

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Estudio preliminar de la composición de comunidades bacterianas presentes en fuentes de agua dulce y salobre en las Islas Galápagos mediante ADN Ambiental

Sara Valeria García Altamirano

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniería en Biotecnología

Quito, 20 de diciembre de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Estudio preliminar de la composición de comunidades bacterianas presentes en fuentes de agua dulce y salobre en las Islas Galápagos mediante ADN Ambiental

Sara Valeria García Altamirano

Nombre del profesor, Título académico

Juan José Guadalupe, MSc

Nombre del profesor, Título académico

Milton Gordillo, MSc

Quito, 20 de diciembre de 2023

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Sara Valeria García Altamirano

Código: 00211235

Cédula de identidad: 1750252171

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Las Islas Galápagos son globalmente reconocidas por su singular diversidad y endemismo, no obstante, todavía no se termina de describir a los ecosistemas presentes en las Islas. Algunos de estos ecosistemas son los de agua dulce y salobre, de los cuales se tiene información de la calidad del agua y composición de macroinvertebrados. Dentro de este enfoque, se sabe que para comprender de mejor manera el funcionamiento de los ecosistemas, se requiere comprender la composición bacteriana presente. Por ende, este estudio aborda la identificación de la composición bacteriana y su biodiversidad en ecosistemas acuáticos de las Islas Galápagos. A través del análisis del ADN ambiental y la secuenciación por nanoporos de ONT de 39 muestras (17 de agua dulce y 22 de agua salobre) de tres islas principales: Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz. La asignación taxonómica demostró la dominancia de los filos bacterianos Proteobacteria y Bacteroidota en aguas dulces, mientras que en aguas salobres se añadió Cyanobacteria. Se identificaron filos no previamente reportados en Galápagos, como Bdellovibrionata y Patescibacteria, lo que podría ser relevante para comprender mejor el ecosistema y su estado. Los análisis de diversidad alfa y beta revelaron diferencias y similitudes en la composición de especies bacterianas entre islas y tipos de agua, destacando la influencia de factores ambientales y geográficos. Este estudio pionero resalta la importancia de continuar investigando estas aguas poco estudiadas en las Islas Galápagos junto con las características de los ecosistemas donde se toman las muestras.

Palabras clave: Bacteria, Galápagos, Ecosistemas de agua dulce, Ecosistemas de agua salobre, Composición Microbiana, Diversidad Microbiana, MinION

ABSTRACT

The Galapagos Islands are globally recognized for their unique diversity and endemism; however, the ecosystems present in the islands have not yet been fully described. Some of these ecosystems are freshwater and brackish water ecosystems, for which information is available on water quality and macroinvertebrate composition. Within this approach, it is known that to better understand the functioning of ecosystems, it is necessary to understand the bacterial composition present. Therefore, this study addresses the identification of bacterial composition and biodiversity in aquatic ecosystems of the Galapagos Islands. Through environmental DNA analysis and ONT nanopore sequencing of 39 samples (17 freshwater and 22 brackish water) from three main islands: Isabela, San Cristobal and Santa Cruz. Taxonomic assignment showed the dominance of the bacterial phyla Proteobacteria and Bacteroidota in freshwater, while Cyanobacteria were added in brackish water. Phyla not previously reported in Galapagos, such as Bdellovibrionata and Patescibacteria, were identified, which could be relevant to better understand the ecosystem and its status. Alpha and beta diversity analyses revealed differences and similarities in bacterial species composition between islands and water types, highlighting the influence of environmental and geographic factors. This pioneering study highlights the importance of continuing to investigate these poorly studied waters in the Galapagos Islands along with the characteristics of the ecosystems where samples are taken.

Key words: Bacteria, Galapagos, Freshwater Ecosystems, Brackish Water Ecosystems, Microbial Composition, Microbial Diversity, MinION

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	11
MÉTODOS	15
Recolección de muestras	15
Extracción de ADN y cuantificación en Nanodrop	15
Amplificación y preparación de librerías y secuenciamiento con MinION ONT	16
Análisis Bioinformático y asignación taxonómica.....	16
Análisis de diversidad de las secuencias	16
RESULTADOS	17
Taxonomía de las Islas: Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz.....	17
Alfa diversidad.....	17
Beta diversidad.....	18
DISCUSIÓN	19
Diferencias entre la composición bacteriana entre las Islas Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz.....	19
Alfa diversidad de los diferentes tipos de agua entre Islas	21
Beta diversidad de los diferentes tipos de agua entre Islas	22
CONCLUSIONES.....	23
TABLAS.....	24
FIGURAS.....	26
ANEXOS.....	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Muestras de ecosistemas acuáticos de eDNA en Galápagos	24
Tabla 2.- Valores de alfa diversidad (Índices de Shannon) obtenidos para cada una de las localidades de las tres Islas analizadas.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Abundancia relativa a nivel de los filos más representativos de las tres Islas analizadas.....	26
Figura 2.- Diagramas de caja y bigote para alfa diversidad (Índice de Shannon) de la composición bacteriana en las tres Islas analizadas.....	26
Figura 3.- Análisis de coordenadas principales (PCoA) para beta diversidad de la composición bacteriana por localidad de las tres Islas analizadas..	27

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Mapa donde se muestran las zonas muestreadas en las Islas Galápagos.....	28
------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

INTRODUCCIÓN

Las Islas Galápagos son uno de los lugares más biodiversos del mundo y se han considerado durante muchos años como un laboratorio natural que permite estudiar varios fenómenos y las distintas interacciones entre especies (Walsh et al., 2010). Son un archipiélago de islas volcánicas 18 principales y más de 100 islotes, que se encuentran a 965 km de la costa ecuatoriana (Walsh & Mena, 2013). Su ubicación en el océano Pacífico, condiciones climáticas y aislamiento del resto del continente, son algunos de los factores que les permiten tener una flora, fauna y microorganismos distintos a otros lugares (Walsh et al., 2010). Por el mismo hecho de que ofrecen un paisaje ecológico único, no se ha logrado abordar la investigación en todos los ecosistemas acuáticos presentes para comprender su funcionamiento.

Se define a un ecosistema acuático como un entorno natural con un cuerpo de agua de diverso tamaño que posee elementos bióticos y abióticos que interactúan entre sí y su entorno circundante (Pittock & Finlayson, 2011). Estos ecosistemas pueden ser arroyos, pantanos, mares, lagunas, estuarios, entre otros, donde su naturaleza juega un rol vital en diversos ciclos de nutrientes (Nagy et al., 2016). Dependiendo de si es un cuerpo de agua dulce, salada, o salobre tiene diferentes características físico-químicas y composición en flora, fauna y microorganismos (Moss, 1994). La biodiversidad bacteriana cumple importantes funciones dentro de estos entornos, en general, se encargan de regular los ciclos de nutrientes, simbiosis con otros organismos, producción de oxígeno (Paerl & Pinckney, 1996). A esto se le suma la capacidad de que algunas bacterias acuáticas tienen la capacidad de descomponer materia orgánica y depuración de ciertos contaminantes del agua (Tang et al., 2021).

Por un lado, los ecosistemas de agua dulce que poseen <1% de salinidad y desempeñan un papel fundamental en la salud del ser humano y el planeta en general, debido a que son una fuente de agua potable (Brett et al., 2017). Por otro lado, los ecosistemas salobres tienen una concentración de salinidad intermedia entre 1%-3.5% de salinidad, lo que se conoce como agua

dulce y agua salada (Rath & Mitbavkar, 2023). Las fuentes de agua salobre son estuarios, manglares, entre otros, y su contenido de salinidad se debe a la cercanía a agua salada y la acumulación de sales minerales (Gogina et al., 2018). Las aguas salobres actúan como viveros naturales donde crías de peces y cangrejos pueden encontrar refugio y alimento (Sanders et al., 1992). La composición bacteriana tanto de agua dulce como salobre se encarga de filtrar y purificar el agua, ya que eliminan el exceso de nutrientes y/o contaminantes antes de que lleguen a cuerpos más grandes de agua (Gogina et al., 2018).

