

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Análisis metagenómico de comunidades microbianas
mediante *eDNA* en la Laguna del Cube (Esmeraldas,
Ecuador)**

María Paz Burbano Galárraga
Bióloga

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

Quito, 9 de mayo de 2025

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales****HOJA DE CALIFICACIÓN****DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Análisis metagenómico de comunidades microbianas
mediante *eDNA* en la Laguna del Cube (Esmeraldas,
Ecuador)**

María Paz Burbano Galárraga

Juan José Guadalupe, MSc

Quito, 9 de mayo de 2025

© 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: María Paz Burbano Galárraga

Código: 00326461

Cédula de identidad: 1721643110

Lugar y fecha: Quito, 9 de mayo de 2025

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UNPUBLISHED DOCUMENT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 lagunas tropicales, a pesar de su alta biodiversidad, han sido escasamente estudiadas con respecto a aquellos sistemas templados. La Laguna del Cube, un ecosistema alimentado por ríos intermitentes y reconocida como sitio Ramsar por su importancia ecológica e hidrológica, ha sido poco estudiada, especialmente en lo que respecta a su composición microbiológica. Las comunidades microbianas son fundamentales para el modelamiento de los ecosistemas, ya que desempeñan roles esenciales en el flujo de energía y en los ciclos biogeoquímicos, permitiendo el establecimiento de la biodiversidad y el correcto funcionamiento ecosistémico. En este estudio, se realizó una secuenciación de lectura larga tipo *shotgun* mediante la tecnología ONT (Oxford Nanopore Technologies) a partir de muestras de ADN ambiental (*eDNA*) de agua recolectadas en la Laguna del Cube a tres profundidades específicas; con el fin de caracterizar su composición taxonómica y funcional. Los resultados muestran que, la composición y diversidad de filos entre profundidades es similar, pero ciertos grupos de importancia varían su abundancia; destacando una baja representación de Cyanobacteriota, típicamente dominante en sistemas acuáticos de características similares. A nivel funcional, los genes fotosintéticos fueron más abundantes en las capas superficiales, sugiriendo una posible estratificación metabólica para este proceso. Este estudio proporciona una primera aproximación al perfil taxonómico y funcional microbiano de la Laguna del Cube, ofreciendo una línea base para conocer sobre las lagunas tropicales alimentadas por ríos intermitentes en un contexto de cambio climático global.

Palabras clave: Secuenciamiento shotgun, ADN ambiental, tecnologías Oxford Nanopore (ONT), estratificación funcional, genes fotosintéticos, laguna de agua dulce, ríos intermitentes.

ABSTRACT

Tropical lakes, despite their high biodiversity, have also been scarcely studied compared to temperate systems. The Cube Lagoon, an ecosystem fed by intermittent rivers and recognized as a Ramsar site for its ecological and hydrological importance, remains understudied, particularly regarding its microbial composition. Microbial communities are fundamental to ecosystem structuring, as they play essential roles in energy flow and biogeochemical cycles, enabling the establishment of biodiversity and the proper functioning of ecosystems. In this study, long-read shotgun sequencing was performed using Oxford Nanopore Technologies (ONT) on environmental DNA (*eDNA*) samples collected from water in the Cube Lagoon at three specific depths, in order to characterize its taxonomic and functional composition. The results show that the composition and diversity of phyla across depths is similar, but certain important groups vary in abundance—highlighting a low representation of Cyanobacteriota, a group typically dominant in aquatic systems with similar characteristics. At the functional level, photosynthetic genes were more abundant in the surface layers, suggesting a possible metabolic stratification for this process. This study provides a first insight into the microbial taxonomic and functional profile of Cube Lagoon, offering a baseline for understanding tropical lakes fed by intermittent rivers in the context of global climate change.

Keywords: Shotgun sequencing, environmental DNA, Oxford Nanopore Technologies (ONT), functional stratification, photosynthetic genes, freshwater lagoon, intermittent rivers.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	10
METODOLOGÍA	18
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	66
REFERENCIAS	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de gDNA de las muestras de agua ambientales (<i>eDNA</i>) obtenidas mediante un espectrofotómetro (NanoDrop 2000) y un fluorómetro (Qubit 4)	26
Tabla 2. Estadísticas de secuenciamiento y mapeo de las muestras de <i>eDNA</i> incluyendo el número total de lecturas, lecturas mapeadas, porcentaje de mapeo y número total de bases por profundidad.	27
Tabla 3. Índices de diversidad (Shannon y Simpson inverso) y riqueza específica de las muestras acuáticas de <i>eDNA</i> a nivel taxonómico de filo para las tres profundidades muestreadas en la Laguna Cube (Esmeraldas, Ecuador)	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica de la Laguna de Cube	18
Figura 2. Visualización de ADN genómico de las muestras de eDNA tomadas a tres profundidades distintas (0m, 3.5m y 20m) en un gel de agarosa 1.5%.....	25
Figura 3. Porcentaje de la abundancia relativa de los taxones más abundantes (nivel filo) en la comunidad microbiológica acuática de la Laguna Cube (Esmeraldas, Ecuador) a tres profundidades (0 m, 3.5 m y 20 m).....	28
Figura 4. Porcentaje de la abundancia relativa de los taxones más abundantes (nivel filo) en la comunidad microbiológica acuática de la Laguna Cube (Esmeraldas, Ecuador) a tres profundidades (0 m, 3.5 m y 20 m) dentro del dominio Bacteria	29
Figura 5. Porcentaje de la abundancia relativa de los taxones más abundantes (nivel filo) en la comunidad microbiológica acuática de la Laguna Cube (Esmeraldas, Ecuador) a tres profundidades (0 m, 3.5 m y 20 m) dentro del dominio Arquea.....	30
Figura 6. Porcentaje de la abundancia relativa de los taxones más abundantes (nivel filo) en la comunidad microbiológica acuática de la Laguna Cube (Esmeraldas, Ecuador) a tres profundidades (0 m, 3.5 m y 20 m) dentro del grupo taxonómico Eucariotes	31
Figura 7. Porcentaje de la abundancia relativa de los taxones más representativos (nivel filo) dentro del grupo taxonómico Virus en las tres profundidades analizadas	32
Figura 8. Distribución de filos microbianos compartidos entre profundidades (0m, 3.5m, 20m) en la Laguna del Cube	34
Figura 9. KEGG heatmap representando la expresión de KO más abundantes asociados a la fotosíntesis en las muestras de eDNA tomadas en distintas profundidades (0m, 3.5m, 20m).	35

INTRODUCCIÓN

Ecuador se destaca por ser uno de los países más biodiversos del planeta. Esto se debe a la ubicación geográfica única del país en la región ecuatorial de América del Sur, pues es la presencia de la cordillera andina, circulación de corrientes oceánicas, variaciones topográficas y distintas zonas climáticas; lo que le ha permitido al país poseer una alta variedad de ecosistemas y biomas, que constituyen el hábitat de una variedad de especies (Cuesta et al., 2017; Kleemann et al., 2022). Como resultado, en Ecuador se encuentran dos de los cinco puntos calientes de biodiversidad en América del Sur: los Andes Tropicales y el Corredor Tumbes-Chocó-Magdalena (Mittermeier et al., 2011).

El Corredor Tumbes-Chocó-Magdalena, y en particular el Corredor Chocó-Manabí, conocido simplemente como "el Chocó", es reconocido internacionalmente por su extraordinaria diversidad biológica y cultural. Desde el punto de vista social, esta región alberga más de 250 comunidades de afrodescendientes, indígenas y mestizos, quienes dependen de las tierras ribereñas y costeras para su sustento. En términos biológicos, el Chocó es un punto caliente de biodiversidad caracterizado por altos niveles de diversidad y endemismo. Se estima que en el Chocó ecuatoriano se encuentra el 25% de la flora del país, con aproximadamente 6.300 especies de plantas, de las cuales el 15% son endémicas. En cuanto a la fauna, la región alberga 830 especies de aves (10% endémicas), 142 especies de mamíferos (casi 11% endémicos), 350 especies de anfibios (60% endémicos) y 210 especies de reptiles (30% endémicos) (CEPF, 2005).

A pesar de su importancia biológica y social, el Chocó es una de las regiones más amenazadas. Las comunidades que lo habitan utilizan la tierra para el asentamiento

de poblaciones, la agricultura, la explotación maderera, la caza y la pesca. En Ecuador, la principal amenaza para el Corredor Chocó-Manabí es la deforestación, impulsada principalmente por la extracción de madera y la expansión de cultivos de palma aceitera (CEPF, 2005). Como consecuencia de la deforestación se tiene la pérdida de hábitats que albergan una gran diversidad biológica y proporcionan servicios ecosistémicos esenciales. Entre estos servicios destaca la relación recíproca entre los bosques y el ciclo del agua, pues la densidad arbórea influye no solo en la cantidad de agua que fluye a través de los sistemas acuáticos, sino también en su calidad. Los bosques actúan como reguladores de nutrientes, reducen la erosión y mejoran los procesos de eliminación de nutrientes dentro de los cuerpos de agua (Sweeney et al., 2004). Dado que estos cuerpos de agua están estrechamente vinculados con la cobertura forestal, es fundamental estudiar estos sistemas.

