

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Comparación entre comunidades bacterianas del perifiton en ríos
con distinto nivel de intermitencia tropical**

Isabela Ortega Luna

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera Biotecnóloga

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

**Comparación entre comunidades bacterianas del perifiton en ríos con
distinto nivel de intermitencia tropical**

Isabela Ortega Luna

Nombre del profesor, Título académico

Andrea Encalada, Ph.D.

Nombre del profesor, Título académico

Juan José Guadalupe, 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: Isabela Ortega Luna

Código: 00210240

Cédula de identidad: 1755699012

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

Los ríos son ecosistemas vitales para la vida en la Tierra; aquellos que experimentan interrupciones periódicas en su flujo se denominan ríos intermitentes. El estudio de estos cuerpos de agua es crucial para comprender mejor su función ecológica. Los ríos estacionales de los trópicos ofrecen un escenario interesante para investigar los impactos de la intermitencia fluvial, como es el caso del río Cube, ubicado en el Chocó Andino ecuatoriano. Dentro de los ríos, los microorganismos pueden concentrarse en biopelículas como el perifiton, el cual consiste en una matriz que alberga algas, hongos, bacterias e incluso protozoos. En el perifiton, microorganismos como las bacterias responden ante cambios estacionales, por lo que identificar posibles factores que causan cambios en la composición de comunidades bacterianas permitiría comprender mejor cómo la intermitencia afecta los procesos ecosistémicos en los ríos. En este estudio se empleó el secuenciamiento del gen 16S ARNr para identificar y caracterizar la diversidad bacteriana del perifiton en dos sitios de la cuenca del Cube, analizando la variación en tres meses de la época seca. Se encontró que la riqueza y diferencias entre las muestras podrían estar influenciada por factores inherentes al sitio en el que se toma la muestra. Por otro lado, la equitatividad (evenness) de la comunidad fue principalmente influenciado por las condiciones del mes de colecta. Estos hallazgos son un primer paso para comprender los factores que afectan a las comunidades bacterianas en los ríos intermitentes.

Palabras clave: Ríos intermitentes, estacionalidad, diversidad, bacterias, perifiton, Chocó Andino.

ABSTRACT

Rivers are vital ecosystems for life on Earth; those that experience periodic interruptions in their flow are known as intermittent rivers. Studying these water bodies is crucial for a better understanding of their ecological function. Seasonal rivers in the tropics provide an intriguing setting to investigate the impacts of fluvial intermittency, such as the case of the Cube River, located in the Ecuadorian Andean Chocó. Within rivers, microorganisms can be concentrated in biofilms like periphyton, which consist of a matrix that contains algae, fungi, bacteria, and even protozoa. In periphyton, microorganisms such as bacteria respond to seasonal changes, so identifying potential factors causing shifts in bacterial community composition would allow us to understand how intermittency affects ecosystem processes in rivers. This study employed 16S rRNA gene sequencing to identify and characterize bacterial diversity in periphyton at two sites in the Cube River basin, and to analyze variation across three months in the dry season. We found that richness and differences among samples might be influenced by inherent site-specific factors, while community evenness was primarily influenced by collection month conditions. These findings represent a first step to understand the factors that impact bacterial communities in intermittent rivers.

Keywords: Intermittent rivers, seasonality, diversity, bacteria, periphyton, Andean Chocó.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	11
2. Métodos	15
2.1 Área de investigación y toma de muestra.....	15
2.2 Extracción de ADN	15
2.3 Secuenciamiento y análisis bioinformático.....	15
3. Resultados.....	17
1.1 Concentraciones e índices de calidad de ADN extraído	17
1.2 Análisis diferencial de abundancias de clases de bacterias.....	17
1.3 Comparación de riqueza y equitatividad entre sitios	18
1.4 Comparación de riqueza y equitatividad entre campañas de colecta	18
1.5 Análisis de coordenadas principales	19
4. Discusión	20
5. Conclusiones.....	24
6. Tablas.....	25
7. Figuras	27
Referencias Bibliográficas	31
Anexos	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones y calidad del ADN extraído de las muestras.....	25
Tabla 2. Índices de alfa diversidad.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de abundancias relativas de las clases de bacterias encontradas	27
Figura 2. Comparación de la riqueza y equitatividad entre sitios de colecta.....	28
Figura 3. Comparación de la riqueza y equitatividad entre las campañas de colecta	29
Figura 4. PCoA de las comunidades bacterianas de los sitios de colecta	30

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Sitios de muestreo en la cuenca hidrográfica del Cube.....	37
Anexo 2. Fotografías de los dos sitios de muestreo en las tres campañas de colecta.....	38
Anexo 3. Hidrograma de la cuenca hidrográfica del Cube.....	39

1. INTRODUCCIÓN

Un río se define como una corriente natural de agua que fluye por gravedad a lo largo de un canal, dando forma a un ecosistema acuático complejo de vital importancia ecológica para la vida en la tierra (Huang et al., 2020; Bandyopadhyay, 2018). El agua en los ríos funciona como recurso o hábitat para seres vivos, y al mismo tiempo actúa como un medio que facilita la conectividad e intercambio de energía, materiales y organismos (Sponseller et al., 2013). Para los seres humanos, los ríos constituyen una fuente de agua dulce para el uso doméstico, industrial y agrícola. De acuerdo con el periodo de actividad del flujo de agua, un río puede ser clasificado como perenne o intermitente (Huang et al., 2020). Los ríos perennes se distinguen por mantener un flujo de agua continuo a lo largo de todo el año; mientras que los ríos intermitentes, también llamados temporales o estacionales, experimentan interrupciones periódicas en su flujo, ya sea en uno o más segmentos de su curso (Messenger et al., 2021; Leigh et al., 2016).

Los canales intermitentes conforman más de la mitad de la red fluvial global. (Datry, et al., 2014a). Sin embargo, durante varias décadas, las investigaciones se han centrado en ríos perennes, por lo que hay una menor cantidad de información sobre cuerpos de agua estacionales (Borg et al., 2019; Datry, et al., 2014a; Eng et al., 2016; Fovet et al., 2021; Jaeger et al., 2014; Pumo et al., 2016). Esta falta de reconocimiento de los arroyos intermitentes resulta en una gestión deficiente de los mismos y la escasez de datos representa un desafío para lograr una comprensión holística de estos sistemas (Fovet et al., 2021). En los últimos años, el interés en los ríos intermitentes se ha incrementado debido a que albergan una biodiversidad resistente y resiliente; así como por la necesidad de comprender la influencia del cambio climático y actividades humanas en su régimen hidrológico (Fovet et al., 2021; Sabater et al., 2016; Šarauskienė et al., 2020). La inclusión relativamente reciente de los ríos intermitentes en la ecología de agua dulce a nivel global y regional podría representar un cambio significativo en

la comprensión del papel que desempeñan los ríos en la regulación de flujos de materiales y en la preservación de la biodiversidad (Datry et al., 2014a).

La investigación y proyectos relacionados a redes fluviales estacionales están creciendo en alcance y profundidad de conocimiento (Datry et al., 2017; Datry et al., 2014a; Datry et al., 2014b; Leigh et al., 2016; Magand et al., 2020). Por ejemplo, el proyecto DRYvER busca predecir cambios en los patrones de intermitencia, con datos de diversos sistemas intermitentes de Europa y Suramérica (DRYvER, 2020; Datry et al., 2021). Es importante cubrir la variedad de ríos intermitentes para lograr un conocimiento unificado, lo que implica incluir áreas que han recibido poca atención como las regiones tropicales (Fovet et al., 2021). En los trópicos, los ríos estacionales generan pozas de agua que se conectan y desconectan con los cambios en el nivel superficial y flujo subterráneo de agua, lo cual es interesante porque da paso a comunidades muy diversas (Sharma y Dutta, 2020). En este escenario, áreas identificadas como *hotspots*, o puntos críticos de biodiversidad, son de particular interés por su alta biodiversidad endémica (Medina-Rivas et al., 2016). Uno de estos *hotspots* es la región biogeográfica del Chocó, el noveno punto con mayor biodiversidad de la Tierra (Datry et al., 2021). El Chocó se extiende a lo largo de las costas del océano Pacífico desde Panamá hasta alcanzar el norte de Ecuador (Tinoco et al., 2023). Dentro del Chocó Andino ecuatoriano, en la provincia de Esmeraldas, se encuentra la cuenca hidrográfica del Cube, cuyo cauce principal es un río perenne y sus nacientes, en su mayoría, son ríos intermitentes (Datry et al., 2021). Por estas razones, la cuenca del Cube se presenta como una zona relevante para investigar los efectos de la intermitencia fluvial.