Desde la década de los años 70 las Islas han recibido una gran ola de migrantes desde Ecuador continental debido a las oportunidades de pesca en empresas internacionales o de turismo (Overbey et al., 2015). Este aumento de población genera que la demanda de alimentación, agua vehículos, viviendas, y otros elementos materiales incrementen a su vez (Re et al., 2023). Sin embargo, durante este tiempo se han ignorado los sistemas de electricidad, gas, provisión y tratamiento de aguas. Hasta el momento, en las Islas se consigue agua potable de 3 formas: por importación del continente, por recolección de agua de lluvia y mediante extracción de agua dentro de ecosistemas de agua dulce (Violette et al., 2014).

Tanto de ecosistemas de agua dulce y salobre de Galápagos sólo se han realizado estudios de calidad del agua midiendo indicadores microbiológicos como *Escherichia coli* y enterococos (Gerhard et al., 2017). Además de otros estudios como el Echelpoel, et al., (2019), donde investigaron la composición de macroinvertebrados y peces de arrecife en algunos ecosistemas acuáticos. Sin embargo, no hay estudios que analicen a la composición bacteriana de distintos ecosistemas de agua dulce y salobre y realicen análisis de diversidad. Lo cual es fundamental para entender cómo funcionan dichos ecosistemas y si existe algún impacto antropogénico o industrial dentro de ellos (Ballesteros-Mejia et al., 2021). Además, cómo no han sido estudiados previamente, se pueden encontrar filos bacterianos interesantes que pueden tener aplicaciones biotecnológicas (López et al., 2021).

Los ecosistemas acuáticos se ven amenazados por causas antropogénicas tanto de carácter industrial como urbano (Ballesteros-Mejia et al., 2021). Se ha reconocido que los nutrientes y contaminantes orgánicos son los principales factores estresantes responsables de la variación de la comunidad bacteriana de dichos ecosistemas (López et al., 2021). Varios estudios sugieren que existe un significativo porcentaje de degradación del ambiente en la Isla Isabela causado por la contaminación del agua en humedales sensibles y lagunas, así como una reducción en el porcentaje de agua disponible para que cubra las necesidades humanas y ecológicas (Ballesteros-Mejia et al., 2021; Mateus et al., 2019). A esto se le añade que se ha visto un incremento de salinidad en aguas dulces a lo largo del tiempo que es probablemente debido a la extracción excesiva de agua de pozos comunitarios dentro de las Islas (Mateus et al., 2019). La razón yace en que se drena agua salobre desde las profundidades hasta las aguas dulces que se encuentran superficialmente (López et al., 2021). Por lo que estudiar su composición bacteriana y su diversidad podría ayudar a entender de mejor manera el funcionamiento de los ecosistemas.

Una manera de estudiar la biodiversidad en los ecosistemas es el muestreo directo de la zona que se quiere estudiar mediante monitoreo directo de las especies en el lugar (Lijuan et al., 2014). Sin embargo, una herramienta novedosa que permite identificar y monitorear la presencia de especies sin la necesidad de observarlas directamente es el ADN Ambiental o eDNA (environmental DNA) (Schenekar, 2023). Esto debido a que cada organismo deja rastros de su ADN cuando se movilizan, alimentan, reproducen o eliminan desechos dentro del ambiente que puede ser agua, aire o tierra (Custodio et al., 2022). Ya sea mediante el desprendimiento de piel, pelo, heces, células u otros materiales biológicos en el entorno donde se encuentren (Mauvisseau et al., 2022). Al tomar las muestras del ambiente se puede analizar la presencia de distintos organismos, ya sean invertebrados, mamíferos, peces, o bacterias (Carraro et al., 2020).

El gen que se utiliza para identificar bacterias es el 16S que codifica para la subunidad ribosomal pequeña o también conocida como ARNr 16S (Větrovský & Baldrian, 2013). Esta molécula forma parte de los ribosomas que se encargan de la síntesis de proteínas (Eichler et al., 2006). A pesar de que es un gen es muy conservado, varía ligeramente entre especies de bacterias lo que permite que se lo pueda usar como marcador de identificación (Case et al., 2007). Una forma de detectar este gen en muestras ambientales es mediante el proceso de amplificación por PCR y secuenciación (Fujiyoshi et al., 2020). Una de las técnicas de secuenciación más utilizadas hoy en día para la identificación de microorganismos a través de la amplificación del gen 16S es la de secuenciamiento por nanoporo, desarrollada por ONT (Eichler et al., 2006). Esta técnica permite el secuenciamiento de amplicones independientemente de su tamaño, permitiendo generar lecturas de la secuencia completa de en este caso, el gen 16S. A medida que el ADN pasa por el nanoporo se identifica cada base porque existe un cambio en la corriente eléctrica que fluye a través del poro (Fujiyoshi et al., 2020). De esta manera es posible decodificar la secuencia íntegra de los fragmentos amplificados, cuyos tamaños varían alrededor de 1.5-1.6Kb (Case et al., 2007). Existen varias ventajas de la secuenciación ONT como que permite el monitoreo en tiempo real y en cualquier lugar, además que tiene bajo costo en comparación con otras tecnologías (Acharya et al., 2019).

El presente estudio se enfoca en analizar la composición y diversidad bacteriana en muestras de ADN ambiental de agua dulce y salobre de 3 islas de las Islas Galápagos mediante el secuenciamiento con ONT del gen 16S rRNA. De acuerdo con lo mencionado previamente, este estudio nos permitirá conocer la composición bacteriana en estos ecosistemas de agua dulce y salobre, ya que sólo se conoce su caracterización física-química y composición de macroinvertebrados. Esto además nos permitirá entender el funcionamiento de los mismos.

MÉTODOS

Recolección de muestras

Para la toma de muestra en los distintos puntos: se tomó 1 frasco de vidrio esterilizado y se enjuagó 3 veces en el área escogida del agua a una profundidad media. Posteriormente se llenó 1 litro de agua, donde se dejó un espacio vacío de 1% del frasco y se tapó el frasco. Se rotuló y se mantuvo en refrigeración hasta llegar al laboratorio de biología molecular del Galapagos Science Center en San Cristóbal.

Se obtuvieron 39 muestras de ecosistemas de agua dulce y salada en las Islas Galápagos (13 muestras de la Isla Isabela, 8 muestras de la Isla San Cristóbal y 18 de la Isla Santa Cruz). La información respectiva de cada muestra se especifica en la Tabla 1 y los puntos de muestreo están en el Anexo 1.

Extracción de ADN y cuantificación en Nanodrop

Cada muestra de agua pasó del frasco al filtro de 0.45 μm por una bomba de agua peristáltica para retener la mayor cantidad de material genético en el filtro. Se utilizó el protocolo detallado en Spens et al., (2017), que realiza extracción de ADN de muestras de agua de eDNA, que a su vez es un protocolo modificado del kit e DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN, Stockach, Germany). En cada filtro de cada muestra de agua, obtenemos dos muestras diferentes. Una es del buffer que se usó para extraer el cual se dejó reposar por un día (que se denominará 'buffer'); y la otra muestra es del filtro en sí, que se dejó en el buffer durante dos días antes de ser analizado (que se denominará 'filtro'). Para determinar la concentración y calidad del ADN de las muestras se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 y Qubit™ 3.0.

Amplificación y preparación de librerías y secuenciamiento con MinION ONT

Como se observa en la **Tabla 1**, 36 de las 39 muestras fueron secuenciadas en Galápagos siguiendo las especificaciones del 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024) (*16S Barcoding Kit 1-24*, n.d.). Las 3 muestras restantes no utilizaron el mismo kit, ya que fueron amplificadas mediante una PCR en Quito y se usaron sus amplicones para generar librerías con Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) (*Native Barcoding Kit 24 V14*, n.d.).