Estudios sobre estos ecosistemas acuáticos a nivel global se enfocan principalmente en cuerpos de agua perennes, que contienen agua de manera continua a lo largo del año, independientemente de la estacionalidad o variaciones climáticas (Jaeger et al., 2019; Zimmer et al., 2020). Esta tendencia ha dejado vacíos de información importantes en cuanto a la comprensión de los ecosistemas acuáticos intermitentes, como los ríos y arroyos que presentan períodos en los que transportan agua y otros en los que se secan parcial o totalmente (Xiao et al., 2024). Sin embargo, se estima que estos ecosistemas constituyen más del 30% de la longitud total y del caudal de la red fluvial global (Tooth, 2000), lo que subraya su relevancia ecológica.

En el caso de Ecuador, los estudios sobre sistemas acuáticos se han centrado principalmente en la hidrodinámica de los caudales y en la biodiversidad de macrofauna en ecosistemas lacustres, dejando de lado en gran medida la ecología de los sistemas

acuáticos intermitentes. En particular, los estudios limnológicos en el país se han enfocado en lagunas perennes de los Andes, donde se abordan aspectos como los parámetros físico-químicos del agua y las características batimétricas (Kannan et al., 1983). Esta tendencia se ha visto reflejada también en investigaciones que examinan la biodiversidad de la fauna asociada a cuerpos de agua permanentes, como anuros, peces y aves (Celi & Villamarín, 2020). Un ejemplo destacado de este tipo de ecosistemas es la Laguna de Cube, la cual se encuentra en las montañas costeras de Ecuador, específicamente en la provincia de Esmeraldas, y alberga una rica biodiversidad acuática. Su dinámica hidrológica está determinada por fluctuaciones estacionales en el nivel del agua, influenciadas por la alimentación de ríos y arroyos intermitentes. Durante la estación seca (mayo-agosto), el nivel del agua disminuye parcialmente, lo que impacta directamente la ecología del área (RAMSAR, n.d.).

La Laguna Cube forma parte de un complejo ecosistémico diverso que incluye selva tropical, bosques frondosos con palmas, marismas con vegetación emergente y extensas coberturas de plantas herbáceas flotantes, las cuales se desplazan dentro del lago en respuesta a las variaciones hidrológicas (Cañadas, 1983; Ramsar, 2001 en Lockridge, 2012). En su llanura de inundación predominan plantaciones de pequeña escala (<5 ha) de cultivos como maracuyá y arroz (Tosso, 2009), mientras que en las zonas más elevadas se desarrollan pastizales. Un análisis del uso del suelo, basado en imágenes satelitales e investigaciones de campo realizadas por INEFAN, identificó aproximadamente 15 posecionarios de predios en las laderas de la Laguna de Cube. La presencia de asentamientos humanos y actividades agropecuarias en las inmediaciones del humedal sugiere una interacción directa entre las actividades antrópicas y el ecosistema; lo que puede influir en la dinámica ecológica de la Laguna (Fundación Natura, 2000).

A pesar de su contacto con comunidades humanas y los posibles impactos asociados, la Laguna de Cube ha sido considerada un ecosistema lacustre bien conservado. Según Fundación Natura (2000), mantiene una comunidad biótica estable, evidenciada por la presencia de depredadores grandes y diversas especies de aves; al igual que una variedad de hábitats acuáticos, semiacuáticos y zonas inundables que sirven como refugios y sitios de reproducción para numerosas especies. Su valor ecológico también radica en la regulación hídrica microrregional, funcionando como reserva de agua dulce y dando origen al río Colorado Turbio, afluente del río Cube (Fundación Natura, 2000).

Debido a su importancia ecológica, la Laguna de Cube fue incluida en 2002 en la lista Ramsar de humedales de importancia internacional, tras evaluaciones de Fundación Natura (2000) y Conservation International (2001), que identificaron hábitats clave para la biodiversidad (Lockridge, 2012; RAMSAR, n.d.).

A pesar la importancia ecológica de la Laguna Cube, el conocimiento sobre su diversidad microbiológica sigue siendo limitado. El único inventario biológico de la Laguna de Cube con enfoque en varios grupos taxonómicos visibles, se realizó en el año 2000, en el marco del “Plan de Manejo Ambiental de la Laguna Cube”, desarrollado por la Fundación Natura, el Ministerio del Ambiente y la Fundación WWF. Este estudio se enfocó en el registro de aves, flora acuática y semiacuática, así como en la identificación visual de anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Sin embargo, no incluyó un análisis de la diversidad biológica dentro del cuerpo de agua, dejando un vacío significativo en el conocimiento de su microbiota (Fundación Natura, 2000).

La información más reciente sobre la microbiota de la Laguna de Cube proviene del estudio de Lockridge (2012), realizado en el marco del proyecto “Evaluación

limnológica de un raro complejo de humedales lacustres: Laguna de Cube, Sitio Ramsar 1143, Ecuador". Dicho proyecto, enfocado en el estudio de especies nektónicas, reportó una abundante presencia de coliformes fecales y sugirió la posible existencia de una floración metalimnética de cianobacterias autótrofas fijadoras de nitrógeno.

La falta de información sobre los microorganismos presentes en la laguna limita la comprensión de su papel ecológico y su contribución al sostenimiento de la biodiversidad. Además, los estudios sobre la distribución espacial de los microorganismos en estos entornos siguen siendo escasos (Brown et al., 2014; Nayfach et al., 2021), lo que resalta la necesidad de investigaciones más detalladas.

Dado el rol crucial de los microorganismos en la dinámica ecológica de los ecosistemas acuáticos, profundizar en su estudio permitiría no solo una gestión más eficiente de los recursos hídricos del país, sino también una mejor comprensión del funcionamiento microbiológico subyacente en estos sistemas. Las comunidades microbiológicas no son entes microbiológicos aislados, son la base de una matriz biológica responsable de modelar ecosistemas y establecer comunidades de organismos multicelulares (Stolz, 2017).

En cuanto a los ecosistemas acuáticos, el microbioma tiene un papel fundamental en el flujo energético, específicamente dentro de los varios ciclos biogeoquímicos; esto se debe a la abundancia y versatilidad de los microrganismos (Brown et al., 2014). Si bien la comunidad microbiológica es la base de los procesos ecológicos que mantienen la diversidad y correcto funcionamiento ecosistémico, realizar un estudio de esta se complica por su alta diversidad. Estas comunidades están formadas por un gran número de especies, de las cuales unas pocas son dominantes, otras tienen una abundancia moderada y muchas más, conocidas como la "biosfera

"rara", están representadas por pocos individuos. Esta fracción poco común y diversa de la biósfera microbiana sigue siendo en gran medida desconocida (Liu et al., 2015; Pedrós-Alió, 2012)

Una de las técnicas moleculares utilizadas para analizar las comunidades microbianas es la secuenciación metagenómica de ADN ambiental (*eDNA*), definido como una mezcla compleja de ADN genómico de múltiples organismos presentes en una muestra ambiental (Power et al., 2023). Esta tecnología no solo permite la identificación de microorganismos poco estudiados, sino que también facilita el estudio de las interacciones ecológicas interespecíficas y las redes metabólicas subyacentes. A través de la asignación taxonómica y la cuantificación de funciones moleculares, la metagenómica proporciona información clave sobre la composición y el funcionamiento de las comunidades microbianas en distintos ecosistemas (Raes et al., 2011; Tringe & Rubin, 2005).

Avances en las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS), han permitido el análisis de ADN de muestras ambientales (*eDNA*), dando paso a la evaluación directa de la diversidad de las comunidades en determinados ecosistemas (Barnes & Turner, 2016). Esto se debe principalmente a la alta resolución taxonómica proporcionada por la secuenciación de alto rendimiento (HTS), mediante el uso de cebadores de metabarcoding y/o enfoques metagenómicos tipo shotgun. El metabarcoding se enfoca en una región génica específica para HTS (Ej. 16S, ARNr), implicando así la secuenciación de genes marcadores específicos. En su contraparte, el análisis metagenómico shotgun no tiene esta limitación de enfocarse en una región génica específica, sino que permite la secuenciación de genomas completos (Eisen, 2007), ampliando las posibilidades de interpretación de los datos de *eDNA*, ya que no

solo proporciona información sobre el perfil taxonómico de una comunidad, sino que además da información sobre la función génica, metabolismo y posibles roles ecológicos, que no pueden obtenerse mediante el análisis de genes marcadores individuales (Jeffries et al., 2016; Luo Chengwei et al., 2014).

