. Núñez I, González-Gaudiano É, Barahona A. La biodiversidad: historia y contexto de un concepto. *Interciencia*. 2003;28(7):387-93.
45. Bioinformática | NHGRI. Genome.gov. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bioinformatica>
46. Hernández Fonseca H. Biotecnología. *Revista Científica*. junio de 2010;20(3):225-6.
47. Consorcios microbianos y biotecnología / Microbial consortia and Biotechnology | BIOTECHMIND. Disponible en: <https://biotechmind.wordpress.com/2015/11/11/microbial-consortia-biotech-consorcios-microbianos/>
48. Concesión. Economipedia. Disponible en: <https://economipedia.com/definiciones/concesion.html>
49. Godiska R, Wu C-C, Mead DA. Genomic Libraries. En: Maloy S, Hughes K, editores. *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2013 p. 306-9.

50. Cortés-López NG, Ordóñez-Baquera PL, Domínguez-Viveros J, Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. Revista mexicana de ciencias pecuarias. diciembre de 2020;11(4):1150-73.
51. Montaña Arias, NM; Sandoval Pérez AL; Camargo Ricalde, SL; Sánchez Yáñez JM J. Los Microorganismos pequeños gigantes. 2010;15(23):9.
52. Secuenciación del ADN. Genome.gov. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Secuenciacion-del-ADN>
53. Concepto suelo. Institut Cartogràfic i Geològic de Catalunya. Disponible en: <http://www.icgc.cat/es/Administracion-y-empresa/Servicios/Suelos/Concepto-suelo>
54. Universidad Nacional Agraria La Molina. Disponible en: http://www.lamolina.edu.pe/facultad/agricola/lasmaf_presentacion.htm
55. DNeasy PowerSoil Pro Kit Quick-start Protocol - QIAGEN. Disponible en: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=3d576814-4f1e-4e26-9c94-57d5dc2bb60a&lang=en>
56. Kirkpatrick LA, Feeney BC. A Simple Guide to IBM SPSS Statistics - version 23.0. Fourteenth Edition. Boston, MA, USA: Cengage Learning; 2016. 128 p.
57. Massey FJ. The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. Journal of the American Statistical Association. 1951;46(253):68-78.
58. Lilliefors HW. On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with Mean and Variance Unknown. Journal of the American Statistical Association. 1967;62(318):399-402.
59. Meyer F, Bagchi S, Chaterji S, Gerlach W, Grama A, Harrison T, et al. MG-RAST version 4-lessons learned from a decade of low-budget ultra-high-throughput metagenome analysis. Brief Bioinform. 2019;20(4):1151-9.
60. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. Applied and Environmental Microbiology 2006.
61. Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Research. 2007;35(21):7188-96.

62. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 2007.
63. Jing G, Sun Z, Wang H, Gong Y, Huang S, Ning K, et al. Parallel-META 3: Comprehensive taxonomical and functional analysis platform for efficient comparison of microbial communities. *Sci Rep.* 2017;7(1):40371.
64. Sangeetha J, Thangadurai D, Tanasupawat S, Kanekar PP, editores. *Biotechnology of microorganisms: diversity, improvement, and application of microbes for food processing, health sector, environmental safety, and agricultural industry.* Toronto ; New Jersey: Apple Academic Press; 2019.

ANEXOS

Decreto supremo N° 005-2022-MIDAGRI. Decreto supremo que aprueba el reglamento de la Clasificación de Tierras por su Capacidad de Uso Mayor (CTCUM).

Rangos	Clases
Menos de 3.5	Ultra ácido
3.6 – 4.4	Extremadamente ácido
4.5 – 5.0	Muy fuertemente ácido
5.1 – 5.5	Fuertemente ácido
5.6 – 6.0	Moderadamente ácido
6.1 – 6.5	Ligeramente ácido
6.6 – 7.3	Neutro
7.4 – 7.8	Ligeramente alcalino
7.9 – 8.4	Moderadamente alcalino
8.5 – 9.0	Fuertemente alcalino
Más de 9.0	Muy fuertemente alcalino

Es el grado de acidez o alcalinidad del suelo. El valor del pH utilizado para la determinación de la CTCUM será obtenido mediante promedio ponderado, considerando el espesor de los horizontes o capas del suelo y el valor de su respectivo pH, entre 15 y 50 cm de profundidad.

Parámetros que definen la fertilidad del suelo

Nivel	Nivel Materia Orgánica (%)	Fósforo Disponible (ppm)	Potasio Disponible (ppm)
Bajo	Menor de 2	Menor de 7	Menor de 100
Medio	2 – 4	7 – 14	100 – 240
Alto	Mayor de 4	Mayor de 14	Mayor de 240

Fuente: Laboratorio de suelos de la Universidad Nacional Agraria – La Molina.