Análisis Bioinformático y asignación taxonómica

Las secuencias fueron analizadas mediante el pipeline Spaghetti (Latorre-Pérez et al., 2021) que permite examinar secuencias de ONT del gen 16S rRNA, donde se realiza la remoción de adaptadores, detectar quimeras, removerlas y alinear las secuencias con la base de datos de SILVA (v. 138) (Latorre-Pérez et al., 2021). Como resultado se obtuvieron 2 archivos en formato csv: una tabla con las frecuencias de los OTUs y una tabla con la taxonomía asignada a cada OTU.

Análisis de diversidad de las secuencias

Se desarrolló un script personalizado en el lenguaje de programación R (R Core Team, 2020) para llevar a cabo el análisis de diversidad alfa y beta de las secuencias. Se realiza la rarificación y normalización de datos. Además del cálculo de índices para alfa diversidad y generación de gráficos para alfa y beta diversidad, con sus respectivas pruebas estadísticas. Dentro de este script se usaron los paquetes de: ohchibi v1.0.0 (Salas-Gonzalez, 2019), phyloseq v1.44.0 (McMurdie & Holmes, 2013), ggplot2 v3.4.3 (Wickham, 2016), vegan v2.6.4 (Oksanen, 2019).

RESULTADOS

A continuación, se presentan la abundancia relativa, la alfa y beta diversidad del análisis bioinformático de 36 de las 39 muestras. Esto debido a que, al ajustar el número de lecturas de cada muestra para hacerlas comparables entre sí, se normalizaron las muestras a un límite de 21 000 lecturas. Por lo que se descartaron 3 (IPZDB02, IPZVC15 e IPZDB03) porque tuvieron 110, 2 024 y 9 153 lecturas respectivamente.

Taxonomía de las Islas: Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz

Con la finalidad de visualizar las diferencias encontradas se realizaron gráficos de abundancia relativa donde se observa la asignación taxonómica usando la base de datos de SILVA mediante el pipeline de Spaghetti. La Figura 1 se compone de 2 paneles A) donde se observan los 11 filos más abundantes presentes en las islas San Cristóbal, mientras que en el panel B) se encuentran los 11 filos más abundantes en Isabela y Santa Cruz. En el panel A) se encuentran todas las muestras de agua dulce con una abundancia de 60-70% aproximadamente de Proteobacteria. Además de alrededor de un 20% de Bacteroidota y el resto de filos están presentes en menos del 1%. En el caso del panel B) se presentan las muestras de agua salobre donde si bien Proteobacteria es el filo más abundante (30-40%), también se observa que Cyanobacteria tiene un 10-40% de abundancia. El filo Bacteroidota está entre 10-20% y Verrucomicrobiota entre 10-25%. Mientras que el resto de filos se encuentra presente en menos del 1%.

Alfa diversidad

Se calculó la alfa diversidad, que es la diversidad presente en cada muestra, con los índices de Shannon (Tabla 2). Para visualizar la distribución y variabilidad de las diferentes especies encontradas en el presente análisis se realizaron gráficos de diagramas de caja y bigotes (Figuras 2) usando el índice de Shannon. Cabe resaltar que tanto en la Figura 2 A) y en

la 2 B) se logra ver una gran cantidad de valores atípicos. Además, el que posee mayor diversidad en la Figura 2 A) es la Isla San Cristóbal entre las muestras de agua dulce. En el caso de la Figura 2 B) de las muestras de agua salobre se observa que en general la diversidad entre Santes similar.

Beta diversidad

Se realizaron observan los gráficos de análisis de coordenadas principales o PCoAs para visualizar las diferencias en la composición de especies entre los distintos lugares, es decir, la beta diversidad. En todos los gráficos se realizó el análisis PERMANOVA (Análisis de Varianza Permutacional Multivariado de la Diferencia) para determinar si las diferencias encontradas son estadísticamente significativas. En este análisis se observa la influencia cada factor Isla y el factor Zona cada uno tiene un valor R^2 que explica la variabilidad de los datos explicada por el modelo estadístico y un valor p que si es menor a 0.001 nos dice que las diferencias encontradas son estadísticamente significativas. En la Figura 3 A) el factor Isla tiene un R^2 : 15.75% y su valor $p < 0.001$. El factor Zona explica el 67.26% de la variabilidad de los datos (R^2) y muestra que existen diferencias significativas ($p < 0.001$), y se puede observar una clara diferenciación en la agrupación de las muestras de San Cristóbal (eje superior) y las de Santa Cruz (eje inferior).

Para las muestras de agua salobre la Figura 3 B) muestra que el 14.38% de la variabilidad en los datos es explicado por la variable Isla, y existen diferencias significativas ($p < 0.001$). También muestra que el 63.11% de la variabilidad en los datos es explicado por la variable Zona y muestra también que existen diferencias significativas ($p < 0.001$). Sin embargo, al observar la Figura 3B) no existe una separación tan evidente entre las muestras, y tiene regiones del gráfico en las que existe un solapamiento entre muestras que provienen de diferentes islas.

DISCUSIÓN

Diferencias entre la composición bacteriana entre las Islas Isabela, San Cristóbal y

Santa Cruz

Nuestro estudio destacó diferencias y similitudes en las comunidades bacterianas de agua dulce (San Cristóbal y Santa Cruz) y agua salobre (Isabela y Santa Cruz). Se puede resaltar que, en las muestras de agua dulce (Figura 1 A), se encuentra una gran abundancia de Proteobacteria y Bacteroidota. Estos filos exhiben lo encontrado en estudios previos realizados en Hawaii (Klair et al., 2023) y Brasil (Godoy et al., 2022) donde su presencia fue predominante en agua de ríos, manantiales y lagunas. Proteobacteria es un filo que se encarga de descomponer materia orgánica y mantener el equilibrio de nutrientes en el agua (Behera et al., 2017). Si bien este filo alberga especies reconocidas como indicadores de contaminación del agua, como *E. coli*, y algunas especies de Enterobacter (Jin et al., 2018; Liu, 2011), este estudio se centró únicamente en la taxonomía a nivel de filo. Mientras que Bacteroidota además de degradar compuestos orgánicos, son alimento de otros organismos como protozoos y peces, por lo que mantiene un equilibrio en la cadena alimentaria de estos ecosistemas (Henriques et al., 2006).

Hay algunos filos menos abundantes como Verrucomicrobiota que pueden formar simbiosis con otros organismos acuáticos para fijar nitrógeno en el agua (F Kamada, 2023). El filo Acidobacteriota, según Zimmermann et al. (2012), prospera en aguas con bajos niveles de pH y participa en el ciclo de carbono mineralizando compuestos complejos. Bdellovibrionota es un filo depredador de bacterias Gram negativas, que no ha sido descrito antes en las Islas, y sólo se ha reportado cuando se realizan análisis de metagenómica (Li et al., 2021). Aún no se comprende totalmente su rol en el medio ambiente, pero se sabe que su presencia controla el crecimiento de ciertas comunidades bacterianas (Sockett, 2009). Además, se ha reportado que Bdellovibrionota puede cooperar con otras bacterias como Myxococcota para cazar y depredar

Gram negativas (Li et al., 2023), lo que podría ser la razón por la cual Proteobacteria se encuentra en menor abundancia en las muestras de San Cristóbal que en las de Santa Cruz.

En el caso de las muestras de agua salobre (Figura 1 B), los filos más abundantes son Proteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidota y Verrucomicrobiota. Estos filos corresponden a lo encontrado en un estudio en muestras de agua salobre en el atolón de coral de Kiritimati, en el Océano Pacífico tropical central realizado por Schmitt et al., (2019). Donde se observa que comparten filos en ambos estudios, entre ellos, Actinobacteriota, Cyanobacteria, Verrucomicrobiota, Firmicutes, Bacteroidota, Planctomycetota, Proteobacteria, que son comunes en fuentes de agua salobre (Schmitt et al., 2019). Los ecosistemas salobres suelen tener composiciones microbianas similares, incluso si se encuentran geográficamente lejos (Gołębiewski et al., 2017), porque la alta concentración de sal aumenta el costo energético de vida (Kisand et al., 2005). Esta barrera de estrés dificulta que nuevos microorganismos se introduzcan, por lo que las comunidades microbianas tienden a ser estables (Yang et al., 2016). En nuestros resultados se encontró una alta abundancia de Cyanobacteria que producen oxígeno y a fijar el carbono en la fotosíntesis (Gołębiewski et al., 2017). Se ha reportado que son comunes en aguas con alto porcentaje de salinidad, ya que la competencia con otros microorganismos y algas es menor en estos ecosistemas (Georges Des Aulnois et al., 2019).