Considerando lo expuesto anteriormente, este estudio tiene como objetivo general describir la composición taxonómica y funcional de las comunidades microbianas en la Laguna de Cube mediante un análisis metagenómico tipo *shotgun* de ADN ambiental (*eDNA*) a diferentes profundidades específicas (0 m, 3,5 m y 20 m), a partir de muestras recolectadas en julio de 2022, en el marco del proyecto “Ríos Intermitentes” por parte del Laboratorio de Ecología Acuática (LEA-USFQ). Para satisfacer este objetivo, se proponen los siguientes objetivos específicos: i) Extraer ADN ambiental de muestras de agua recolectadas en la Laguna de Cube durante julio de 2022 a diferentes profundidades para su posterior análisis metagenómico; ii) Secuenciar el ADN ambiental mediante la metodología de metagenómica *shotgun* utilizando la tecnología Oxford Nanopore Technologies; iii) Implementar un *pipeline* bioinformático para la caracterización taxonómica y funcional de las comunidades microbianas presentes en la laguna; iv) Evaluar la variación en la composición taxonómica y funcional de las comunidades microbianas a tres profundidades específicas (0 m, 3,5 m y 20 m), con el fin de identificar posibles patrones ecológicos asociados.

Los hallazgos de esta investigación servirán para establecer una línea base que permitirá realizar estudios a largo plazo en ecosistemas similares. Comprender la composición taxonómica y funcional del ecosistema acuático de la Laguna Cube es fundamental, ya que se trata de un entorno con escasa intervención antropogénica, lo cual lo convierte en un referente valioso, especialmente en el contexto actual de cambio

climático, crecimiento poblacional y aumento en la demanda de recursos naturales.

Estas presiones ambientales están promoviendo una transformación significativa en los cuerpos de agua dulce, como la transición de ríos perennes a intermitentes (Chiu et al., 2017). En este sentido, uno de los aportes clave de este estudio es revelar la diversidad microbiológica presente en el ecosistema y los roles ecológicos que desempeñan estos microorganismos, cuya actividad es esencial para mantener el equilibrio funcional del sistema lacustre.

METODOLOGÍA

Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en la Laguna de Cube, ubicada en la provincia de Esmeraldas ($00^{\circ}24'N$, $079^{\circ}39'W$), en el extremo sureste de la Reserva Ecológica Mache-Chindul, dentro de la región biogeográfica del Chocó (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

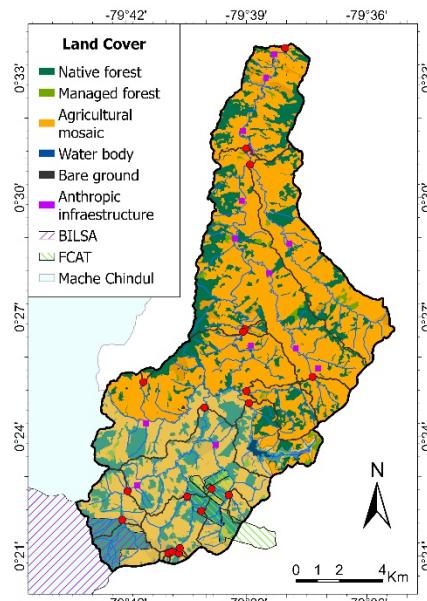


Figura 1. Ubicación geográfica de la Laguna de Cube

Fuente: LEA, USFQ

Para este estudio, la toma de muestras y las mediciones de parámetros físico-químicos se realizaron en la cuenca más grande y profunda de la laguna, durante julio de 2022, en la estación seca.

Recopilación de datos

Medición de parámetros físico-químicos.

En la columna de agua en 0, 3.5 y 20 m, se realizó la medición de parámetros físico-químicos utilizando un medidor YSI ProDSS (Yellow Springs Instruments).

Las variables analizadas incluyeron la concentración de fluoruro (F^-), sulfato (SO_4^{2-}), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amonio (NH_4^+) y fosfato (PO_4^{3-}), así como nitrógeno Kjeldahl total (TKN) y cloruros (Cl^-). Adicionalmente, se determinaron el pH, la conductividad eléctrica y el carbono orgánico total. Asimismo, se evaluó la presencia y concentración de diversos metales y elementos traza, incluyendo aluminio (Al), arsénico (As), bario (Ba), calcio (Ca), cadmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), hierro (Fe), potasio (K), magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), sodio (Na), níquel (Ni), plomo (Pb), vanadio (V) y zinc (Zn). La tabla con las mediciones físico-químicas consideradas se presenta en el (Material Suplementario 1)

Toma de muestras de ADN ambiental (*eDNA*) en la laguna Cube.

Para la obtención de ADN ambiental (*eDNA*), se recolectaron tres muestras de agua a profundidades de 0 m, 3.5 m y 20 m. El muestreo se realizó durante el día, tomando las muestras de manera consecutiva en cada una de las profundidades establecidas, en el punto más profundo de la laguna; obteniendo así tres réplicas para las tres profundidades analizadas. Este punto fue seleccionado con el fin de analizar la influencia de las termoclinas en relación con la profundidad.

La recolección del agua se llevó a cabo utilizando botellas Van Dorn, con una capacidad aproximada de 250 ml por muestra. Posteriormente, las muestras fueron transportadas en un cooler hasta el Laboratorio de Ecología Acuática de la USFQ, donde se realizó el proceso de filtración. La filtración se efectuó empleando filtros a presión Millipore Sterivex (0.45 μ m) (Merck, 2024). en un ambiente con mínima exposición a la luz. Los volúmenes de agua filtrados variaron entre 118 mL y 250 mL (Material Suplementario 1).

Los filtros fueron almacenados a -20°C en el Laboratorio de Ecología Acuática de la USFQ desde julio de 2022 hasta el 16 de enero de 2025, cuando fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la misma universidad. En este último, las nueve muestras permanecieron en condiciones de congelación (-20°C) para su preservación y posterior análisis.

Extracción de *eDNA*.

La extracción de ADN a partir de los filtros se llevó a cabo utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, con modificaciones basadas en los protocolos descritos por Majaneva et al., (2018), Spens et al. (2017) y Wacker et al. (2019). El ADN obtenido fue posteriormente almacenado a -20 °C hasta su análisis.

Para evaluar la cantidad y calidad del ADN extraído, se emplearon NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y Qubit 4 (Invitrogen) para determinar su concentración y pureza. La integridad del ADN genómico (gDNA) se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en las nueve muestras obtenidas (Zonta et al., 2015). Finalmente, tras la cuantificación, las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso en la preparación de librerías para la secuenciación.

Preparación librerías y secuenciamiento ONT.

Para analizar la composición taxonómica y funcional de las muestras, se llevó a cabo la secuenciación de las muestras a través del equipo PromethION 2 Solo de Oxford Nanopore Technologies (ONT). El proceso inició con la preparación de la librería, para lo cual se agruparon las nueve muestras de ADN genómico (gDNA) según la profundidad de muestreo (0 m, 3.5 m y 20 m). Cada uno de estos tres pools de ADN

fue indexado de manera independiente utilizando el kit ONT Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24), siguiendo el protocolo del fabricante (*ONT*, 2022).

Posteriormente, las muestras indexadas fueron combinadas para generar una única librería, la cual se cargó en un PromethION 2 Solo Flow Cell (P2S-02295) y se procesó durante 46 horas. El llamado de bases se realizó en tiempo real empleando el modo de alta precisión y un umbral de calidad mínimo de Q7.

Análisis bioinformático.

Preprocesamiento de datos.

Tras la secuenciación, las lecturas sin procesar fueron depuradas con *Porechop* v0.2.3 para eliminar adaptadores e indexadores (Wick et al., 2017). La calidad de las lecturas filtradas se evaluó mediante *NanoPlot* v1.38.1 (Purushothaman et al., 2024).

Análisis metagenómico y ensamblaje.

Para el análisis metagenómico de las muestras, se utilizó la opción de co-ensamblado en *SqueezeMeta* v1.6.5 (Tamames & Puente-Sánchez, 2019), lo que permitió la recuperación de genomas individuales, así como la asignación taxonómica y funcional de los genes. El ensamblaje de las lecturas se llevó a cabo con *MegaHIT*, el ensamblador interno de *SqueezeMeta*.

La asignación taxonómica y la reconstrucción de genomas se realizaron mediante el mapeo de las lecturas contra la base de datos GenBank (Tamames & Puente-Sánchez, 2019). Para la anotación funcional de los genes predichos, se utilizó la base de datos de rutas metabólicas KEGG, aplicando un enfoque dirigido (Tamames & Puente-Sánchez, 2019). El enfoque dirigido consistió en filtrar la búsqueda para identificar genes específicos relacionados con procesos metabólicos concretos, en específico, la fotosíntesis.

Análisis taxonómico y funcional.

Los resultados del análisis metagenómico fueron importados a *R* v3.6.1 utilizando el paquete *SQMtools* v1.6.2 (Puente-Sánchez et al., 2020), el cual se empleó para caracterizar el perfil taxonómico de las muestras a distintas profundidades y visualizar el perfil funcional de los genes con anotaciones en *KEGG*. Para garantizar la comparabilidad de los resultados entre las profundidades muestreadas, los análisis se realizaron en función de las abundancias relativas de cada lectura en cada nivel de profundidad, independientemente del número de lecturas obtenidas.