En ríos, la comunidad de microorganismos es fundamental debido a que desempeñan funciones que impactan a niveles superiores en el ecosistema (Li et al., 2021). Dentro de ecosistemas fluviales, se ha reportado que las biopelículas o biofilms, son puntos ricos en biodiversidad microbiana ribereña (Battin et al., 2016). El biofilm que se forma en superficies sumergidas en

ríos y arroyos también se denomina como “perifiton”, el cual está conformado por una comunidad compleja de microorganismos, como algas, bacterias, hongos y protozoos, embebidos en una matriz de proteínas y polisacáridos (Montuelle et al., 2010; Saltos, 2022). Los microorganismos dentro del perifiton interactúan fuertemente y son responsables del mayor aporte de energía a través de la producción primaria (Montuelle et al., 2010). La comunidad de microorganismos en el perifiton responde a cambios en su ambiente, por lo que puede ser usado como un bioindicador que permite evaluar el estado de un ecosistema (Peña et al., 2017; Montuelle et al., 2010).

En el perifiton, la comunidad bacteriana desempeña un rol importante debido a que sus miembros pueden participar en ciclos biogeoquímicos y también realizar procesos relacionados con la descomposición de la materia orgánica. La comunidad bacteriana es un indicador importante del estado del cuerpo de agua, pues la presencia de ciertas especies de bacterias puede indicar contacto con contaminantes (Zaghloul et al., 2020). Además, la diversidad y función microbiana está estrechamente ligada a las fases hidrológicas, por lo que pueden aportar información sobre los efectos de la intermitencia en sistemas estacionales (Romaní et al., 2017). Investigaciones previas indican que los ciclos temporales influyen en la composición de la comunidad bacteriana al alterar la abundancia de especies específicas (Rubin y Leff, 2007). Estas alteraciones en la comunidad podrían influir en el rol de las bacterias en el ecosistema por las funciones inherentes entre los taxones bacterianos (Philippot et al., 2021). Por consiguiente, investigar microorganismos como bacterias en muestras de perifiton podría resultar útil para entender el impacto la estacionalidad en una comunidad que cumple un rol importante en procesos ecosistémicos del río.

En cuanto a los métodos disponibles para estudiar la diversidad bacteriana, las técnicas moleculares actuales ofrecen la oportunidad de obtener información sobre la composición de la comunidad de manera rápida y eficiente, pues no requieren de medios de cultivo y es posible

identificar especies que no son detectadas por métodos tradicionales (Zwart et al., 2002). Los enfoques moleculares han demostrado ser valiosos para lograr una comprensión más completa de la diversidad microbiana, uno de los métodos que se utiliza para estudiar la comunidad de microorganismos consiste en secuenciar un gen o fragmento de ADN que permita identificar a las especies presentes en una muestra (Liu et al., 2020). Actualmente, el gen 16S ARNr es el que más se utiliza para el análisis de la diversidad bacteriana (Pédron et al., 2020). Gracias a tecnologías de secuenciamiento de nueva generación, se ha registrado información relacionada con cambios de las comunidades microbianas en el tiempo y con énfasis en diferentes factores ambientales (Ju y Zhang, 2015).

Estudiar la biodiversidad es de particular importancia por su valor intrínseco, los beneficios que puede proveer a los seres humanos y por las funciones que cumplen los organismos en su hábitat (Duffy, 2009; Patrick, 1997; Schneiders et al., 2012). Por estas razones, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar la diversidad de la comunidad bacteriana del perifiton y entender cómo cambia esta comunidad en dos sitios de cuenca del río Cube durante la época seca. En este trabajo se identificaron los grupos microbianos presentes en los dos lugares de estudio, en muestras recolectadas al inicio de los meses de agosto, octubre y diciembre de 2021. Se realizaron análisis de alfa y beta diversidad para identificar si existía una diferencia de las comunidades entre los sitios y entre los meses de colecta. También se realizó un breve análisis de los posibles factores que podrían estar involucrados en los cambios de la comunidad. Aunque este estudio proporciona una pequeña visión de lo que ocurre a nivel microscópico en el perifiton, también representa un avance para identificar cómo el lugar y los cambios estacionales impactan en las comunidades bacterianas en ríos con distintos patrones de intermitencia tropical. Ampliar la cantidad de muestras podría enriquecer aún más el análisis y tener aplicaciones potenciales en conservación y gestión responsable de los ecosistemas acuáticos.

2. MÉTODOS

2.1 Área de investigación y toma de muestra

Las muestras de perifiton utilizadas en este trabajo se recolectaron en dos puntos específicos de la cuenca del río Cube, ubicada en la provincia de Esmeraldas, Ecuador (**Anexo 1**). Los dos sitios de muestreo se denominan: Bilsa – Cuchilla y Quebrada – Plátano. Se tomaron muestras de ambos puntos en tres campañas de colecta en los meses de agosto, octubre y diciembre (**Anexo 2**). Las seis muestras fueron trasladadas a la Universidad San Francisco de Quito y se almacenaron en congelación en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal para su posterior procesamiento.

2.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se utilizó una muestra de 3 ml de perifiton y se siguió el protocolo del kit DNeasy® PowerSoil® Pro de QIAGEN (2023) con una modificación: después de agregar la solución C1, se incluyó un paso adicional de lisis con la solución C1 a 70°C durante 10 minutos. Los pasos posteriores se continuaron conforme se detalla en el manual. Todas las soluciones utilizadas en la extracción fueron proporcionadas por el kit. A continuación, para cuantificar la concentración y calidad de ADN, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop2000 (Invitrogen). El ADN extraído de cada muestra fue eluido usando la solución C6 provista por el kit y se mantuvo a -20°C.

2.3 Secuenciamiento y análisis bioinformático

El ADN extraído de cada una de las 6 muestras fue enviado a la empresa de biotecnología MacroGen, con sede en Corea del Sur, donde se llevó a cabo la secuenciación de las regiones V3-V4 del gen 16S ARNr. La tecnología de secuenciación fue Illumina MiSeq. Con los datos de las secuencias obtenidas, se siguió el flujo de trabajo del paquete de DADA2 (Callahan, 2015) en la herramienta RStudio para filtrar las secuencias de baja calidad y realizar la asignación taxonómica. Después, se procedió a limpiar las secuencias identificadas como

cloroplastos y mitocondrias, seguido de una rarefacción de las secuencias a 24,800 lecturas en cada muestra. Con la asignación taxonómica de ASVs de bacterias, se generó una tabla de conteos que se utilizó en R para evaluar la composición de las comunidades y llevar a cabo análisis de alfa y beta diversidad con los paquetes Ohchibi y Vegan (Oksanen, et al., 2023; Salas, 2019).

Los resultados de índices de alfa diversidad se agruparon para realizar comparaciones entre campañas de colecta y sitios de recolección, las cuales se evaluaron con una prueba estadística ANOVA para comprobar si existía una diferencia significativa entre sitios y campañas. Por otro lado, en el análisis de beta diversidad se obtuvo la matriz de disimilitud de Bray-Curtis, a partir de la cual se realizó un gráfico PCoA. En este caso, se realizó la prueba estadística PERMANOVA para determinar la varianza explicada por el modelo (R^2) y la significancia.

3. RESULTADOS

1.1 Concentraciones e índices de calidad de ADN extraído

A partir de las extracciones, se evaluó tanto la concentración como la calidad del ADN obtenido de las muestras (**Tabla 1**). El ADN extraído de cada una de las muestras cumplió con los criterios necesarios para ser enviado a secuenciar: las concentraciones superaron los 10 ng/μl y los valores del índice 260/280 se encontraban entre 1,7 y 2,5.