Otro filo importante, pero en menor abundancia es Patescibacteria que son nanobacterias, no antes descritas en estudios de las Islas (Herrmann et al., 2019). Este filo únicamente ha sido reportado en análisis metagenómicos y son interesantes porque se les ha atribuido mecanismos de desintoxicación de nitritos en lugar de realizar desnitrificación (Castelle et al., 2018). Campilobacterota es un filo conocido por su adaptabilidad a entornos extremos, lo que aporta resiliencia a esos ecosistemas (Axelsson-Olsson et al., 2010). Este grupo incluye algunas especies patógenas, por lo que identificarlas en estos ambientes podría indicar contaminación fecal y cómo se encuentra el estado de las aguas (Sinton et al., 2007).

Alfa diversidad de los diferentes tipos de agua entre Islas

La alfa diversidad es una medida de diversidad biológica dentro de un área o ecosistema en específico en base a su riqueza (número de especies) (Willis, 2019). Se evaluó el índice de Shannon que toma en cuenta tanto la uniformidad (distribución de individuos entre especies) como a la riqueza de las especies en la muestra (T Moreno et al., 2011). Las muestras de agua (Figura 2 A), muestran que San Cristóbal presenta un rango de valores más altos, lo que demuestra que tiene una mayor diversidad en su composición bacteriana (Percent et al., 2008) que Santa Cruz. Se ha reportado que los ecosistemas con condiciones ambientales fluctuantes, como intensidad de lluvias, cambios de temperatura y humedad, tienden a presentar una mayor diversidad microbiana que los ecosistemas con condiciones ambientales estables (Girvan et al., 2005). Las zonas muestreadas en San Cristóbal tienen precipitaciones anuales mayores a los 1200 mm, mientras que en los lugares de muestreo de Santa Cruz tienen precipitaciones con valores entre 500-700 mm al año. Esto podría estar explicando las diferencias en la alfa diversidad encontrada en ambas islas (Kirs et al., 2020).

En las muestras de agua salobre (Figura 2 B) se observa que sólo 2 muestras de Santa Cruz son más diversas que las de Isabela, pero entre ambas islas la diversidad es similar. Esto puede residir en que las zonas de muestreo de ambas islas son ecosistemas con características semejantes como cercanía a desembocaduras hacia el océano (Riascos-Flores et al., 2021). Todas las zonas donde tomaron las muestras están entre los 0 y 5 msnm (Asigau et al., 2017), además que se componen de manglares o lagunas saladas donde se ha reportado que aves migratorias como flamencos van frecuentemente a alimentarse en estas zonas (Rodríguez & Castro, 2015). Además, su vegetación se compone de mangles negros y manzanillo o manzano venenoso (Asigau et al., 2017), la cual podría ser la razón por la que tiene una diversidad similar.

Beta diversidad de los diferentes tipos de agua entre Islas

La beta diversidad es una medida de la variabilidad en la composición de especies entre 2 o más puntos de muestreo (Barberán et al., 2010). Tanto en la Figura 3 A) y 3 B) se realizó un gráfico PCoA que es un análisis multivariado que permite reducir la complejidad de los datos y los representa en un espacio de coordenadas (Shengbin et al., 2010). Se realizó también un análisis de PERMANOVA para observar si existen diferencias significativas (Li et al., 2018).

En la Figura 3 A) de muestras de agua dulce se puede observar una clara diferenciación en la agrupación de las muestras de San Cristóbal y las de Santa Cruz, donde son significativos tanto el factor Isla (15.75%; valor $p < 0.001$) como Zona (67.26%; valor $p < 0.001$). Estas diferencias pueden deberse a lo mencionado anteriormente en las desigualdades en los patrones de precipitación de cada isla. A su vez, existen otras características que podrían estar influyendo, como que Santa Cruz es más poblada y con una mayor actividad agrícola que San Cristóbal (Olmedo & Cayot, 1994). Se ha reportado que el uso de fertilizantes y/o pesticidas en la agricultura puede llegar a cambiar la disponibilidad de nutrientes y por ende a la composición microbiana de la zona (Waiser & Robarts, 1997).

En el caso de la Figura 3 B) de muestras de agua salobre hay una leve separación en el eje X, y si bien los factores son significativos Isla (R^2 : 14.38%; valor $p < 0.001$) y Zona (67.26%; valor $p < 0.001$), observamos un solapamiento entre las muestras. En este caso, puede ser que existan factores que estén influyendo y no se han tomado en cuenta, causando la superposición entre muestras. Esto podría deberse a que las zonas muestreadas presentan características similares como se mencionó previamente. Dichas zonas poseen una vegetación similar muy abundante alrededor, se encuentran casi al nivel del mar y en desembocaduras al océano (Adelinet et al., 2008). Por lo que se debe profundizar en su estudio, tomando en cuenta los datos biogeográficos y condiciones climáticas de la zona de muestreo (Polpass Arul et al., 2021), para entender de mejor manera la presencia o ausencia de la composición bacteriana.

CONCLUSIONES

El presente estudio constituye una investigación pionera en la caracterización y diversidad microbiana de ecosistemas acuáticos en las Islas Galápagos. A partir de estos resultados se encontraron filos bacterianos no reportados previamente en Galápagos como Bdellovibrionata y Patescibacteria que pueden ser interesantes en el estudio de su metabolismo y su rol en el ecosistema. Se evidenció la elevada presencia de Proteobacteria en todas las muestras, lo que puede ser relevante estudiar más a fondo para entender más las características de las aguas y su estado, porque algunas especies de este filo pueden ser patógenas. En las muestras de agua dulce, San Cristóbal posee más alfa diversidad que Santa Cruz, esta disparidad puede explicarse por las características propias de cada zona de muestreo. Además, la separación observada en la beta diversidad nos muestra que las diferencias entre las Islas son significativas. En el caso de las muestras de agua salobre se observó una similaridad en la alfa diversidad de Isabela y Santa Cruz, que puede deberse a las características semejantes entre ambas zonas de muestreo. Asimismo, cuando comparamos la beta diversidad, si bien hay diferencias significativas, existen otros factores que pueden estar influyendo en estas muestras por lo que la separación entre las mismas no es evidente como en las muestras de agua dulce.

Estudiar los diferentes filos bacterianos en las aguas de las Islas Galápagos junto con otras mediciones del ambiente nos da pistas sobre cómo está conservado o afectado ese lugar por la influencia humana, ya que son vulnerables a cambios bruscos por su aislamiento del continente. Es crucial seguir examinando estas áreas más a fondo, considerando cosas como el pH, la temperatura y la cantidad de oxígeno y nutrientes, en distintos momentos del año. Asimismo, utilizar técnicas de secuenciación complementarias como Illumina para poder llegar a taxones más específicos como género o especie. Esto permitirá tener una mejor comprensión de la dinámica de las comunidades bacterianas en este lugar tan único como lo son las Islas Galápagos.