Para la representación visual de los resultados, se utilizaron las funciones *plotTaxonomy* y *plotFunctions* de la herramienta *SQMtools*. La función *plotTaxonomy* permitió generar gráficos de barras que muestran la abundancia de taxones en las tres profundidades analizadas. Inicialmente, se seleccionó el nivel taxonómico de filo para obtener una visión general de los filos presentes en cada profundidad. Posteriormente, se realizó un análisis más detallado por subgrupos taxonómicos (Bacterias, Arqueas, Eucariotas y Virus) con el fin de examinar la distribución de los filos y su abundancia dentro de cada grupo.

En la visualización de la composición taxonómica, se excluyeron las lecturas no mapeadas, así como aquellas que no pudieron ser clasificadas taxonómicamente, garantizando un análisis más preciso de las comunidades presentes en cada profundidad. Asimismo, se eliminaron los taxones no clasificados y se aseguró que todos los taxones tengan por lo menos una abundancia en cada una de las correspondientes profundidades.

Los gráficos de barras generados reflejaron la representatividad de los filos más abundantes en cada profundidad.

Por otro lado, para la visualización de los genes funcionales, se generó un *KEGG heatmap*, mediante la opción *plotFunctions*, para representar los *KEGG orthologs* (KO) con mayor número de transcritos en cada profundidad analizada. Cada "gen" en estos mapas de calor corresponde a un KO, es decir, un grupo de genes ortólogos que codifican proteínas con funciones equivalentes en distintos organismos. Para la visualización, se delimitó un máximo de 10 KO por mapa de calor; para mostrar únicamente los KO más abundantes relacionados específicamente al proceso metabólico de la fotosíntesis. Adicionalmente a esto, se hizo un análisis de las familias de microorganismos más asociadas a estos genes ortólogos relacionados al proceso de fotosíntesis, mediante la función *plotTaxonomy(photosynthesis)*.

Análisis de la composición biológica.

La evaluación de la variación en la composición de las comunidades biológicas acuáticas entre las diferentes profundidades muestreadas se realizó a partir del análisis cuantitativo de las abundancias relativas correspondientes a los filos más representativos dentro de los dominios Bacteria, Archaea y Virus. Este análisis se basó en los perfiles taxonómicos generados a partir de los datos metagenómicos obtenidos mediante secuenciación de ADN ambiental (*eDNA*). Los resultados se interpretaron de manera descriptiva, centrándose el análisis en la identificación de patrones de distribución y abundancia relativa entre los grupos microbianos detectados.

Análisis de diversidad.

La diversidad alfa de las muestras obtenidas en las tres profundidades se evaluó mediante tres métricas: los índices de Shannon y e inverso de Simpson, que miden la diversidad dentro de cada muestra; y la riqueza de filos presentes. Para estos análisis, se empleó el paquete vegan v2.5.7 (Oksanen et al., 2019) en R (McMurdie & Holmes, 2013) y las abundancias relativas de todos los filos presentes, al igual que los filos presentes dentro de los grupos taxonómicos: Bacteria, Arquea, Eucariotes y Virus.

Para analizar la distribución de la diversidad de las muestras se realizó un diagrama de Venn mediante el paquete Venn Diagram en R (Gao et al., 2021), para representar cuántos filos se comparten entre las tres profundidades y cuántos son únicos para cada profundidad muestreada. Adicionalmente, para determinar cuáles son cada uno de estos correspondientes filos, se utilizó el paquete dyplr en R para poder realizar un subset de dichos filos (Wickham et al., 2023).

RESULTADOS

Análisis metagenómico

Extracción de ADN.

Para evaluar la calidad de la extracción de ADN ambiental de muestras de agua recolectadas en la Laguna de Cube durante julio de 2022, a diferentes profundidades, se verificó la integridad genómica de las muestras analizadas; mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En todas las electroforesis realizadas, se observó una banda continua en la parte superior del gel, lo que indica la presencia de ADN genómico (gDNA) de alto peso molecular. Un ejemplo de las bandas visualizadas en un gel de agarosa al 1.5% se presenta en la ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. El primer carril es el Ladder comercial de Invitrogen (1000pb) y los carriles subsiguientes son las bandas de muestras de *eDNA* correspondientes a 0m, 3m, y 20m.

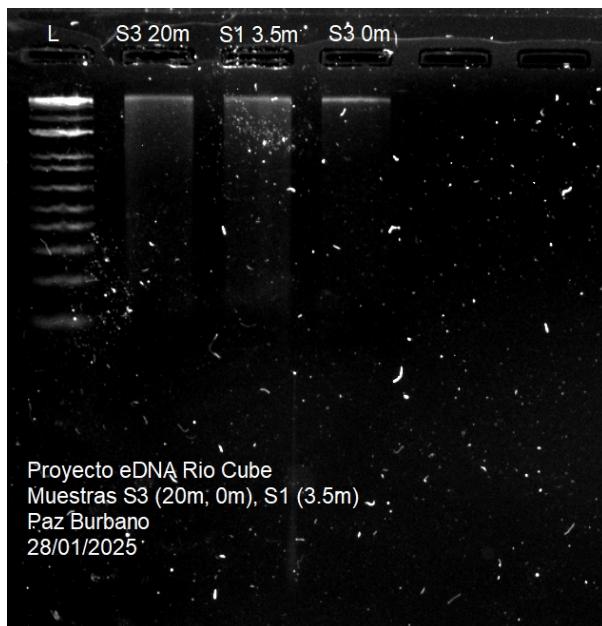


Figura 2. Visualización de ADN genómico de las muestras de *eDNA* tomadas a tres profundidades distintas (0m, 3.5m y 20m) en un gel de agarosa 1.5%

Los resultados de la cuantificación de ADN se presentan en la **Tabla 1**. Se observó que la concentración de ADN fue consistentemente mayor cuando se midió con un espectrofotómetro (NanoDrop 2000) en comparación con las mediciones realizadas mediante fluorometría (Qubit 4). Tras la determinación de las concentraciones en las muestras analizadas, se decidió agrupar las réplicas de cada profundidad en un único pool, obteniendo así una sola muestra representativa por cada profundidad para los análisis posteriores.

Tabla 1. Cuantificación de gDNA de las muestras de agua ambientales (*eDNA*) obtenidas mediante un espectrofotómetro (NanoDrop 2000) y un fluorómetro (Qubit 4)

Cuantificación muestras <i>eDNA</i>			
Muestra	Profundidad (m)	Nanodrop (ng/ul)	Qubit (ng/ul)
LC_0m_S1	0	91	26
LC_0m_S2	0	78.5	30.6
LC_0m_S3	0	25.4	5.76
LC_3.5m_S1	3.5	35.8	14.6
LC_3.5m_S2	3.5	45.5	18.1

LC_3.5m_S3	3.5	27.2	7.96
LC_20m_S1	20	32.3	23.4
LC_20m_S2	20	39.7	4.82
LC_20m_S3	20	65.6	10

Estadísticas de secuenciamiento.

Para investigar la composición taxonómica de los organismos presentes en la Laguna Cube, se realizó un análisis metagenómico mediante secuenciación con Oxford Nanopore Technologies. Las estadísticas de secuenciación se presentan en la **Tabla 2**. El porcentaje de lecturas no mapeadas varió entre el 31 % y el 67 %, dependiendo de la profundidad de muestreo. La muestra obtenida a 20 m presentó el mayor porcentaje de lecturas no clasificadas (67 %), mientras que las muestras de 0 y 3.5 m mostraron aproximadamente un 30 % de lecturas no clasificadas.

Tabla 2. Estadísticas de secuenciamiento y mapeo de las muestras de *eDNA* incluyendo el número total de lecturas, lecturas mapeadas, porcentaje de mapeo y número total de bases por profundidad.

Mapeo de lecturas

Profundidad	Lecturas totales	Lecturas mapeadas	Porcentaje de mapeo	Número total de bases
0 m	2,566,941	1,542,292	60.09%	1060774911
3.5 m	4,286,630	2,606,995	60.82%	1790254064
20 m	1,434,038	511,278	32.65%	582771492

Como se observa, el porcentaje de mapeo en las muestras recolectadas a 0 m y 3.5m supera el 50% de porcentaje de mapeo, sin embargo dicho valor es inferior al 50% para la muestra tomada a 20m de profundidad.

Composición taxonómica de la Laguna Cube

Filos más abundantes presentes en la Laguna Cube a nivel global (sin delimitación de dominios).

La ~~¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.~~ presenta la composición de la comunidad biológica a nivel de filo en las tres profundidades analizadas. Se registró un total de 271 filos presentes en las muestras de agua analizadas para las tres profundidades muestreadas: 0m, 3.5m y 20m. Los filos dominantes fueron Pseudomonadota, Verrucomicrobiota, Bacteroidota, Planctomycetota y Chlorobiota; indicando así que el dominio más abundante corresponde a las Bacterias. El resto de los filos representó en conjunto el 10% de la abundancia total.