1.2 Análisis diferencial de abundancias de clases de bacterias

Con los archivos de las secuencias procesadas, se realizó el gráfico de abundancias relativas presentado en la **Figura 1**. Ambos puntos de recolección comparten las 11 clases predominantes que se visualizan en el gráfico, cuyos nombres se especifican en la leyenda de la **Figura 1**, mientras que las clases menos abundantes se encuentran agrupadas como “otros”. Aunque los dos sitios comparten las 11 clases presentadas en la figura, se observa que ciertas clases muestran una mayor prevalencia en uno de los sitios en contraste con el otro punto de colecta. Para empezar, en Bilsa-Cuchilla se encontró la mayor proporción de la clase Actinobacteria, especialmente en el mes de octubre, en el cual se encontró en un porcentaje de 27,3% del total de especies en la muestra. En este sitio también hay una mayor abundancia de Cyanobacteria, con una proporción de 7,4 a 10,2%, y Planctomycetes, de 5 a 8,6%. En comparación, Quebrada-Plátano tiene un 3% de Cyanobacteria y entre 3 a 6,5% de Planctomycetes en los tres meses. Es posible observar que clase Acidimicrobia también es más abundante en Bilsa (4,9 – 8,4%), pero esta diferencia no es tan marcada como la que se observa con las tres clases mencionadas previamente. En Bilsa también se observó que las proporciones de la clase Alphaproteobacteria cambian poco en los 3 meses de muestreo, con un rango de 21,5 – 27,3%, mientras que en la Quebrada-Plátano disminuye de 20,5% en agosto a 14,5% en diciembre.

Por otro lado, en Quebrada-Plátano se encontró una mayor proporción de la clase Anaerolineae, con una prevalencia entre 4,3 – 8,8%; mientras que la abundancia de esta clase disminuye considerablemente en Bilsa en un rango de 0,4 - 1,1%. En la Quebrada también se encontró una mayor abundancia de Gammaproteobacteria (10,5 – 15,2%), Bacteroidia (4,9 – 5,8%), y una mayor proporción correspondiente a clases de bacterias con abundancias bajas, las cuales se encuentran agrupadas como “otros” (22 – 29,4%). Las clases como Thermoleophilia y Verrucomicrobiae se mantienen porcentajes de abundancia que cambian poco durante los tres meses de colecta, con rangos entre 3,9 – 5,1% y 2,9 – 5,7%, respectivamente. Por otro lado, su abundancia en Bilsa disminuye considerablemente en el mes de octubre: Thermoleophilia baja a 2,2% y Verrucomicrobiae se reduce a 2,3%.

1.3 Comparación de riqueza y equitatividad entre sitios

Se obtuvieron los valores riqueza y equitatividad (evenness) de las 6 muestras (**Tabla 2**). Al realizar las comparaciones entre los dos sitios, la prueba estadística ANOVA demostró que no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de riqueza de Bilsa-Cuchilla y Quebrada-Plátano, con un valor P de 0,154 (**Figura 2A**). Sin embargo, se observa que la Quebrada tiene una tendencia a tener mayor diversidad que Bilsa; en la Quebrada, el rango se encuentra entre 1366 a 1822 especies, mientras que Bilsa tiene un rango de 1329 a 1364 especies.

De igual forma, tampoco se obtuvo una diferencia significativa en la equitatividad de la comunidad bacteriana de los dos sitios, pues el valor P de la prueba estadística fue 0,758 (**Figura 2B**). Los valores de equitatividad fueron mucho más similares entre ambos puntos de muestreo: en Bilsa el rango de valores fue de 0,90 a 0,92; mientras que la Quebrada tuvo un rango de 0,90 a 0,94 (**Tabla 2**).

1.4 Comparación de riqueza y equitatividad entre campañas de colecta

Al comparar los valores de acuerdo con el tiempo, no se encontró una diferencia significativa entre la riqueza de los tres meses de colecta, pues la prueba estadística indicó un valor P de 0,747 (**Figura 3A**). En este caso, no se identificó ningún mes que mostrara una clara tendencia hacia una mayor riqueza, pero es posible observar que la riqueza es muy similar en diciembre y agosto. El mes de octubre tuvo el rango de más amplio debido a que fue el mes en el que Bilsa tuvo el menor valor de riqueza (1240) y Quebrada tuvo su mayor valor (1897).

Por otro lado, en la **Figura 3B** se observó una clara diferencia entre los valores de equitatividad (evenness) de la comunidad en cada mes. La prueba ANOVA confirmó que esta diferencia era estadísticamente significativa, con un valor P de 0.0275. Se identificó que las comunidades bacterianas eran más uniformes durante diciembre y agosto. En diciembre los valores de equitatividad fueron de 0,94 en Quebrada y 0,92 en Bilsa, mientras que en el mes el valor la equidad fue de 0,92 en los dos sitios (**Tabla 2**). Por otro lado, en el mes de octubre se observó una disminución en la equidad de especies de la comunidad hacia 0,90 en ambos puntos de colecta.

1.5 Análisis de coordenadas principales

En cuanto al análisis de beta diversidad, se obtuvo el gráfico de PCoA, en el cual se observó una agrupación de las muestras en los dos extremos de acuerdo con sitio de colecta (**Figura 4**). Según el análisis estadístico PERMANOVA, no se encontró significancia en el efecto, lo que indica que no hay suficiente evidencia para demostrar que el factor sitio influye en las diferencias entre las muestras. No obstante, se obtuvo un valor de 0.433 en el R^2 , es decir el 43,3% de la de la varianza es explicada por el modelo, lo que sugiere que con un mayor número de muestras se podría comprobar estadísticamente que el factor sitio de colecta tiene un efecto sobre las diferencias entre las muestras.

4. DISCUSIÓN

Los resultados de la **figura 1** muestran comunidades compuestas por clases bacterianas que cumplen su rol en ciclos biogeoquímicos, degradación de materia orgánica y formación de biofilm (Pilgrim et al., 2022). Si bien hay investigaciones limitadas en ríos intermitentes del Chocó Andino que permitan realizar mejores comparaciones, las clases bacterianas identificadas en este estudio, como Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Cyanobacteria y Actinobacteria se han reportado previamente en ecosistemas acuáticos y en investigaciones realizadas en arroyos intermitentes (Cruaud, 2020; Febria et al., 2015). Para analizar las variaciones en la abundancia de clases, es importante considerar que el gráfico PCoA de la **figura 4** indica que las diferencias entre las muestras pueden deberse a factores inherentes al lugar. Aunque la prueba estadística no confirma que el efecto del factor sitio es significativo, esto podría estar relacionado con el pequeño tamaño de muestra, pues otros estudios han reportado que el lugar sí influye en la beta diversidad (Langenheder y Lindström, 2019; Sabater y Admiraal, 2005). Cambios en las condiciones físicas, químicas y biológicas entre sitios ofrecen nichos que pueden ser ocupados por diferentes especies (Sabater y Admiraal, 2005). Por esa razón, en los próximos párrafos se detalla la comparación de abundancias de las clases bacterianas entre los dos sitios de muestreo.

En el caso de las clases de bacterias encontradas en Bilsa-Cuchilla, la alta abundancia de Actinobacteria y Alphaproteobacteria (**Figura 1**) posiblemente se deba a que son clases de bacterias comunes en sedimentos de ríos (Timoner et al., 2014). La presencia de dichas clases podría estar fuertemente influenciada por la materia orgánica en el sitio, dado posee miembros con capacidad de descomponer compuestos orgánicos complejos (Freixa et al., 2016). Actinobacteria también puede sobrevivir largas condiciones de sequía gracias a su gruesa capa de peptidoglicano en la pared celular de bacterias gram-positivas, al igual que clase Bacilli (Gionchetta et al., 2019). Por lo tanto, la capacidad de estas dos clases de resistir la desecación

podría favorecer su prevalencia en la temporada seca. También se ha reportado que Planctomycetes tiene patrones de ocurrencia relacionados con Cyanobacteria (Svoboda, 2020). Esto se refleja en la **figura 1** donde ambas clases muestran una mayor presencia en Bilsa y disminuyen en conjunto en Quebrada.