TABLAS

Tabla 1.- Muestras de ecosistemas acuáticos de eDNA en Galápagos

Isla	Zona	ID de la muestra	Tipo de agua	Tipo de kit
Isla Isabela	Orillas Pozas Diablas	IOPDC12	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-24
		IOPZDB21	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-25
	Poza de los Tunos	ITUNB09	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-26
		ITUNB10	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-27
	Pozas Diablas	IPZDB02	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-28
		IPZDC08	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-29
		IPZDB03	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-30
	Pozas Verdes	IPZVB07	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-31
		IPZVC06	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-32
		IPZVC15	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-33
		IPZVC24	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-34
	Quinta Playa	IQPLB13	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-35
		IQPLB14	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-36
	Isla San Cristóbal	Cascada 1	CC1C02	Agua dulce
Cascada 2		CC2C03	Agua dulce	Native Barcoding Kit 24 V14
El Chorro		CCHC05	Agua dulce	Native Barcoding Kit 24 V14
El Junco		CJNCC17	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-24
		CJNCB08	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-25
		CJNCC18	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-26
Guadalupe		CGDLC09	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-27
La Encañada		CENCC03	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-28
	CENCB20	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-29	
Isla Santa Cruz	Garrapatero	RGRPC20	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-32
		RGRPC18	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-33
	Grietas	RGRTB24	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-34
		RGRTC11	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-35
	Pozas Grietas	RPZGB13	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-36
		RPZGC12	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-37
	Salinas	RSLNB04	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-38
		RSLNC05	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-39
		RSLNC22	Agua salobre	16S Barcoding Kit 1-40
	Cascajo	RCSJC22	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-41
		RCSJC14	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-42
	Guayabillos	RGYBC20	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-43
		RGYBB04	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-44
	Porvenir	RPRVC24	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-45
		RPRVB23	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-46
	Manzanillo	CMNZC21	Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-30
CMNZC22		Agua dulce	16S Barcoding Kit 1-31	

Tabla 2.- Valores de alfa diversidad (Índices de Shannon) obtenidos para cada una de las localidades de las tres Islas analizadas

Isla	Tipo de Muestra	Zona	Muestra	Shannon
Isabela	Agua salobre	Pozas Diablas	IPZDC08	3,901
		Orillas Pozas Diablas	IOPZDC12	4,376
			IOPZDB21	5,433
		Pozas Verdes	IPZVB07	4,627
			IPZVC24	4,867
			IPZVC06	3,485
		Poza de los Tunos	ITUNB09	4,044
			ITUNB10	3,232
		Quinta Playa	IQPLB13	3,320
			IQPLB14	4,391
San Cristóbal	Agua dulce	El Chorro	CCHC05	8,510
		El Junco	CJNCC17	4,021
			CJNCB08	4,220
			CJNCC18	3,916
		Guadalupe	CGDLC09	3,888
		Cascada 2	CC2C03	8,288
		Cascada 1	CC1C02	7,335
		La Encañada	CENCC03	7,936
CENCB20	7,927			
Santa Cruz	Agua salobre	Pozas Grietas	RPZGB13	6,573
			RPZGC12	5,158
		Garrapatero	RGRPC20	3,980
			RGRPC18	4,092
		Salinas	RSLNB04	4,207
			RSLNC05	1,647
			RSLNC22	1,741
		Grietas	RGRTC11	4,112
	RGRTB24		6,195	
	Agua dulce	Cascajo	RCSJC22	4,816
			RCSJC14	5,117
		Guayabillos	RGYBC20	5,968
			RGYBB04	5,940
		Porvenir	RPRVB23	4,343
			RPRVC24	4,819
		Manzanillo	RMNzc21	4,629
RMNzc22			4,554	

FIGURAS

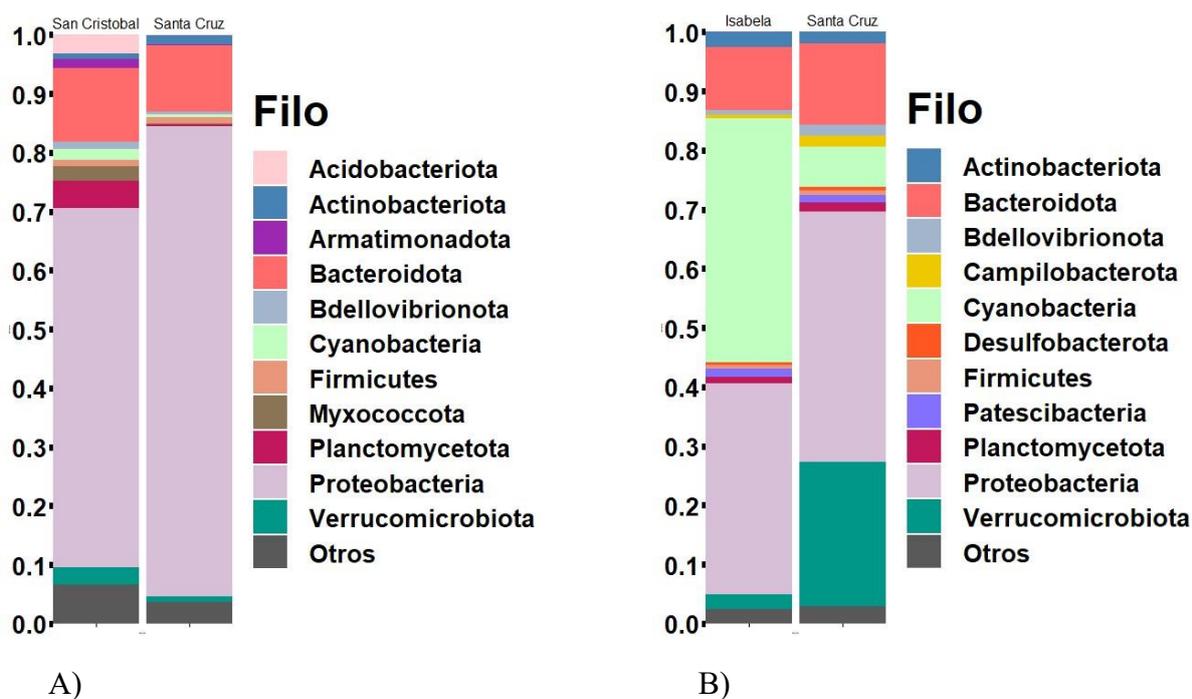


Figura 1.- Abundancia relativa a nivel de los filios más representativos de las tres Islas analizadas. A) Abundancia relativa de las muestras de agua dulce (San Cristóbal y Santa Cruz). B) Abundancia relativa de las muestras de agua salobre (Isabela y Santa Cruz).

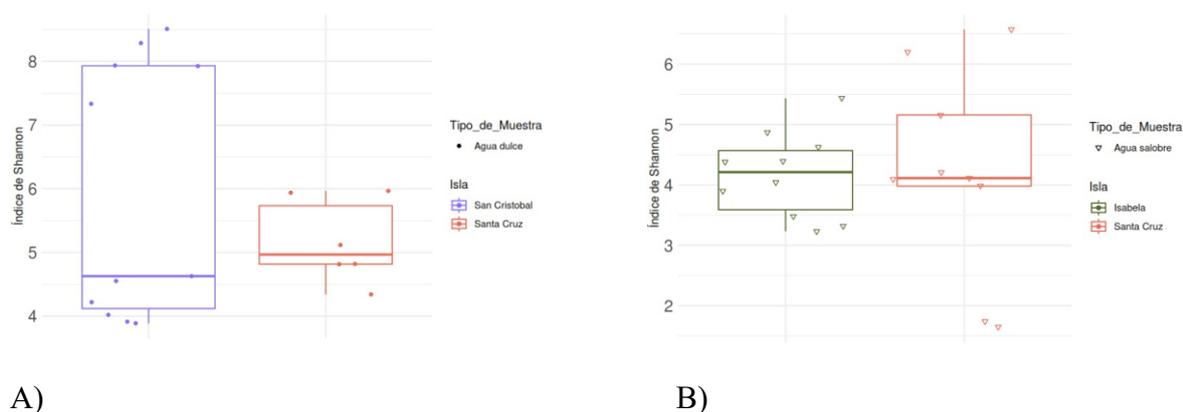


Figura 2.- Diagramas de caja y bigote para alfa diversidad (Índice de Shannon) de la composición bacteriana en las tres Islas analizadas. A) Diagrama de caja y bigotes correspondiente a las muestras de agua dulce (San Cristóbal y Santa Cruz). B) Diagrama de caja y bigotes correspondiente a las muestras de agua salobre (Isabela y Santa Cruz).