Se observaron variaciones en la abundancia relativa de algunos filos según la profundidad. Pseudomonadota alcanzó un 23% a 3.5 m, mientras que a 20 m su proporción disminuyó al 14%. De manera similar, Verrucomicrobiota presentó una mayor presencia a 0 m (14%), reduciéndose al 9% en la profundidad de 20 m. Pese estas diferencias en la abundancia de estos filos, otros como Bacteroidota,

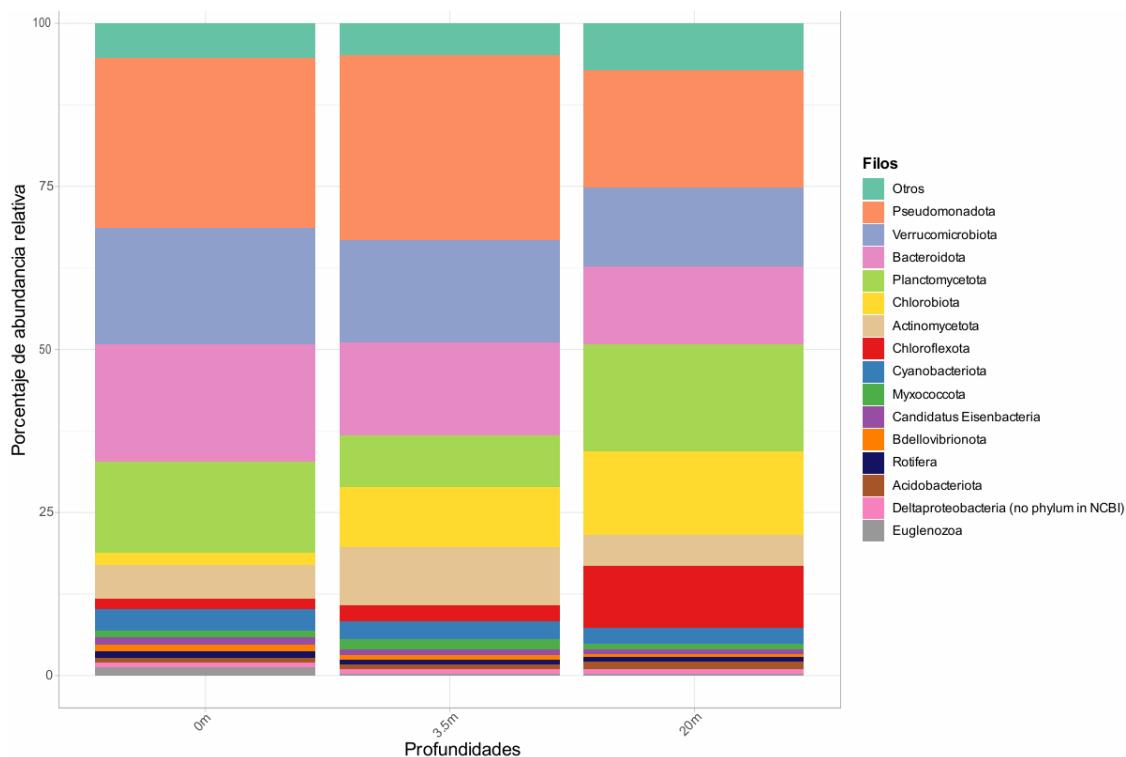


Figura 3. Porcentaje de la abundancia relativa de los taxones más abundantes (nivel filo) en la comunidad microbiológica acuática de la Laguna Cube (Esmeraldas, Ecuador) a tres profundidades (0 m, 3.5 m y 20 m)

Filos más abundantes dentro del dominio Bacteria presentes en las muestras acuáticas de la Laguna Cube.

La ~~¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.~~ presenta los filos más representativos dentro del Dominio Bacteria. Como se puede observar, los filos presentes en las muestras fueron: Pseudomonadota, Verrucomicrobiota, Bacteroidota, Planctomycetota, Chlorobiota y Actinomycetota. El resto de los filos representó en conjunto el 10% de la abundancia total.

Se observó que ciertos filos presentaron diferencias más marcadas a determinadas profundidades. Por ejemplo, Chloroflexota se representa en un 8% a una profundidad de 20 m, frente al 1% en la profundidad de 0 m. De manera similar, Chlorobiota se encuentra en un 10% en la profundidad de 20 m y en un 2% en la profundidad de 0 m. Estos resultados sugieren una posible variación en la abundancia

de algunos filos en función de la profundidad, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

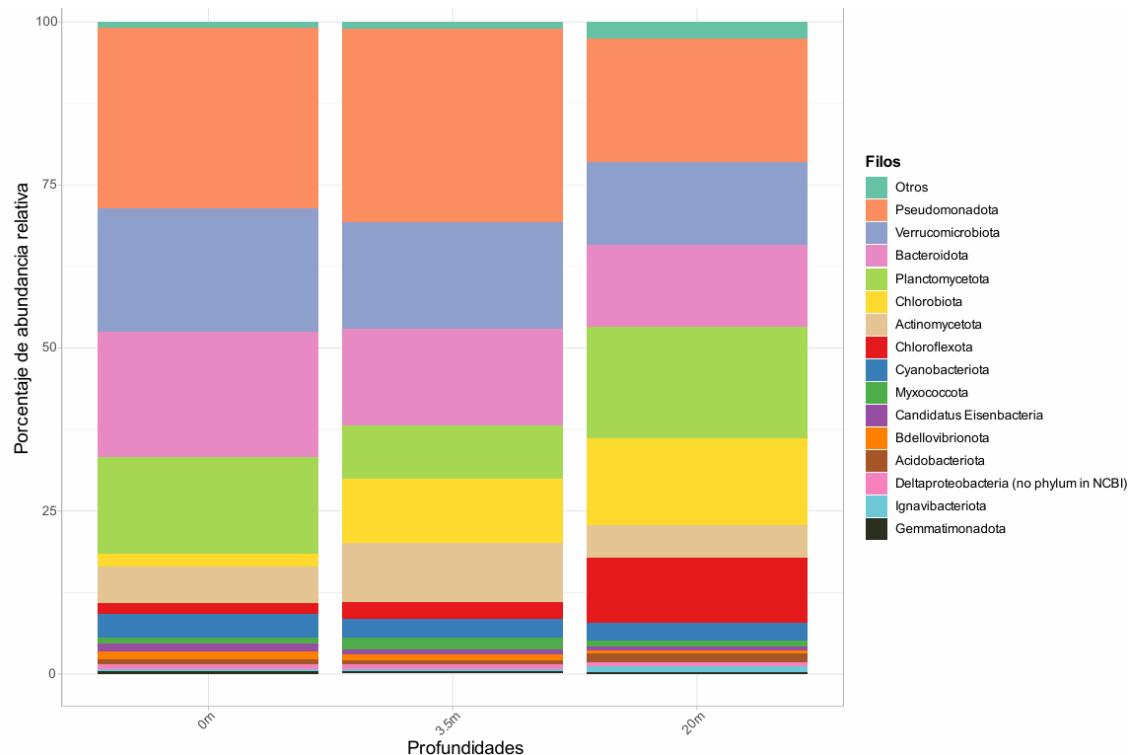


Figura 4. Porcentaje de la abundancia relativa de los taxones más abundantes (nivel filo) en la comunidad microbiológica acuática de la Laguna Cube (Esmeraldas, Ecuador) a tres profundidades (0 m, 3.5 m y 20 m) dentro del dominio Bacteria

Filos más abundantes dentro del dominio Arquea presentes en las muestras acuáticas de la Laguna Cube.

La ;Error! No se encuentra el origen de la referencia. muestra los filos más representativos dentro del superreino Archaea. Entre ellos se encuentran Euryarchaeota, Woesearchaeota, Nitrososphaerota, Bathyarchaeota y Thermoproteota. El resto de los filos representó en conjunto el 5% de la abundancia total.

Se observa que algunos filos presentan una mayor proporción en determinadas profundidades. Por ejemplo, Woesearchaeota representa el 43% de la comunidad a 3.5

m, mientras que a 20 m su presencia disminuye al 9%. Por el contrario, Euryarchaeota es más abundante a 20 m (41%), mientras que a 3.5 m su proporción es del 14%.