Por otra parte, en Quebrada-Plátano se destaca una mayor proporción de ciertas clases compuestas principalmente por especies anaerobias, como Bacteroidia, así como otras clases exclusivamente conformadas por bacterias anaerobias estrictas, como Anaerolineae (Fang et al., 2017; Podosokorskaya et al., 2013). El notable aumento de estas clases en Quebrada probablemente se debe a que las condiciones del sitio favorecen microambientes anaeróbicos, pues el oxígeno dentro del perifiton depende de características físicas de la matriz que permitan su difusión (Pratiwi et al., 2011). En Quebrada también se observa una menor proporción de clases que pueden realizar fotosíntesis oxigénica como Cyanobacteria, lo cual también podría propiciar la abundancia de bacterias anaeróbicas al disminuir el grado de producción fotosintética del oxígeno, otro factor importante en la distribución de este elemento en el perifiton (Carlton y Wetzel, 1987). Otras clases como Gammaproteobacteria se caracterizan por exhibir una enorme variedad de fenotipos y capacidades metabólicas (Gao et al., 2019). Realizar inferencias con clases tan diversas presenta desafíos; aunque la **figura 1** presenta abundancias relativas a nivel de clase, una resolución taxonómica más específica sería beneficiosa para comprender mejor el rol de clases muy diversas en el sitio de muestreo.

La precisión taxonómica se ve restringida por características relacionadas con método de secuenciación. El secuenciamiento completo del gen 16S ARNr permite una mejor identificación taxonómica a nivel de género, a diferencia de una región restringida por el tamaño del amplicón en el secuenciamiento con Illumina (Numberger et al., 2019). Otra limitación es la escasez de información disponible en bases de datos sobre ciertas clases identificadas, como ocurre con Thermoleophilia, cuyas características se basan únicamente en

información obtenida a partir de la secuenciación del gen 16S ARNr (Hu et al., 2019). A pesar de que el uso de técnicas moleculares proporciona una visión más amplia de los microorganismos en muestras ambientales, es crucial continuar la investigación para identificar dónde se encuentran bacterias que no pueden ser cultivadas.

La composición de la comunidad provee información sobre la dinámica de las poblaciones bacterianas, pero otras medidas como la riqueza de especies y la equitatividad (evenness), también permiten comparar los sitios y entender cómo influyen efectos espaciotemporales en la composición bacteriana (Algarte et al., 2017). Aunque este estudio no identificó diferencias significativas en la riqueza y la equidad entre los sitios, es importante considerar que sólo se analizaron 6 muestras. Un tamaño de muestra reducido puede sobreestimar efectos individuales, lo que lleva a conclusiones erróneas (Møller y Jennions, 2002). Por esa razón, la tendencia hacia una mayor riqueza en la Quebrada (**Figura 2A**) subraya la importancia de llevar a cabo futuros análisis con un mayor número de muestras para verificar si realmente no existe una diferencia en la riqueza entre ambos sitios. Es posible que, al realizar un análisis con más muestras, se encuentren diferencias significativas en la riqueza debido a que las variaciones de especies en el perifiton están relacionadas con factores locales como nivel de nutrientes, luz y herbivoría (Algarte et al., 2017).

Aunque se necesitan comparaciones con muestras adicionales, la tendencia de una mayor riqueza en Quebrada-Plátano es interesante debido a que el sitio de muestreo se encuentra cerca de un cultivo de plátanos, característica de la que deriva su nombre. Generalmente se ha aceptado que la riqueza de especies se reduce como consecuencia de actividades antropogénicas, pero se ha reportado que actividades que provoquen un incremento en las concentraciones de nutrientes pueden aumentar la riqueza de especies en el perifiton (Ager et al., 2010; Algarte et al., 2017). Por ese motivo, la proximidad a una platanera podría ser un factor que afecta en la riqueza de especies debido a que los cultivos usualmente están

acompañados del uso de fertilizantes que proporcionan nichos ecológicos adicionales para diferentes especies bacterianas (Ren et al., 2020). No obstante, otras condiciones como temperatura, pH y la diferencia del dosel también podrían favorecer naturalmente el crecimiento de una mayor cantidad de especies en Quebrada-Plátano.

En cuanto a la comparación entre campañas de colecta, el hecho de que la comunidad experimente cambios la equitatividad (**Figura 3B**) indica que la presencia de ciertas poblaciones bacterianas es fluctuante a en el tiempo. Estudios de algas y bacterias del perifiton han reportado un aumento en la equidad relacionado a la temperatura, pero no con los niveles de nutrientes; es decir que una mayor temperatura acoplada a nutrientes limitados da lugar a una comunidad más uniforme (Piggott et al., 2015; Nelson et al., 2013). Por ello, una alta equitatividad durante diciembre y agosto podría estar relacionado con la temperatura y cambios en la disponibilidad de nutrientes en los dos meses, lo que da lugar comunidades más uniformes que en el mes de octubre. Es importante considerar que las reducciones en la equidad de la comunidad en respuesta a cambios ambientales pueden afectar la dinámica de los microorganismos dentro del perifiton (Wilsey y Potvin, 2000; Carles et al., 2021).

Considerando la importancia del perifiton en el ciclo de nutrientes y su valor como bioindicador, se recomienda realizar un análisis que incluya muestras de otros meses para entender la influencia de la temporada húmeda en la diversidad (Gulzar et al, 2017). También es necesario incluir otros organismos en el análisis, como algas, hongos e incluso macroinvertebrados, porque éstos también interactúan y tienen un impacto en las bacterias presentes en el perifiton (Tonkin et al., 2014). Los resultados de este estudio ofrecen una perspectiva muy pequeña de los factores que podrían influir en la comunidad bacteriana, pero son un primer paso en el que se detecta y cuantifica la biodiversidad, lo cual es un prerrequisito para entender cómo los procesos ecológicos e impactos antropogénicos podrían afectar a las bacterias del perifiton en ríos intermitentes (Ager et al., 2010)

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio se caracterizó la diversidad de la comunidad bacteriana del perifiton en dos sitios de cuenca del río Cube durante la época seca. Considerando las funciones que cumplen las clases identificadas en el ecosistema, se realizó un análisis de los posibles factores que influyen en las abundancias de las clases bacterianas entre los dos sitios de colecta.

También se realizaron análisis de alfa diversidad para comprender los posibles factores que afectan a la riqueza y equidad de las comunidades. Entre los dos sitios no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de riqueza y equitatividad. Únicamente se identificó que la equidad de la comunidad fue significativamente diferente entre los tres meses de la época seca en los que se recolectaron las muestras. En otras palabras, las condiciones del mes en esta temporada tienen un mayor impacto en la uniformidad de la comunidad que las condiciones del sitio.

Aunque no fue posible comprobar el efecto del factor sitio con la prueba estadística en los análisis de beta diversidad, el gráfico de PCoA sugiere que las características del sitio podrían influir en las diferencias entre las muestras. Un mayor tamaño muestra permitiría validar de manera más robusta los posibles efectos del sitio en la comunidad.

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una visión inicial sobre los factores que podrían impactar la comunidad bacteriana, representando un primer paso para comprender cómo los procesos ecológicos pueden afectar a las bacterias presentes en el perifiton de los ríos intermitentes. La inclusión de un mayor número de muestras que también pertenezcan a la época húmeda, junto con un análisis más amplio que incorpore otros organismos (como algas y hongos), permitiría obtener una comprensión más sólida de los factores que influyen en las comunidades bacterianas de los ecosistemas fluviales intermitentes.

6. TABLAS

Tabla 1. Concentraciones y calidad del ADN extraído de las muestras

Mes	Sitio de colecta	Código de la muestra	Concentración (ng/μl)	Índice 260/280	Índice 260/230
Agosto	Bilsa-Cuchilla	CUB-02-M4	31,2	1,79	0,07
	Quebrada-Plátano	CUB-12-M4	55,6	1,6	0,18
Octubre	Bilsa-Cuchilla	CUB-02-M5	50,1	1,85	0,75
	Quebrada-Plátano	CUB-12-M5	29	2,14	0,18
Diciembre	Bilsa-Cuchilla	CUB-02-M6	63	2,05	0,82
	Quebrada-Plátano	CUB-12-M6	40,1	1,74	0,43

Tabla 2. Índices de alfa diversidad

Mes	Sitio	Código de Muestra	Riqueza	Equidad (Evenness)	Índice Chao1	Índice de Shannon	Índice de Simpson	Inverso de Simpson
Agosto	Bilsa	Cub-02-M4	1364	0,92	1373,12	6,65	1,00	433,40
	Quebrada	Cub-12-M4	1522	0,92	1538,12	6,75	1,00	325,11
Octubre	Bilsa	Cub-02-M5	1240	0,90	1246,33	6,42	1,00	305,34
	Quebrada	Cub-12-M5	1897	0,90	1937,62	6,81	0,99	196,96
Diciembre	Bilsa	Cub-02-M6	1329	0,92	1338,41	6,64	1,00	406,46
	Quebrada	Cub-12-M6	1366	0,94	1366,38	6,75	1,00	473,06