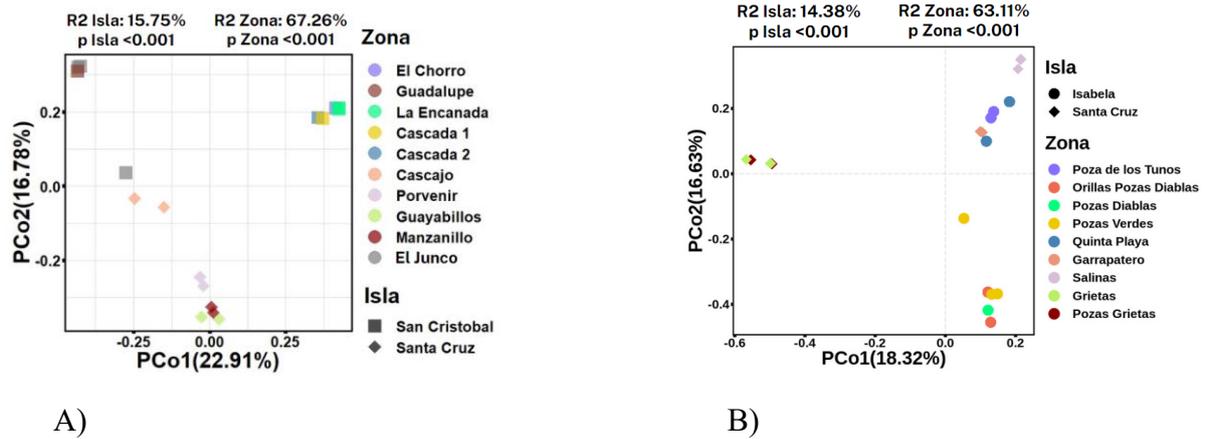
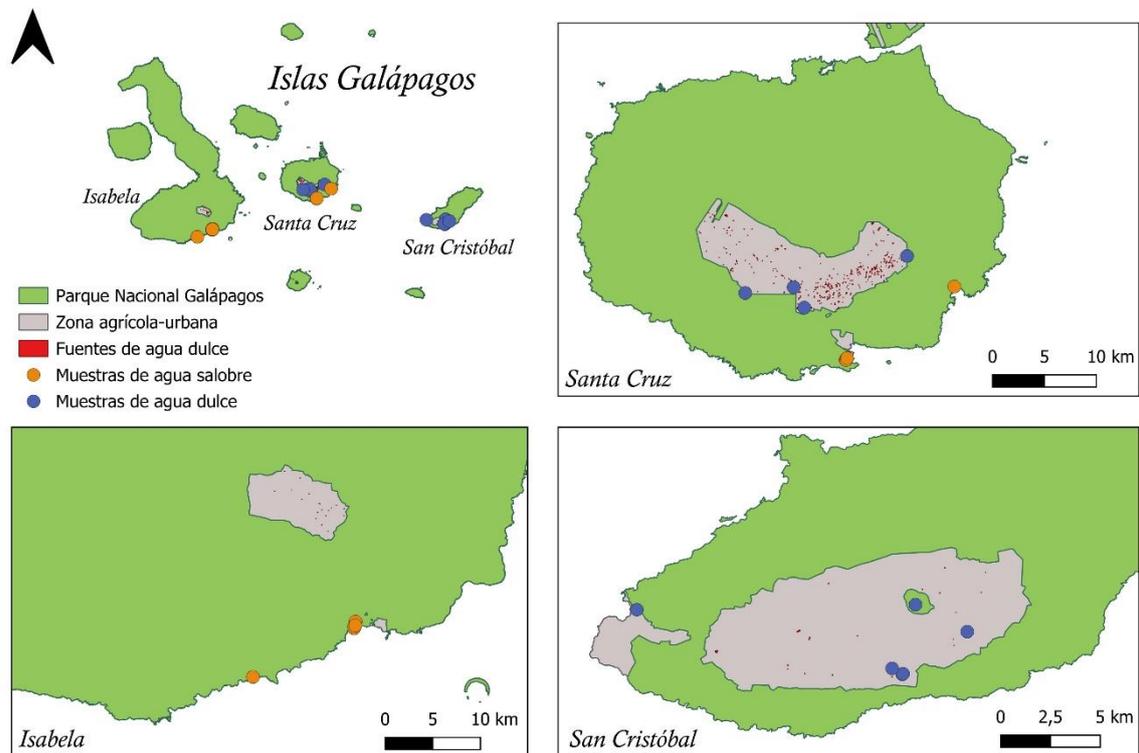


Figura 3.- Análisis de coordenadas principales (PCoA) para beta diversidad de la composición bacteriana por localidad de las tres Islas analizadas. A) PCoA correspondiente a las muestras de agua dulce (San Cristóbal y Santa Cruz). B) PCoA correspondiente a las muestras de agua salobre (Isabela y Santa Cruz).

ANEXOS

Anexo 1: Mapa donde se muestran las zonas muestreadas en las Islas Galápagos. De color verde se encuentra el Parque Nacional Galápagos. En gris se encuentran las zonas agrícolas-urbanas. En puntos rojos se encuentran las fuentes naturales de agua dulce. En color naranja se encuentran las zonas muestreadas de fuentes de agua salobre. En color azul se encuentran las zonas muestreadas de fuentes de agua dulce.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 16S Barcoding Kit 1-24*. (n.d.). Retrieved December 20, 2023, from <https://store.nanoporetech.com/16s-barcoding-kit-1-24.html>
- Acharya, K., Khanal, S., Pantha, K., Amatya, N., Davenport, R. J., & Werner, D. (2019). A comparative assessment of conventional and molecular methods, including MinION nanopore sequencing, for surveying water quality. *Scientific Reports*, *9*(1), 15726. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51997-x>
- Adelinet, M., Fortin, J., d'Ozouville, N., & Violette, S. (2008). The relationship between hydrodynamic properties and weathering of soils derived from volcanic rocks, Galapagos Islands (Ecuador). *Environmental Geology*, *56*(1), 45–58. <https://doi.org/10.1007/s00254-007-1138-3>
- Asigau, S., Hartman, D. A., Higashiguchi, J. M., & Parker, P. G. (2017). The distribution of mosquitoes across an altitudinal gradient in the Galapagos Islands. *Journal of Vector Ecology*, *42*(2), 243–253. <https://doi.org/10.1111/jvec.12264>
- Axelsson-Olsson, D., Olofsson, J., Svensson, L., Griekspoor, P., Waldenström, J., Ellström, P., & Olsen, B. (2010). Amoebae and algae can prolong the survival of *Campylobacter* species in co-culture. *Experimental Parasitology*, *126*(1), 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.12.016>
- Ballesteros-Mejia, L., Angulo, E., Diagne, C., Cooke, B., Nuñez, M. A., & Courchamp, F. (2021). Economic costs of biological invasions in Ecuador: The importance of the Galapagos Islands. *NeoBiota*, *67*, 375–400. <https://doi.org/10.3897/neobiota.67.59116>
- Barberán, A., & Casamayor, E. (2010). Global phylogenetic community structure and β -diversity patterns in surface bacterioplankton metacommunities. *Aquatic Microbial Ecology*, *59*, 1–10. <https://doi.org/10.3354/ame01389>

- Behera, P., Mahapatra, S., Mohapatra, M., Kim, J. Y., Adhya, T. K., Raina, V., Suar, M., Pattnaik, A. K., & Rastogi, G. (2017). Salinity and macrophyte drive the biogeography of the sedimentary bacterial communities in a brackish water tropical coastal lagoon. *Science of The Total Environment*, *595*, 472–485.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.271>
- Brett, M. T., Bunn, S. E., Chandra, S., Galloway, A. W. E., Guo, F., Kainz, M. J., Kankaala, P., Lau, D. C. P., Moulton, T. P., Power, M. E., Rasmussen, J. B., Taipale, S. J., Thorp, J. H., & Wehr, J. D. (2017). How important are terrestrial organic carbon inputs for secondary production in freshwater ecosystems? *Freshwater Biology*, *62*(5), 833–853.
<https://doi.org/10.1111/fwb.12909>
- Carraro, L., Mächler, E., Wüthrich, R., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA allows upscaling spatial patterns of biodiversity in freshwater ecosystems. *Nature Communications*, *11*(1), 3585. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17337-8>
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(1), 278–288.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>
- Castelle, C. J., Brown, C. T., Anantharaman, K., Probst, A. J., Huang, R. H., & Banfield, J. F. (2018). Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(10), 629–645.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0076-2>
- Custodio, M., Espinoza, C., Peñaloza, R., Peralta-Ortiz, T., Sánchez-Suárez, H., Ordinola-Zapata, A., & Vieyra-Peña, E. (2022). Microbial diversity in intensively farmed lake sediment contaminated by heavy metals and identification of microbial taxa

bioindicators of environmental quality. *Scientific Reports*, 12(1), 80.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-03949-7>

Echelpoel, Forio, Heyden, Bermúdez, Ho, Moncayo, Narea, Granda, Sanchez, & Goethals.