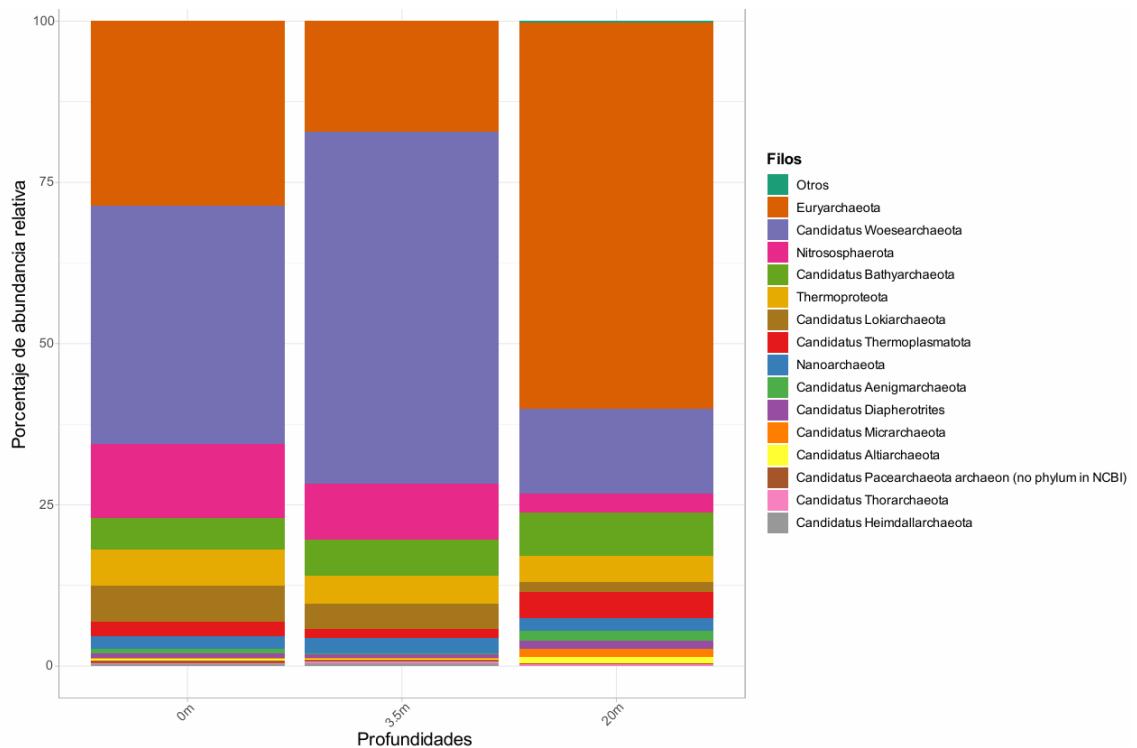


Figura 5. Porcentaje de la abundancia relativa de los taxones más abundantes (nivel filo) en la comunidad microbiológica acuática de la Laguna Cube (Esmeraldas, Ecuador) a tres profundidades (0 m, 3.5 m y 20 m) dentro del dominio Arquea

Filos más abundantes dentro del dominio Eucariota presentes en las muestras acuáticas de la Laguna Cube.

La figura 6 representa la distribución de los filos dentro del superreino Eucariota en cada una de las profundidades analizadas. Los resultados indican que los filos predominantes son Rotifera, Euglenozoa, Bacillariophyta, Streptophyta y Ciliophora. El resto de los filos representó en conjunto el 5% de la abundancia total.

Se observa que la proporción de cada filo varía según la profundidad. Por ejemplo, Euglenozoa alcanza un 21% a 0 m, mientras que a 20 m su representación disminuye al 7%. De manera similar, Rotifera representa el 24% de la comunidad a 3.5 m, pero su proporción se reduce al 17% en la superficie (0 m). Por otro lado, Bacillariophyta es más prevalente a 20 m (15%) en comparación con 0 y 3.5 m, donde representa el 9% y 10%, respectivamente.

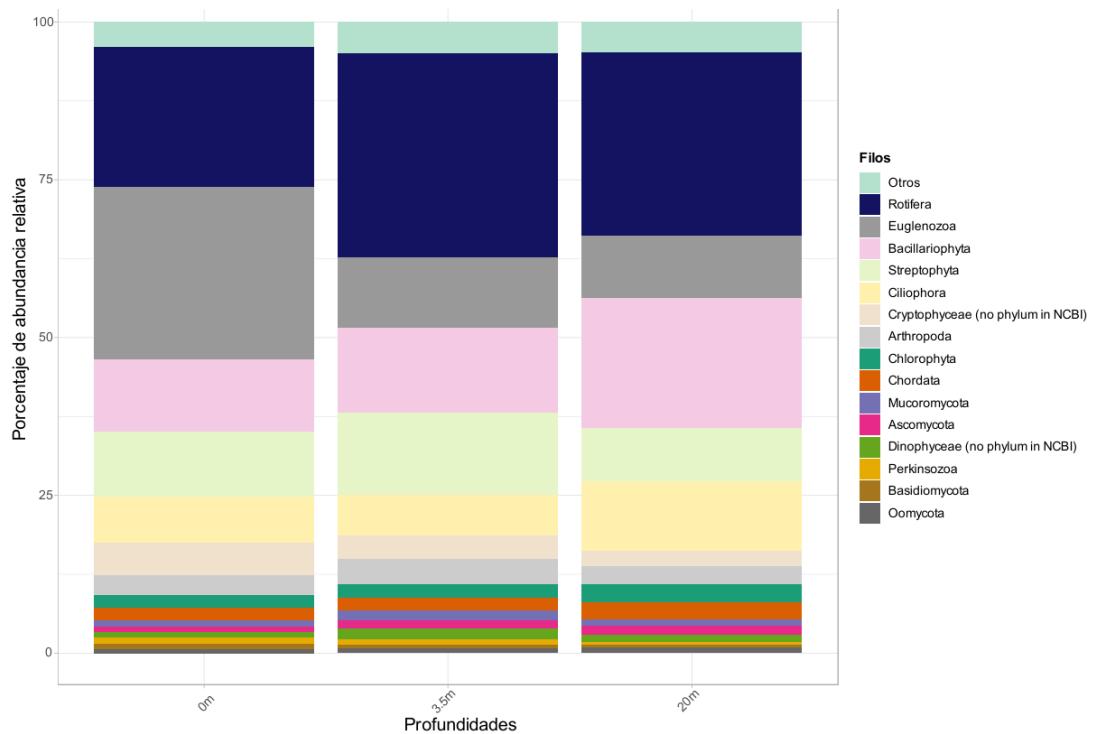


Figura 6. Porcentaje de la abundancia relativa de los taxones más abundantes (nivel filo) en la comunidad microbiológica acuática de la Laguna Cube (Esmeraldas, Ecuador) a tres profundidades (0 m, 3.5 m y 20 m) dentro del grupo taxonómico Eucariotes

Filos más abundantes dentro del grupo taxonómico Virus presentes en las muestras acuáticas de la Laguna Cube.

La [!Error!](#) No se encuentra el origen de la referencia. muestra la distribución de las abundancias relativas de los filos más representativos de los virus en las tres profundidades analizadas. Los resultados indican que los filos más destacados son: Uroviricota, Nucleocycloviricota, Dishui Lake large Algae virus 1 y Cressdnnaviricota. El resto de los filos representó en conjunto el 5% de la abundancia total.

Como se observa en el gráfico de barras, las proporciones de estos filos son relativamente similares entre las profundidades, con la excepción de Cressdnnaviricota, que alcanza un 6% en la profundidad de 20 m, mientras que en las profundidades de 0 y 3.5 m su representación es menor, variando entre el 0% y el 1%, respectivamente.

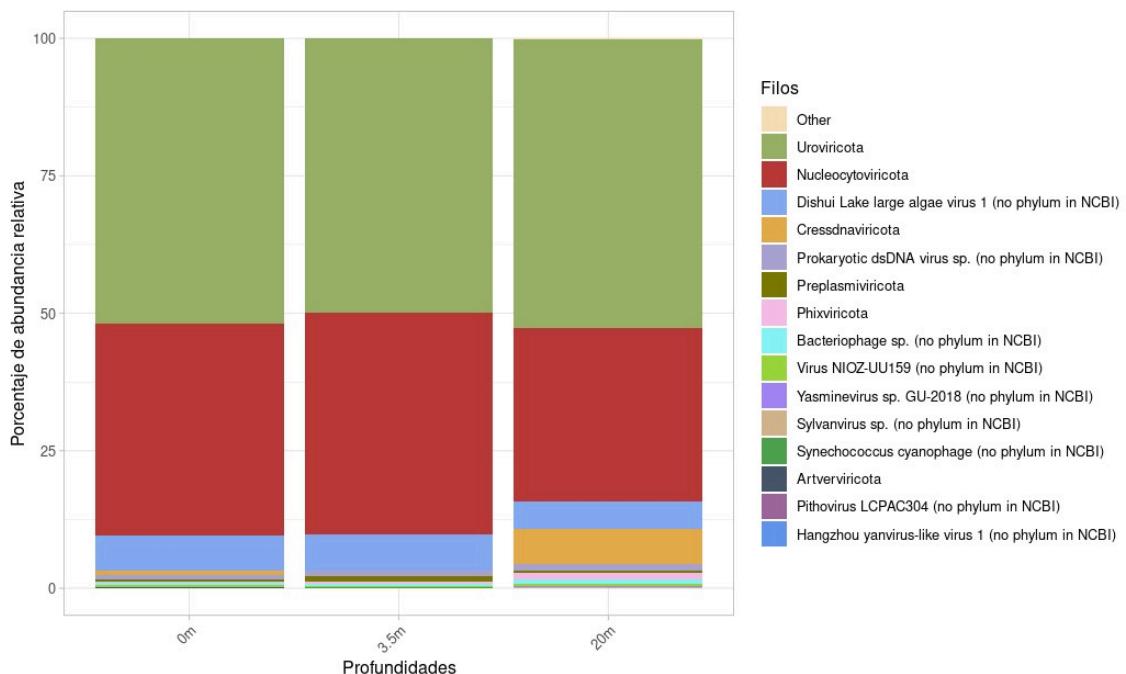


Figura 7. Porcentaje de la abundancia relativa de los taxones más representativos (nivel filo) dentro del grupo taxonómico Virus en las tres profundidades analizadas

Análisis diversidad.