7. FIGURAS

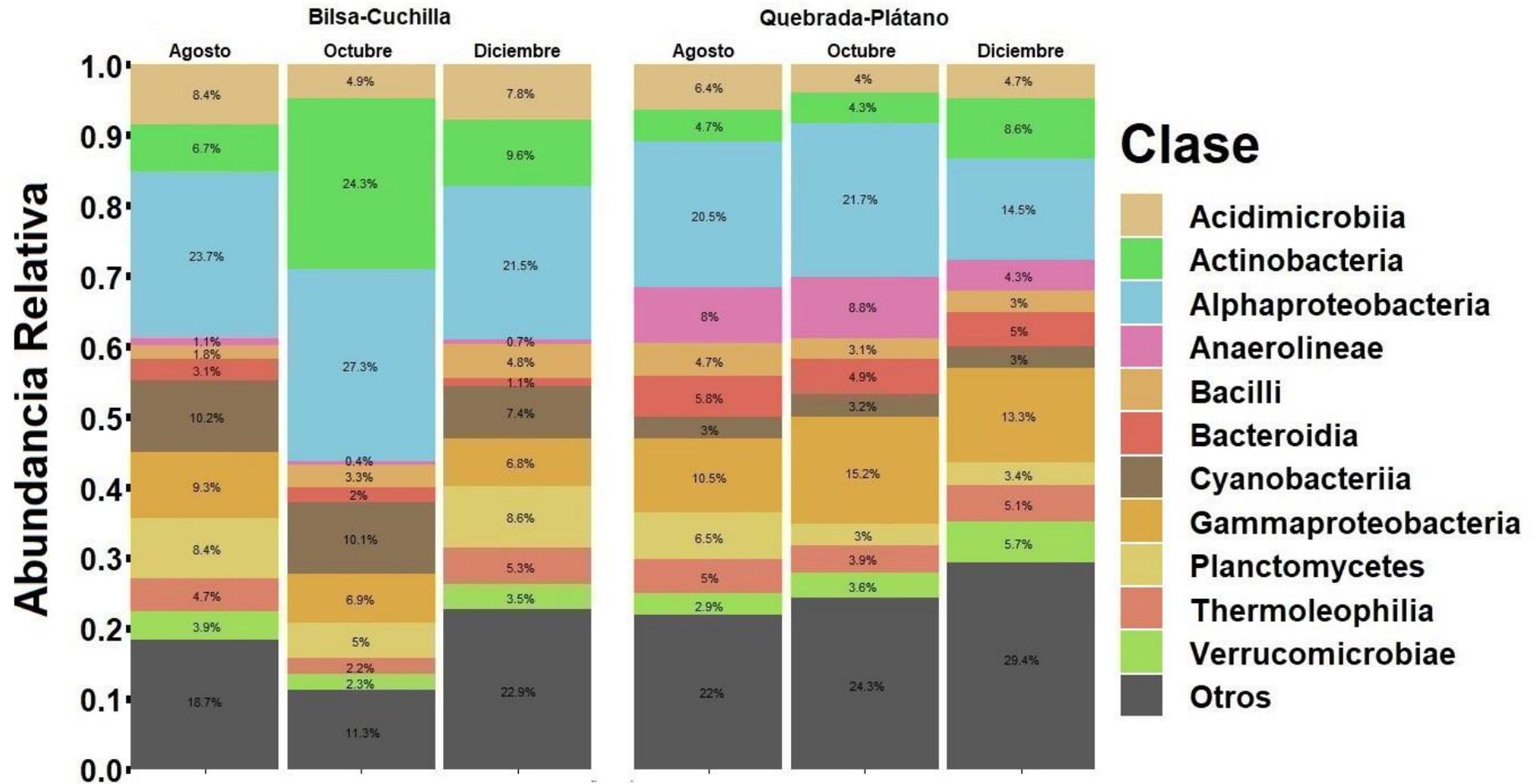


Figura 1. Gráfico de abundancias relativas de las clases de bacterias encontradas.

Representación gráfica de las proporciones de las clases bacterianas más abundantes identificadas en las muestras.

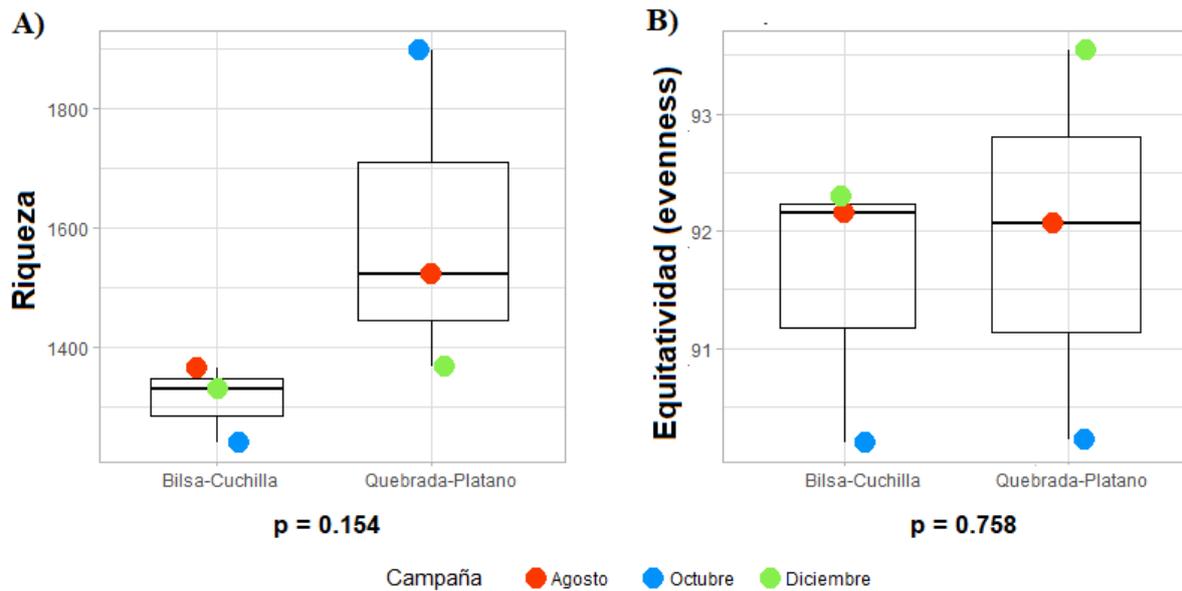


Figura 2. Comparación de la riqueza y equitatividad entre sitios de colecta.

A) El diagrama de caja (boxplot) muestra la riqueza de especies en Bilsa-Cuchilla y en Quebrada-Plátano. **B)** En el diagrama se representan los valores respecto a la equitatividad de la comunidad bacteriana en Bilsa-Cuchilla y en Quebrada-Plátano. Los puntos de colores representan los valores obtenidos en cada campaña de recolección.

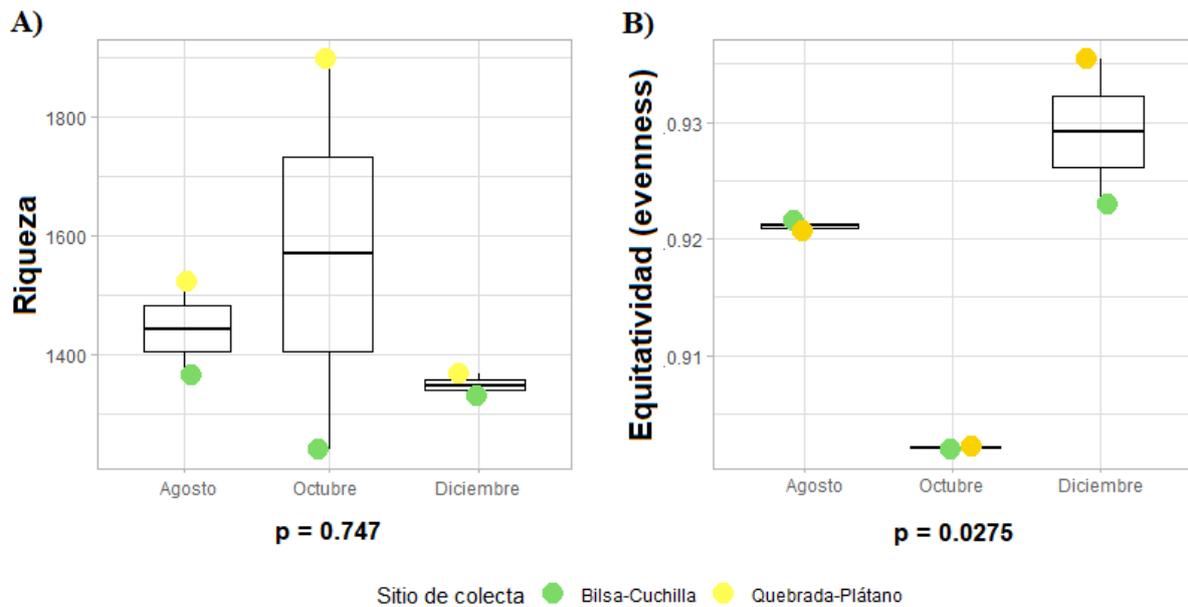


Figura 3. Comparación de la riqueza y equitatividad entre las campañas de colecta.