(2019). Spatial Characteristics and Temporal Evolution of Chemical and Biological Freshwater Status as Baseline Assessment on the Tropical Island San Cristóbal (Galapagos, Ecuador). *Water*, 11(5), 880. <https://doi.org/10.3390/w11050880>

Eichler, S., Christen, R., Höltje, C., Westphal, P., Bötzel, J., Brettar, I., Mehling, A., & Höfle,

M. G. (2006). Composition and Dynamics of Bacterial Communities of a Drinking Water Supply System as Assessed by RNA- and DNA-Based 16S rRNA Gene Fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1858–1872.

<https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1858-1872.2006>

Fujiyoshi, S., Muto-Fujita, A., & Maruyama, F. (2020). Evaluation of PCR conditions for characterizing bacterial communities with full-length 16S rRNA genes using a portable nanopore sequencer. *Scientific Reports*, 10(1), 12580.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-69450-9>

Georges Des Aulnois, M., Roux, P., Caruana, A., Réveillon, D., Briand, E., Hervé, F., Savar,

V., Bormans, M., & Amzil, Z. (2019). Physiological and Metabolic Responses of Freshwater and Brackish-Water Strains of *Microcystis aeruginosa* Acclimated to a Salinity Gradient: Insight into Salt Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(21), e01614-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01614-19>

Gerhard, W. A., Choi, W. S., Houck, K. M., & Stewart, J. R. (2017). Water quality at points-

of-use in the Galapagos Islands. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(2), 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.01.010>

- Girvan, M. S., Campbell, C. D., Killham, K., Prosser, J. I., & Glover, L. A. (2005). Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology*, 7(3), 301–313. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00695.x>
- Godoy, B. S., Valente-Neto, F., Queiroz, L. L., Holanda, L. F. R., Roque, F. O., Lodi, S., & Oliveira, L. G. (2022). Structuring functional groups of aquatic insects along the resistance/resilience axis when facing water flow changes. *Ecology and Evolution*, 12(3), e8749. <https://doi.org/10.1002/ece3.8749>
- Gogina, M., Lipka, M., Woelfel, J., Liu, B., Morys, C., Böttcher, M. E., & Zettler, M. L. (2018). In Search of a Field-Based Relationship Between Benthic Macrofauna and Biogeochemistry in a Modern Brackish Coastal Sea. *Frontiers in Marine Science*, 5, 489. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00489>
- Gołębiewski, M., Całkiewicz, J., Creer, S., & Piwosz, K. (2017). Tideless estuaries in brackish seas as possible freshwater-marine transition zones for bacteria: The case study of the Vistula river estuary. *Environmental Microbiology Reports*, 9(2), 129–143. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12509>
- Henriques, I. S., Alves, A., Tacão, M., Almeida, A., Cunha, Â., & Correia, A. (2006). Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 68(1–2), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2006.01.015>
- Herrmann, M., Wegner, C.-E., Taubert, M., Geesink, P., Lehmann, K., Yan, L., Lehmann, R., Totsche, K. U., & Küsel, K. (2019). Predominance of Cand. Patescibacteria in Groundwater Is Caused by Their Preferential Mobilization From Soils and Flourishing

Under Oligotrophic Conditions. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1407.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01407>

Jin, D., Kong, X., Cui, B., Jin, S., Xie, Y., Wang, X., & Deng, Y. (2018). Bacterial communities and potential waterborne pathogens within the typical urban surface waters. *Scientific Reports*, *8*(1), 13368. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31706-w>

Kamada, S., Wakabayashi, R., & Naganuma, T. (2023). Phylogenetic Revisit to a Review on Predatory Bacteria. *Microorganisms*, *11*(7), 1673.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11071673>

Kirs, M., Kisand, V., Nelson, C. E., Dudoit, T., & Moravcik, P. S. (2020). Distinct bacterial communities in tropical island aquifers. *PLOS ONE*, *15*(4), e0232265.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232265>

Kisand, Veljo., Andersson, Nina., & Wikner, Johan. (2005). Bacterial freshwater species successfully immigrate to the brackish water environment in the northern Baltic.

Limnology and Oceanography, *50*(3), 945–956.

<https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.3.0945>

Klair, D., Dobhal, S., Ahmad, A., Hassan, Z. U., Uyeda, J., Silva, J., Wang, K.-H., Kim, S., Alvarez, A. M., & Arif, M. (2023). Exploring taxonomic and functional microbiome of Hawaiian stream and spring irrigation water systems using Illumina and Oxford Nanopore sequencing platforms. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1039292.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1039292>

Latorre-Pérez, A., Gimeno-Valero, H., Tanner, K., Pascual, J., Vilanova, C., & Porcar, M. (2021). A Round Trip to the Desert: In situ Nanopore Sequencing Informs Targeted Bioprospecting. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 768240.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.768240>

- Li, L., Huang, D., Hu, Y., Rudling, N. M., Canniffe, D. P., Wang, F., & Wang, Y. (2023). Globally distributed Myxococcota with photosynthesis gene clusters illuminate the origin and evolution of a potentially chimeric lifestyle. *Nature Communications*, *14*(1), 6450. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42193-7>
- Li, Q.-M., Zhou, Y.-L., Wei, Z.-F., & Wang, Y. (2021). Phylogenomic Insights into Distribution and Adaptation of Bdellovibrionota in Marine Waters. *Microorganisms*, *9*(4), 757. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040757>
- Li, Y., Evans, N. T., Renshaw, M. A., Jerde, C. L., Olds, B. P., Shogren, A. J., Deiner, K., Lodge, D. M., Lamberti, G. A., & Pfrender, M. E. (2018). Estimating fish alpha- and beta-diversity along a small stream with environmental DNA metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, *2*, e24262. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.24262>
- Lijuan R., Dan H., Peng X., Yujing W., & Qinglong W. (2014). Bacterial diversity and ecological function in lake water bodies: Bacterial diversity and ecological function in lake water bodies. *Biodiversity Science*, *21*(4), 421–432. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1003.2013.12052>
- Liu, J. (2011). *Contaminación del agua en Puerto Ayora: Investigación interdisciplinaria aplicada utilizando Escherichia coli como una bacteria indicador*.
- López, C., Steinitz-Kannan, M., Domínguez-Granda, L., Soto, L. M., Gomes-Barbosa, L., Karpowicz, M., Dos Santos-Silva, E. N., Arcifa, M. S., & Marrone, F. (2021). Loss of a freshwater copepod species from El Junco Lake, Galápagos following the introduction and eradication of the Nile tilapia. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, *31*(12), 3651–3656. <https://doi.org/10.1002/aqc.3718>
- Mateus, C., Guerrero, C. A., Quezada, G., Lara, D., & Ochoa-Herrera, V. (2019). An Integrated Approach for Evaluating Water Quality between 2007–2015 in Santa Cruz

- Island in the Galapagos Archipelago. *Water*, 11(5), 937.
<https://doi.org/10.3390/w11050937>
- Mauvisseau, Q., Harper, L. R., Sander, M., Hanner, R. H., Kleyer, H., & Deiner, K. (2022). The Multiple States of Environmental DNA and What Is Known about Their Persistence in Aquatic Environments. *Environmental Science & Technology*, 56(9), 5322–5333. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07638>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Moreno, C. E., Barragán, F., Pineda, E., & Pavón, N. P. (2011). Reanálisis de la diversidad alfa: Alternativas para interpretar y comparar información sobre comunidades ecológicas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(4).
<https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2011.4.745>
- Moss, B. (1994). *Brackish and freshwater shallow lakes—Different systems or variations on the same theme?*
- Nagy, L., Forsberg, B. R., & Artaxo, P. (Eds.). (2016). *Interactions Between Biosphere, Atmosphere and Human Land Use in the Amazon Basin* (Vol. 227). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-49902-3>
- Native Barcoding Kit 24 V14*. (n.d.). Retrieved December 20, 2023, from <https://store.nanoporetech.com/native-barcoding-kit-24-v14.html>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, et al. (2019). Community ecology package. R package version, 2(6), 1-296.