Coordenadas geográficas en UTM, de los lugares de colectada de las muestras de suelo.

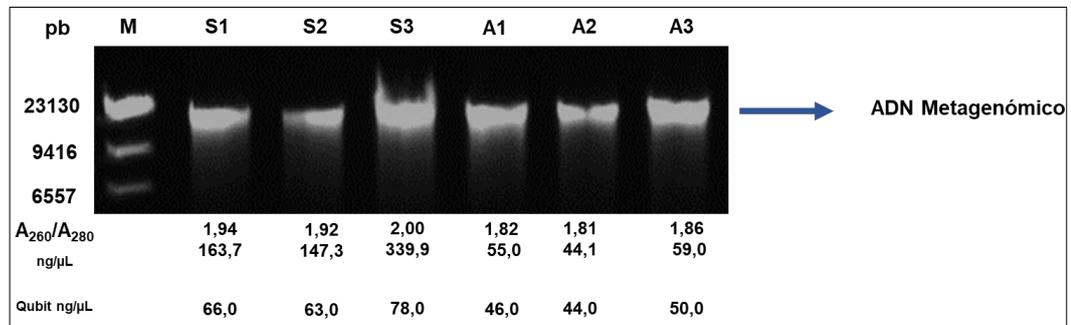
Muestra	Zona	Hemisferio	Este (UTMX)	Norte (UTMY)	Altura	Estrato Geográfico
M1	18	S	651374	9528487	141	Cima
			651368	9528492	135	
			651369	9528492	158	
			651380	9528488	144	
			551379	9528489	137	
M2	18	S	651353	9528436	134	Ladera
			651359	9528435	137	
			651353	9528441	145	
			651348	9528440	128	
			651352	9528429	130	
M3	18	S	651319	9528434	155	Valle
			651320	9528425	123	
			651301	9528422	123	
			651325	9528429	138	
			651314	9528420	136	
M4	18	S	651277	9528360	110	Valle
			651282	9528365	147	
			541279	9528363	135	
			651277	9528370	136	
			651269	9528375	128	
M5	18	S	651267	9528394	140	Ladera
			651260	9528365	110	
			651243	9528381	134	
			651246	9528390	142	
			651267	9528392	118	
M6	18	S	651213	9528400	135	Cima
			651199	9528398	145	
			651209	9528401	130	
			651196	9528395	132	
			651194	9528389	128	
M7	18	S	651093	9528473	128	Valle
			651095	9528481	129	
			651097	9528483	115	
			651100	9528476	141	
			651091	9528477	137	
M8	18	S	651044	9528466	132	Ladera
			651054	9528468	121	
			651049	9528463	135	
			651052	9528466	126	
			651059	9528474	124	
M9	18	S	651021	9528492	124	Cima
			651037	9528483	128	
			651031	9528474	129	
			651025	9528482	134	
			651041	9528483	110	
M10	18	S	651080	9528573	130	Cima
			651077	9528574	133	
			651090	9528580	120	
			651085	9528578	139	
			651074	9528577	138	
M11	18	S	651057	9528611	131	Ladera
			651054	9528618	126	
			651063	9528621	118	

			651062	9528613	111	
			651067	9528624	131	
M12	18	S	651002	9528602	121	Valle
			651013	9528605	129	
			651003	9528505	112	
			650997	9528607	110	
			6509100	9528609	115	
M13	18	S	650828	9528604	141	
			650830	9528577	131	
			650835	9528589	131	
			650821	9528577	121	
						650843
M14	18	S	650830	9528548	124	
			650846	9528564	125	
			650846	9528547	140	
			650854	9528550	152	
						650858
M15	18	S	650845	9528624	119	
			650874	9528611	138	
			650856	9528618	130	
			650854	9528621	128	