A) En el diagrama de caja (boxplot) se representa la distribución de los valores de la riqueza obtenidos en cada campaña. **B)** En el diagrama se ilustra la equitatividad de la comunidad bacteriana en las tres campañas de colecta. Los puntos de colores representan los valores obtenidos en cada sitio de muestreo.

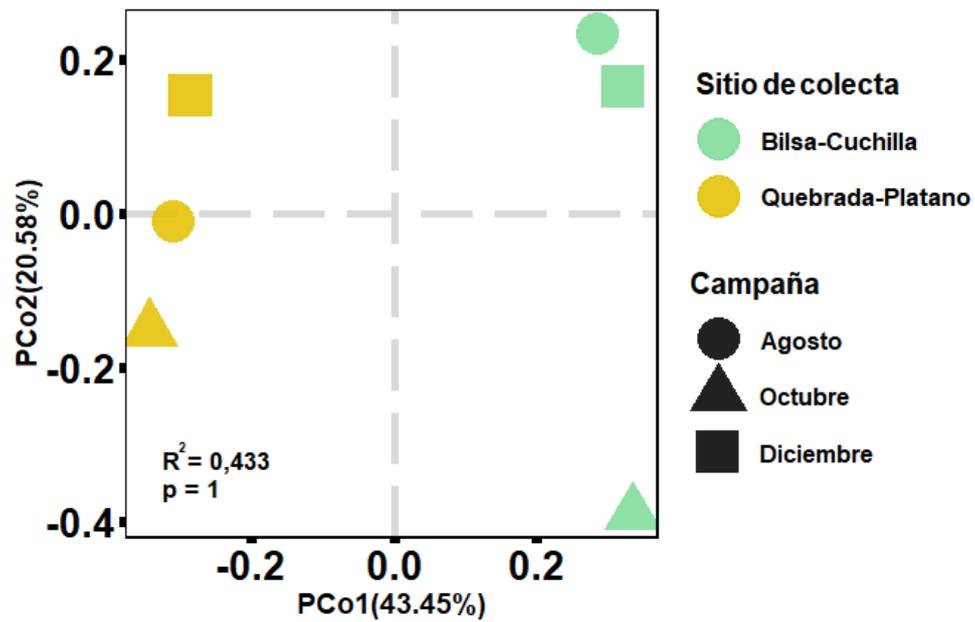


Figura 4. PCoA de las comunidades bacterianas de los sitios de colecta.

Análisis de coordenadas principales construido con la matriz de disimilitud de Bray-Curtis.

Se empleó la prueba PERMANOVA para encontrar la varianza explicada por el modelo (R^2)

y la significancia (p).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ager, D., Evans, S., Li, H., Lilley, A. K., & Van Der Gast, C. J. (2010). Anthropogenic disturbance affects the structure of bacterial communities. *Environmental microbiology*, *12*(3), 670-678.
- Algarte, V. M., Siqueira, N. S., Ruwer, D. T., Osório, N. C., & Rodrigues, L. (2017). Richness of periphytic algae and its relationship with hydrological attributes. *Brazilian Journal of Botany*, *40*(3), 735-740.
- Bandyopadhyay, J. (2018). Why we need a new perspective on rivers. Recuperado de <https://policycommons.net/artifacts/1348198/why-we-need-a-new-perspective-on-rivers/1960357/>
- Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M., & Packmann, A. I. (2016). The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(4), 251-263.
- Borg Galea, A., Sadler, J. P., Hannah, D. M., Datry, T., & Dugdale, S. J. (2019). Mediterranean intermittent rivers and ephemeral streams: Challenges in monitoring complexity. *Ecohydrology*, *12*(8), e2149.
- Callahan, B. (2015). DADA2 Pipeline Tutorial (1.16). GitHub. Recuperado de <https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>
- Carles, L., Wullschleger, S., Joss, A., Eggen, R. I., Schirmer, K., Schuwirth, N., ... & Tlili, A. (2021). Impact of wastewater on the microbial diversity of periphyton and its tolerance to micropollutants in an engineered flow-through channel system. *Water research*, *203*, 117486.
- Carlton, R. G., & Wetzel, R. G. (1987). Distributions and fates of oxygen in periphyton communities. *Canadian journal of botany*, *65*(5), 1031-1037.
- Cruaud, P., Vigneron, A., Dorea, C. C., Rodriguez, M. J., & Charette, S. J. (2020). Rapid changes in microbial community structures along a meandering river. *Microorganisms*, *8*(11), 1631.
- Datry, T., Allen, D., Argelich, R., Barquin, J., Bonada, N., Boulton, A., ... & Vinyoles, D. (2021). Securing biodiversity, functional integrity, and ecosystem services in drying river networks (DRYvER). *Research Ideas and Outcomes*, *7*, e77750.
- Datry, T., Larned, S. T., & Tockner, K. (2014a). Intermittent rivers: a challenge for freshwater ecology. *BioScience*, *64*(3), 229-235.
- Datry, T., Larned, S. T., Fritz, K. M., Bogan, M. T., Wood, P. J., Meyer, E. I., & Santos, A. N. (2014b). Broad-scale patterns of invertebrate richness and community composition in temporary rivers: Effects of flow intermittence. *Ecography*, *37*(1), 94-104.
- Datry, T., Singer, G., Sauquet, E., Capdevilla, D. J., Von Schiller, D., Subbington, R., ... & Zoppini, A. (2017). Science and management of intermittent rivers and ephemeral streams (SMIRES). *Research Ideas and Outcomes*, *3*, 23-p.

- DRYvER. 2020. About the Project. DRYvER. Recuperado de <https://www.dryver.eu/>
- Duffy, J. E. (2009). Why biodiversity is important to the functioning of real-world ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7(8), 437-444.
- Eng, K., Wolock, D. M., & Dettinger, M. D. (2016). Sensitivity of intermittent streams to climate variations in the USA. *River Research and Applications*, 32(5), 885-895.
- Fang, H., Chen, Y., Huang, L., & He, G. (2017). Analysis of biofilm bacterial communities under different shear stresses using size-fractionated sediment. *Scientific reports*, 7(1), 1299.
- Febria, C. M., Hosen, J. D., Crump, B. C., Palmer, M. A., & Williams, D. D. (2015). Microbial responses to changes in flow status in temporary headwater streams: a cross-system comparison. *Frontiers in microbiology*, 6, 522.
- Fovet, O., Belemtougri, A., Boithias, L., Braud, I., Charlier, J. B., Cottet, M., ... & Datry, T. (2021). Intermittent rivers and ephemeral streams: Perspectives for critical zone science and research on socio-ecosystems. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 8(4), e1523.
- Freixa, A., Ejarque, E., Crognale, S., Amalfitano, S., Fazi, S., Butturini, A., & Romani, A. M. (2016). Sediment microbial communities rely on different dissolved organic matter sources along a Mediterranean river continuum. *Limnology and Oceanography*, 61(4), 1389-1405.
- Gao, B., Mohan, R., & Gupta, R. S. (2009). Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(2), 234-247.
- Gionchetta, G., Romani, A. M., Oliva, F., & Artigas, J. (2019). Distinct responses from bacterial, archaeal and fungal streambed communities to severe hydrological disturbances. *Scientific reports*, 9(1), 13506.
- Gulzar, A., Mehmood, M. A., & Chaudhary, R. (2017). Stream periphyton community: a brief review on ecological importance and regulation. *Int. J. Appl. Pure Sci. Agric*, 3, 64-68.
- Hu, D., Zang, Y., Mao, Y., & Gao, B. (2019). Identification of molecular markers that are specific to the class Thermoleophilia. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1185.
- Huang, H., Yuan, Y., Xing, Z., & Wang, D. (2020, March). River Classification in Line with China's New Requirements of Water Resources Management. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 794, No. 1, p. 012005). IOP Publishing.
- Huber, P., Metz, S., Unrein, F., Mayora, G., Sarmiento, H., & Devercelli, M. (2020). Environmental heterogeneity determines the ecological processes that govern bacterial metacommunity assembly in a floodplain river system. *The ISME Journal*, 14(12), 2951-2966.