La diversidad alfa de las muestras obtenidas en las tres profundidades se evaluó mediante tres métricas: los índices de Shannon y Simpson inverso, que cuantifican la diversidad dentro de cada muestra, y la riqueza de filos presentes. Los valores obtenidos para estas métricas, así como la distribución de la riqueza de filos en las diferentes profundidades, se presentan en la **Tabla 3**. Como es evidente la riqueza específica parece no variar significativamente entre profundidades, sin embargo se muestra una mayor riqueza de filos en la profundidad de 3.5m. Contemplando los índices de diversidad, estos tampoco muestran diferencias significativas; el índice de Shannon se mantiene relativamente constante en las tres profundidades analizadas, sin embargo el índice inverso de Simpson parece mostrar una tendencia de aumento de diversidad con el aumento de profundidad.

Tabla 3. Índices de diversidad (Shannon y Simpson inverso) y riqueza específica de las muestras acuáticas de *eDNA* a nivel taxonómico de filo para las tres profundidades muestreadas en la Laguna Cube (Esmeraldas, Ecuador)

Índices de diversidad			Riqueza específica
Profundidad	Shannon	Simpson	
0 m	2.287243	6.30250	225
3.5 m	2.326566	6.64131	243
20 m	2.515038	8.48023	216

Distribución de filos entre profundidades.

En cuanto al análisis de la distribución de los filos en las diferentes profundidades muestreadas, se obtiene lo siguiente: 10 filos son únicos para la profundidad de 0m, 19 filos son únicos para la profundidad de 3.5m y finalmente 13 filos son únicos para la profundidad de 20m. Las muestras de *eDNA* tomadas en las profundidades 0m y 3.5m comparten un total de 26 filos. Las muestras de *eDNA* tomadas a 0m y 20m de profundidad comparten un total de 5 filos. Las muestras de agua de *eDNA* tomadas a 20 m y 3.5 metros de profundidad comparten un total de 14 filos. Finalmente un total de 184 filos son compartidos entre las tres profundidades muestreadas. Como es evidente, la mayoría de los filos no son únicos para cada profundidad, sino que se comparten entre todas las profundidades (0m, 3.5m y 20m). La mayoría de estos filos compartidos pertenecen a las bacterias. Estos resultados se reflejan gráficamente en la *Figura 8*.

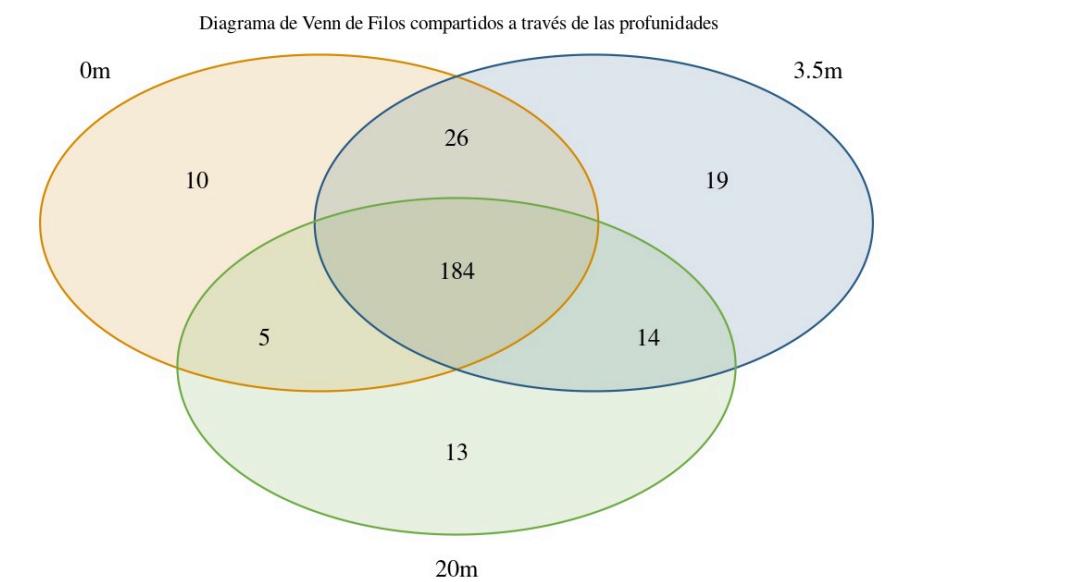


Figura 8. Distribución de filos microbianos compartidos entre profundidades (0m, 3.5m, 20m) en la Laguna del Cube.

Composición funcional de la Laguna Cube

Composición funcional dirigida a procesos fotosintéticos.

En la **Figura 9** se representa la abundancia en transcritos por millones (TPM) de los *KO* (genes ortólogos) más abundantes asociados a la fotosíntesis en las muestras provenientes a las profundidades: 0m, 3,5m y 20m. Como se visualiza en el gráfico, se presenta un total de los 10 *KO* más comunes relacionados a este proceso, los cuales en su mayoría muestran una mayor cantidad de transcritos para la profundidad de 0m y una menor abundancia hacia los 20m de profundidad.

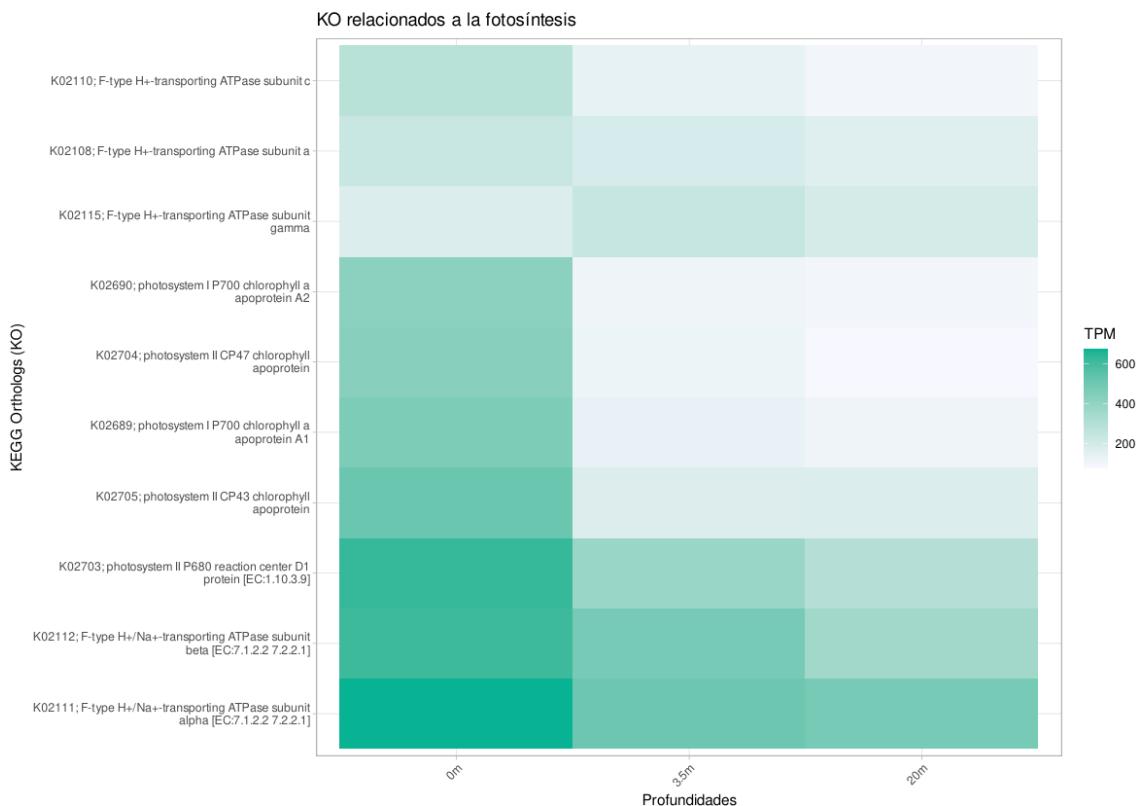


Figura 9. KEGG heatmap representando la expresión de *KO* más abundantes asociados a la fotosíntesis en las muestras de eDNA tomadas en distintas profundidades (0m, 3,5m, 20m).