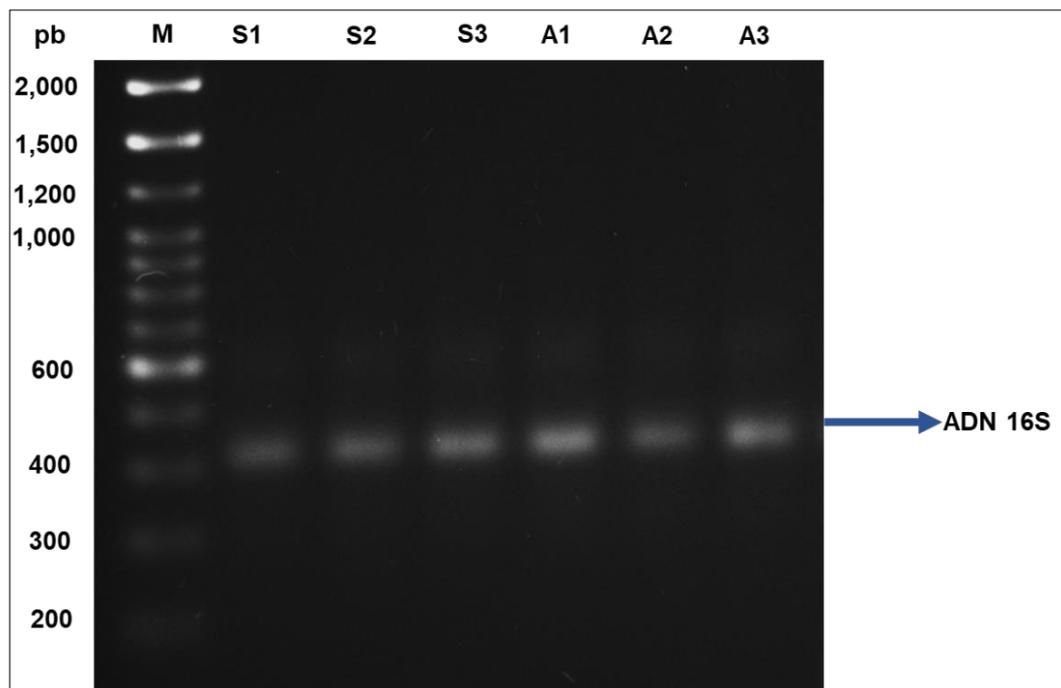
Coordenadas geográficas en UTM, de los lugares donde fueron colectados las muestras de agua.

Muestra	Zona	Hemisferio	Este (UTMX)	Norte (UTMY)	Altura	Cuerpo de agua
M1	18	S	650312,8	9528909,2	103	Quebrada
M2	18	S	650312,8	9528909,2	100	Quebrada
M3	18	S	650956,6	9528557,9	105	Quebrada
M4	18	S	650962,8	9528567,1	108	Quebrada
M5	18	S	651240,1	9528428,4	107	Quebrada
M6	18	S	651209,3	9528456,1	110	Cocha
M7	18	S	651187,7	9528456,7	101	Cocha
M8	18	S	651292,4	9528397,6	102	Cocha
M9	18	S	651511,2	9528298,9	108	Cocha
M10	18	S	652610	9526386	150	Cocha
M11	18	S	652520	9525968	111	Río
M12	18	S	652664	9525908	113	Río
M13	18	S	652799	9526162	109	Río
M14	18	S	652143	9525982	108	Río
M15	18	S	651662	9526378	108	Río

Gel de agarosa al 1 %, mostrando las bandas del ADN metagenómico purificado, de las muestras de suelos y cuerpos de agua de la cuenca alta del río Itaya. M: marcador de peso molecular (λ Hind III (23, 1-2,0 kb). S1 al S3 (muestras de suelo), A1 al A3 (muestras de agua). En la parte inferior se indican los ratios de calidad y concentración de ADN metagenómico obtenido.



Amplificación del ADN metagenómico purificado mediante RCP. Carriles S1 al S3 fueron muestras de suelo y los carriles A1 al A3 fueron muestras de agua). Los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular de 100 bp.



Ficha de registro de datos de colecta de muestras

DATOS GENERALES													
Nombre del sitio de estudio:													
Departamento:													
Provincia:													
DATOS DEL PUNTO DE MUESTREO													
Código del punto de muestreo:													
Coordenadas: X Y													
Descripción de la superficie:													
Instrumentos usados:													
DATOS DE LAS MUESTRAS													
Código de la muestra:													
Fecha:													
Hora de inicio:													
Hora de término:													
Profundidad:													
Características:													
Medidas de conservación:													
Tipo de muestra:													

Flujograma experimental de la tesis

Colecta de muestras de suelos y aguas



Evaluación de los parámetros fisicoquímicos



Filtración de las muestras de agua



Purificación del ADN metagenómico



Eliminación de los ácidos húmicos por métodos de lavado



Preparación de librerías



Secuenciamiento masivo

Galería de fotos



Colecta de muestras de suelos



Colecta de muestras de agua de quebradas



Medición de los parámetros fisicoquímicos del agua



Filtración de las muestras de agua



Corrida electroforética de las muestras



Secuenciador masivo procesando las muestras de suelos y aguas.