- Jaeger, K. L., Olden, J. D., & Pelland, N. A. (2014). Climate change poised to threaten hydrologic connectivity and endemic fishes in dryland streams. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(38), 13894-13899.
- Jarre Saltos, E. R. (2022). *Caracterización fenotípica de microalgas y cianobacterias del perifiton de los ríos aportantes del embalse altoandino Mogotes (Parque Nacional Cayambe-Coca), Ecuador* (Bachelor's thesis, PUCE-Quito).
- Ju, F., & Zhang, T. (2015). 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions. *Applied microbiology and biotechnology*, *99*, 4119-4129.
- Langenheder, S., & Lindström, E. S. (2019). Factors influencing aquatic and terrestrial bacterial community assembly. *Environmental microbiology reports*, *11*(3), 306-315.
- Leigh, C., Boulton, A. J., Courtwright, J. L., Fritz, K., May, C. L., Walker, R. H., & Datry, T. (2016). Ecological research and management of intermittent rivers: an historical review and future directions. *Freshwater Biology*, *61*(8), 1181-1199.
- Li, K., Hu, J., Li, T., Liu, F., Tao, J., Liu, J., ... & Che, R. (2021). Microbial abundance and diversity investigations along rivers: Current knowledge and future directions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, *8*(5), e1547.
- Liu, M., Clarke, L. J., Baker, S. C., Jordan, G. J., & BurrIDGE, C. P. (2020). A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. *Ecological entomology*, *45*(3), 373-385.
- Magand, C., Alves, M. H., Calleja, E., Datry, T., Dörflinger, G., England, J., Gallart, F., Gómez, R., Jorda-Capdevila, D., Marti, E., Munne, A., Pastor, V. A., Stubbington, R., Tziortzis, I. and Von Schiller, D. (2020). Intermittent rivers and ephemeral streams: what water managers need to know. Technical report – Cost ACTION CA 15113. Recuperado de [10.5281/zenodo.3888474](https://zenodo.org/record/3888474)
- Medina-Rivas, M. A., Norris, E. T., Rishishwar, L., Conley, A. B., Medrano-Trochez, C., Valderrama-Aguirre, A., ... & Jordan, I. K. (2016). Choco, Colombia: a hotspot of human biodiversity. *Revista biodiversidad neotropical*, *6*(1), 45.
- Messenger, M. L., Lehner, B., Cockburn, C., Lamouroux, N., Pella, H., Snelder, T., ... & Datry, T. (2021). Global prevalence of non-perennial rivers and streams. *Nature*, *594*(7863), 391-397.
- Møller, A., & Jennions, M. D. (2002). How much variance can be explained by ecologists and evolutionary biologists?. *Oecologia*, *132*, 492-500.
- Montuelle, B., Dorigo, U., Bérard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., ... & Pesce, S. (2010). The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France). *Global Change and River Ecosystems—Implications for Structure, Function and Ecosystem Services*, 123-141.

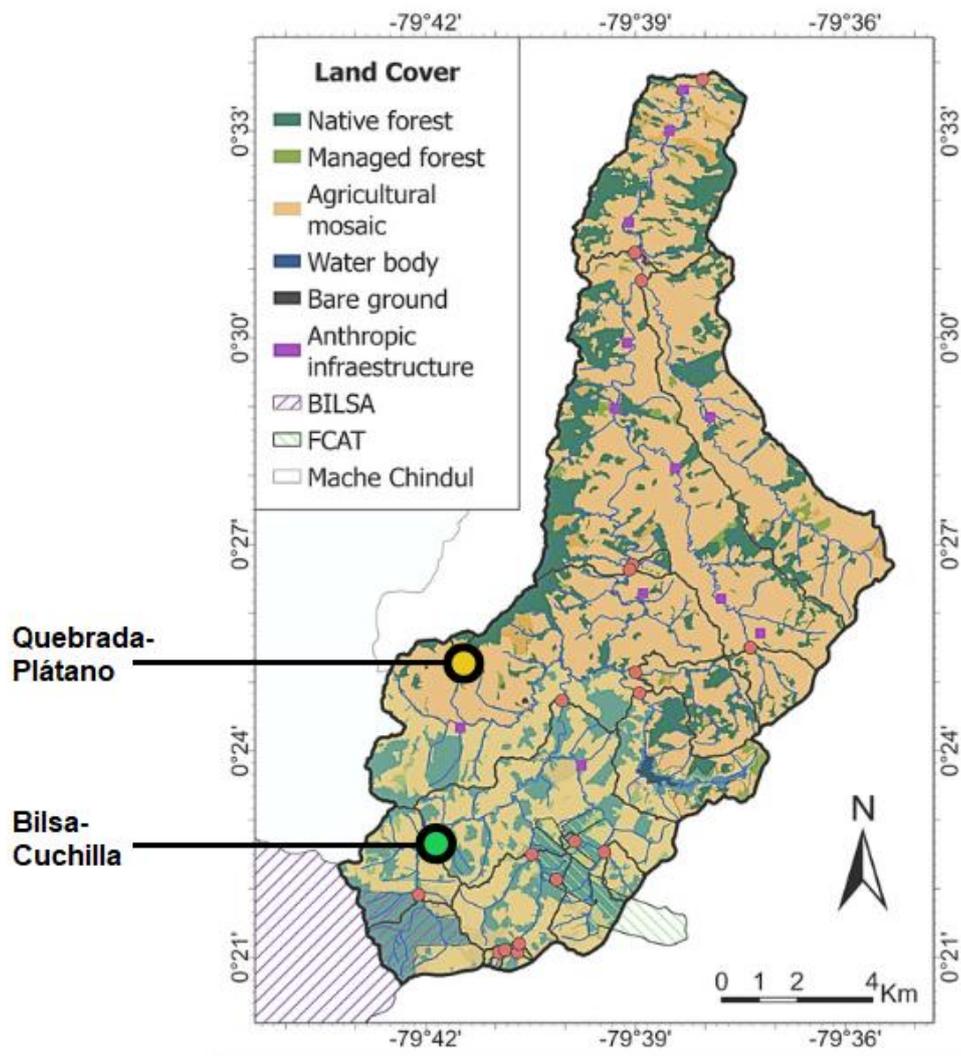
- Nelson, C. E., Bennett, D. M., & Cardinale, B. J. (2013). Consistency and sensitivity of stream periphyton community structural and functional responses to nutrient enrichment. *Ecological Applications*, 23(1), 159-173.
- Numberger, D., Ganzert, L., Zoccarato, L., Mühldorfer, K., Sauer, S., Grossart, H. P., & Greenwood, A. D. (2019). Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing. *Scientific reports*, 9(1), 9673.
- Oksanen, J., Blanchet, F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P., O'Hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E., Wagner, H. (2023). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.6-5. GitHub. Recuperado de <https://github.com/vegandevs/vegan>.
- Patrick, R. (1997). Biodiversity: Why is it important. *Biodiversity II: understanding and protecting our biological resources*, 15-24.
- Pédron, J., Guyon, L., Lecomte, A., Blottière, L., Chandeysson, C., Rochelle-Newall, E., ... & Barny, M. A. (2020). Comparison of environmental and culture-derived bacterial communities through 16S metabarcoding: a powerful tool to assess media selectivity and detect rare taxa. *Microorganisms*, 8(8), 1129.
- Peña, S., Miguel, L. F., Susa, R., Porras, S., & Salvado, L. M. (2017). Uso de bioindicadores para la evaluación de la calidad del agua en ríos: aplicación en ríos tropicales de alta montaña/Revisión corta.
- Pérez-Escobar, O. A., Lucas, E., Jaramillo, C., Monro, A., Morris, S. K., Bogarín, D., ... & Antonelli, A. (2019). The origin and diversification of the hyperdiverse flora in the Chocó biogeographic region. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1328
- Philippot, L., Griffiths, B. S., & Langenheder, S. (2021). Microbial community resilience across ecosystems and multiple disturbances. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(2), 10-1128.
- Piggott, J. J., Salis, R. K., Lear, G., Townsend, C. R., & Matthaei, C. D. (2015). Climate warming and agricultural stressors interact to determine stream periphyton community composition. *Global Change Biology*, 21(1), 206-222.
- Pilgrim, E. M., Smucker, N. J., Wu, H., Martinson, J., Nietch, C. T., Molina, M., ... & Johnson, B. R. (2022). Developing Indicators of Nutrient Pollution in Streams Using 16S rRNA Gene Metabarcoding of Periphyton-Associated Bacteria. *Water*, 14(15), 2361.
- Podosokorskaya, O. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Novikov, A. A., Kolganova, T. V., & Kublanov, I. V. (2013). *Ornatilinea* apprima gen. nov., sp. nov., a cellulolytic representative of the class Anaerolineae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt_1), 86-92.
- Pratiwi, N. T. M., Hariyadi, S., & Tajudin, R. (2011). Photosynthesis of periphyton and diffusion process as source of oxygen in rich-riffle upstream waters. *Microbiology Indonesia*, 5(4), 5-5.