- Olmedo, J., & Cayot, L. J. (1994). *Introduced geckos in the towns of Santa Cruz, San Cristobal and Isabela.*
- Overbey, K. N., Hatcher, S. M., & Stewart, J. R. (2015). Water quality and antibiotic resistance at beaches of the Galápagos Islands. *Frontiers in Environmental Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00064>
- Paerl, H. W., & Pinckney, J. L. (1996). A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microbial Ecology*, 31(3). <https://doi.org/10.1007/BF00171569>
- Percent, S. F., Frischer, M. E., Vescio, P. A., Duffy, E. B., Milano, V., McLellan, M., Stevens, B. M., Boylen, C. W., & Nierzwicki-Bauer, S. A. (2008). Bacterial Community Structure of Acid-Impacted Lakes: What Controls Diversity? *Applied and Environmental Microbiology*, 74(6), 1856–1868. <https://doi.org/10.1128/AEM.01719-07>
- Pittock, J., & Finlayson, C. M. (2011). Freshwater Ecosystem Conservation: Principles versus policy. In D. Connell & Q. Grafton (Eds.), *Basin Futures: Water reform in the Murray-Darling Basin*. ANU Press. <https://doi.org/10.22459/BF.05.2011.02>
- Polpass Arul, M., Lahuatte, P., Causton, C. E., Heimpel, G. E., Jurkevitch, E., & Yuval, B. (2021). Shifting microbiomes complement life stage transitions and diet of the bird parasite *Philornis downsi* from the Galapagos Islands. *Environmental Microbiology*, 23(9), 5014–5029. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15435>
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

- Rath, A. R., & Mitbavkar, S. (2023). Diatom community dynamics in a tropical brackish coastal ecosystem from an ecological and biogeochemical perspective: A size-fractionated approach. *Continental Shelf Research*, 263, 105039.
<https://doi.org/10.1016/j.csr.2023.105039>
- Re, V., Rizzi, J., Tuci, C., Tringali, C., Mancin, M., Mendieta, E., & Marcomini, A. (2023). Challenges and opportunities of water quality monitoring and multi-stakeholder management in small islands: The case of Santa Cruz, Galápagos (Ecuador). *Environment, Development and Sustainability*, 25(5), 3867–3891.
<https://doi.org/10.1007/s10668-022-02219-4>
- Riascos-Flores, L., Bruneel, S., Van Der Heyden, C., Deknock, A., Van Echelpoel, W., Forio, M. A. E., De Saeyer, N., Vanden Berghe, W., Spanoghe, P., Bermudez, R., Dominguez-Granda, L., & Goethals, P. (2021). Polluted paradise: Occurrence of pesticide residues within the urban coastal zones of Santa Cruz and Isabela (Galapagos, Ecuador). *Science of The Total Environment*, 763, 142956.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142956>
- Rodríguez, P. L., & Castro, K. (2015). *EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INTERPRETATIVO PARA EL APROVECHAMIENTO TURÍSTICO DE LOS SITIOS DESTINADOS A LA PESCA VIVENCIAL DE LAS ÁREAS PROTEGIDAS DE GALÁPAGOS*.
- Salas-Gonzalez, I. (2019). *isaisg/ohchibi: iskali (v1.0.0)*. Zenodo.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.2593691>
- Sanders, R., Caron, D., & Berninger U, G. (1992). Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: An inter-ecosystem comparison. *Marine Ecology Progress Series*, 86, 1–14.
<https://doi.org/10.3354/meps086001>

- Schenekar, T. (2023). The current state of eDNA research in freshwater ecosystems: Are we shifting from the developmental phase to standard application in biomonitoring? *Hydrobiologia*, 850(6), 1263–1282. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04891-z>
- Schmitt, S., Conroy, J. L., Flynn, T. M., Sanford, R. A., Higley, M. C., Chen, M., & Fouke, B. W. (2019). Salinity, microbe and carbonate mineral relationships in brackish and hypersaline lake sediments: A case study from the tropical Pacific coral atoll of Kiritimati. *The Depositional Record*, 5(2), 212–229. <https://doi.org/10.1002/dep2.71>
- Shengbin C., Zhiyun O., Weihua X., & Yi X. (2010). A review of beta diversity studies. *Biodiversity Science*, 18(4), 323. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1003.2010.323>
- Sinton, L., Hall, C., & Braithwaite, R. (2007). Sunlight inactivation of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica*, compared with *Escherichia coli*, in seawater and river water. *Journal of Water and Health*, 5(3), 357–365. <https://doi.org/10.2166/wh.2007.031>
- Sockett, R. E. (2009). Predatory Lifestyle of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 523–539. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073346>
- Spens, J., Evans, A. R., Halfmaerten, D., Knudsen, S. W., Sengupta, M. E., Mak, S. S. T., Sigsgaard, E. E., & Hellström, M. (2017). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: Advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635–645. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12683>
- Tang, X., Xie, G., Shao, K., Tian, W., Gao, G., & Qin, B. (2021). Aquatic Bacterial Diversity, Community Composition and Assembly in the Semi-Arid Inner Mongolia Plateau: Combined Effects of Salinity and Nutrient Levels. *Microorganisms*, 9(2), 208. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020208>

- Větrovský, T., & Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS ONE*, 8(2), e57923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>
- Violette, S., d'Ozouville, N., Pryet, A., Deffontaines, B., Fortin, J., & Adelinet, M. (2014). Hydrogeology of the Galápagos Archipelago: An Integrated and Comparative Approach Between Islands. In K. S. Harpp, E. Mittelstaedt, N. d'Ozouville, & D. W. Graham (Eds.), *Geophysical Monograph Series* (1st ed., pp. 167–183). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118852538.ch9>
- Waiser, M. J., & Robarts, R. D. (1997). *Impacts of a herbicide and fertilizers on the microbial community of a saline prairie lake*. 54.
- Walsh, S., McCleary, A., Heumann, B., Brewington, L., Raczkowski, E. & Mena, C. (2010). Community Expansion and Infrastructure Development: Implications for Human Health and Environmental Quality in the Galápagos Islands of Ecuador. *Journal of Latin American Geography*, 9(3), 137–159. <https://doi.org/10.1353/lag.2010.0024>
- Walsh, S. J., & Mena, C. F. (Eds.). (2013). *Science and Conservation in the Galapagos Islands: Frameworks & Perspectives* (Vol. 1). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5794-7>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4.
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2407. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>

- Yang, H., Hu, J., Long, X., Liu, Z., & Rengel, Z. (2016). Salinity altered root distribution and increased diversity of bacterial communities in the rhizosphere soil of Jerusalem artichoke. *Scientific Reports*, 6(1), 20687. <https://doi.org/10.1038/srep20687>
- Zimmermann, J., Portillo, M. C., Serrano, L., Ludwig, W., & Gonzalez, J. M. (2012). Acidobacteria in Freshwater Ponds at Doñana National Park, Spain. *Microbial Ecology*, 63(4), 844–855. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9988-3>