- Pumo, D., Caracciolo, D., Viola, F., & Noto, L. V. (2016). Climate change effects on the hydrological regime of small non-perennial river basins. *Science of the Total Environment*, 542, 76-92.
- QIAGEN. (2023). *DNeasy PowerSoil Pro Kit Handbook, June 2023*. Recuperado de <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=9bb59b74-e493-4aeb-b6c1-f660852e8d97&lang=en>
- Ren, N., Wang, Y., Ye, Y., Zhao, Y., Huang, Y., Fu, W., & Chu, X. (2020). Effects of continuous nitrogen fertilizer application on the diversity and composition of rhizosphere soil bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1948.
- Romaní, A. M., Chauvet, E., Febria, C., Mora-Gómez, J., Risse-Buhl, U., Timoner, X., ... & Zeglin, L. (2017). The biota of intermittent rivers and ephemeral streams: prokaryotes, fungi, and protozoans. In *Intermittent rivers and ephemeral streams* (pp. 161-188). Academic Press.
- Rubin, M. A., & Leff, L. G. (2007). Nutrients and other abiotic factors affecting bacterial communities in an Ohio River (USA). *Microbial ecology*, 54, 374-383.
- Sabater, S., & Admiraal, W. (2005). Periphyton as biological indicators in managed aquatic ecosystems. *Periphyton: ecology, exploitation and management*, 159-177.
- Sabater, S., Timoner, X., Borrego, C., & Acuña, V. (2016). Stream biofilm responses to flow intermittency: from cells to ecosystems. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 14.
- Salas, I. (2019). *isaisg/ochibi*. Github. Recuperado de <https://github.com/isaisg/ohchibi>
- Šarauskienė, D., Akstinas, V., Nazarenko, S., Kriauciūnienė, J., & Jurgelėnaitė, A. (2020). Impact of physico-geographical factors and climate variability on flow intermittency in the rivers of water surplus zone. *Hydrological Processes*, 34(24), 4727-4739.
- Schneiders, A., Van Daele, T., Van Landuyt, W., & Van Reeth, W. (2012). Biodiversity and ecosystem services: complementary approaches for ecosystem management?. *Ecological Indicators*, 21, 123-133.
- Sharma, U., & Dutta, V. (2020). Establishing environmental flows for intermittent tropical rivers: Why hydrological methods are not adequate?. *International journal of environmental science and technology*, 17(5), 2949-2966.
- Sponseller, R. A., Heffernan, J. B., & Fisher, S. G. (2013). On the multiple ecological roles of water in river networks. *Ecosphere*, 4(2), 1-14.
- Svoboda, C. (2020). *The Effects of Ecological Factors on Freshwater Biofilm Colonization by Planctomycetes* (Doctoral dissertation, ResearchSpace@ Auckland).
- Timoner, X., Borrego, C. M., Acuña, V., & Sabater, S. (2014). The dynamics of biofilm bacterial communities is driven by flow wax and wane in a temporary stream. *Limnology and Oceanography*, 59(6), 2057-2067.

- Tinoco, N., Koch, C., Colmenares-Pinzón, J. E., Castellanos, F. X., & Brito, J. (2023). New species of the Spiny Mouse genus *Neacomys* (Cricetidae, Sigmodontinae) from northwestern Ecuador. *ZooKeys*, *1175*, 187.
- Tonkin, J. D., Death, R. G., & Barquín, J. (2014). Periphyton control on stream invertebrate diversity: is periphyton architecture more important than biomass?. *Marine and Freshwater Research*, *65*(9), 818-829.
- Wilsey, B. J., & Potvin, C. (2000). Biodiversity and ecosystem functioning: importance of species evenness in an old field. *Ecology*, *81*(4), 887-892.
- Zaghloul, A., Saber, M., Gadow, S., & Awad, F. (2020). Biological indicators for pollution detection in terrestrial and aquatic ecosystems. *Bulletin of the National Research Centre*, *44*(1), 1-11.
- Zwart, G., Crump, B. C., Kamst-van Agterveld, M. P., Hagen, F., & Han, S. K. (2002). Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic microbial ecology*, *28*(2), 141-155.

ANEXOS

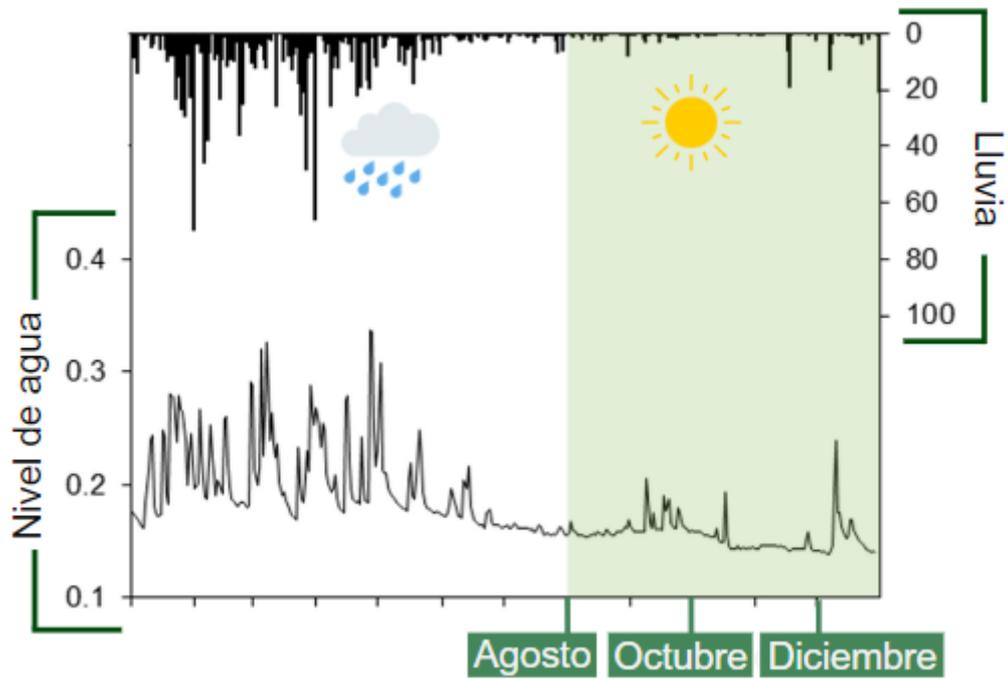
Anexo 1. Sitios de muestreo en la cuenca hidrográfica del Cube



Fuente: © DRYvER

Anexo 2. Fotografías de los dos sitios de muestreo en las tres campañas de colecta

Fuente: © DRYvER

Anexo 3. Hidrograma de la cuenca hidrográfica del Cube

Fuente: © DRYvER