DISCUSIÓN

El objetivo general de esta investigación fue describir la composición taxonómica y funcional de las comunidades microbianas en la Laguna de Cube mediante un análisis metagenómico tipo *shotgun* de ADN ambiental (*eDNA*), a partir de muestras recolectadas en julio de 2022 a tres profundidades específicas (0 m, 3,5 m y 20 m). Para acceder a esta información metagenómica, primero se realizó la extracción del ADN a partir de las muestras ambientales y posteriormente se analizaron las estadísticas de secuenciamiento, como paso previo a la caracterización taxonómica y funcional de las comunidades microbianas.

Extracción de *eDNA*

Las concentraciones de *eDNA* obtenidas mediante la cuantificación con el fluorómetro Qubit mostraron variabilidad entre las diferentes profundidades muestreadas (**Tabla 1**). A pesar de las diferencias observadas, los valores registrados en las tres profundidades presentan rangos similares, lo cual sugiere una distribución relativamente homogénea en términos de concentración de ADN ambiental (*eDNA*) a lo largo de la columna vertical.

Este patrón puede estar relacionado con las características particulares de la Laguna del Cube. A diferencia de lo observado en sistemas estratificados, donde las concentraciones de *eDNA* tienden a ser mayores en capas más profundas y frías debido a una menor tasa de degradación (Kazuaki et al., 2001), en esta laguna tropical la columna de agua se encuentra altamente mezclada y no presenta una estratificación térmica marcada (Lockridge, 2012). Estudios previos han demostrado que variables abióticas como la temperatura se mantienen relativamente homogéneas a lo largo de

toda la columna (Lockridge, 2012), lo cual reduce la formación de gradientes verticales que podrían influir en la degradación del *eDNA*. En consecuencia, las concentraciones observadas en las distintas profundidades son similares, lo que concuerda con lo observado en este estudio.

Sin embargo, a pesar de esa aparente homogeneidad, las fluctuaciones en la concentración de *eDNA* pueden estar influenciadas por múltiples factores. La distribución espacial del *eDNA* en cuerpos de agua dulce es compleja y dinámica (Altermatt et al., 2023). El *eDNA* en muestras acuáticas incluye material genético de organismos completos, fragmentos de tejido y moléculas libres, todas sujetas a procesos físicos como advección, difusión y, especialmente, degradación selectiva, que afectan su concentración y detectabilidad en el ambiente acuático (Harrison et al., 2019). Esta degradación es de tipo exponencial (Roussel et al., 2015), lo que implica que el *eDNA* refleja la presencia de organismos en un periodo temporal limitado, desde minutos hasta pocos días antes del muestreo (McKnight et al., 2024).

La persistencia del *eDNA* en el agua también depende de condiciones ambientales como el pH, la radiación ultravioleta y la temperatura, que pueden inducir distintos tipos de daño en las cadenas de ADN y comprometer su integridad (Eichmiller et al., 2016; Harrison et al., 2019). Por lo tanto, es importante considerar estos factores al interpretar las concentraciones de ADN medidas.

Por otro lado, la cantidad de agua filtrada es otro factor determinante en la detección de *eDNA*. Se ha demostrado que volúmenes menores a un litro pueden contener niveles de ADN tan bajos que solo alcanzan lo que algunos autores denominan “niveles homeopáticos”, comprometiendo así la detectabilidad y representación de la diversidad biológica real (Bessey et al., 2020). Además, las curvas de acumulación de

especies sugieren que se alcanza un punto de saturación más confiable en volúmenes mayores (Broadhurst et al., 2021). En este estudio, los volúmenes filtrados por muestra variaron entre 118 mL y 250 mL, lo cual podría haber limitado la recuperación de señales robustas de diversidad (Carraro et al., 2022).

Al comparar con estudios previos en cuerpos de agua léticos, las concentraciones de *eDNA* obtenidas pueden considerarse bajas, ya que en dichos estudios los valores suelen superar los 10 ng/ μ L (Thomson-Laing et al., 2022). Esta baja concentración, además de explicarse por el reducido volumen filtrado, también puede estar relacionada con los procesos de degradación antes mencionados y con la dinámica propia del sistema lacustre tropical analizado.

Estadísticas de secuenciamiento

Porcentaje de mapeo.

Las lecturas obtenidas a profundidades de 0 m y 3.5 m alcanzaron un porcentaje de mapeo cercano al 60%, mientras que la muestra tomada a 20 m mostró un valor considerablemente menor (33%) como se muestra en la **Tabla 2**. Esta diferencia puede atribuirse a múltiples factores relacionados tanto con la calidad de las lecturas de secuenciación como con las características del ensamblado.

Un ensamblado de alta calidad, compuesto por *contigs* largos, facilita un mejor alineamiento y, por ende, un mayor porcentaje de mapeo. En este estudio, las lecturas fueron evaluadas con un umbral de calidad Q7 (99.3% - 99.7% de las lecturas obtenidas), comúnmente utilizado en tecnologías ONT (Siregar et al., 2021). Sin embargo, los *contigs* obtenidos fueron de tamaños pequeños (aproximadamente 500

pb), lo que indica una alta fragmentación (Wommack et al., 2008) que pudo comprometer la calidad del coensamblado.

La abundancia relativa de organismos en la muestra también influye: especies más abundantes generan más lecturas y *contigs* más largos, mejorando el mapeo, mientras que en comunidades menos abundantes ocurre lo contrario. Además, el volumen de muestra procesado fue inferior a un litro, lo cual puede haber limitado la cantidad de ADN recuperado y contribuido a ensamblados fragmentados (Tamames & Puente-Sánchez, 2019).

Asimismo, la diversidad biológica del ecosistema y su representación en bases de datos públicas afectan directamente el porcentaje de mapeo. Estudios de *eDNA* se han enfocado tradicionalmente en ecosistemas dulceacuícolas bien caracterizados y de baja diversidad, pero recientemente se han extendido a hábitats más complejos y menos estudiados (Cowart et al., 2020). Tal es el caso de esta investigación, realizada en una laguna tropical alimentada por ríos intermitentes, un sistema con dinámicas hidrológicas y biológicas aún poco caracterizadas a escala global.

Esta complejidad puede explicar, en parte, el bajo porcentaje de mapeo observado a 20 m, donde es posible que el coensamblado no represente adecuadamente las comunidades microbianas presentes, o que las condiciones abióticas particulares estén asociadas a organismos cuyas secuencias no se encuentran en bases de datos públicas (Marques et al., 2021) reduciendo así la capacidad de alineamiento.

Adicionalmente, se ha demostrado que las lecturas tienden a alinearse preferentemente a regiones conservadas, lo que limita la detección de variantes genómicas únicas (Fuentes-Pardo & Ruzzante, 2017). A medida que aumenta la

divergencia entre los genomas presentes en la muestra y las referencias disponibles, también se incrementa la proporción de genotipos faltantes (Nevado et al., 2014), lo cual podría contribuir al bajo mapeo observado en la muestra de 20 m.

Ante esta situación, y con el fin de reducir el sesgo entre muestras, no se aplicaron técnicas de rarefacción —que suponen una pérdida de información relevante (Schloss, 2024.)—, optando en su lugar por el uso de valores de abundancia relativa para los análisis posteriores (Beule & Karlovsky, 2020).

A pesar de las limitaciones previamente discutidas en cuanto a la concentración de *eDNA*, el número de lecturas y el porcentaje de mapeo, los resultados obtenidos demuestran la viabilidad de aplicar la secuenciación *shotgun* de lectura larga mediante tecnologías ONT a muestras de *eDNA* de agua dulce. El análisis de las abundancias relativas permitió recuperar información genómica a lo largo del árbol de la vida, evidenciando la capacidad de esta metodología para identificar componentes clave de la diversidad microbiana (Nousias et al., 2024); brindando así una visión detallada de la composición taxonómica de las muestras y permitiendo identificar los filos más representativos en cada una de las profundidades muestreadas. A continuación, se presentan los principales resultados sobre la estructura biológica de las comunidades microbianas detectadas.

Composición biológica la Laguna Cube

Filos más abundantes dentro de las muestras acuáticas de la Laguna Cube:

Análisis global.

Como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, los filos más abundantes en las tres muestras analizadas fueron: Pseudomonadota,

Verrucomicrobiota, Bacteroidota, Planctomycetota y Chlorobiota, mientras que el resto de los filos representó en conjunto el 10% de la abundancia total. Estos filos bacterianos ya han sido reportados en estudios previos de *eDNA* en cuerpos de agua dulce (Liu et al., 2024; Wang et al., 2022; Yadav et al., 2024; Yang et al., 2024).

**Filos más abundantes dentro de las muestras acuáticas de la Laguna Cube:
Dominio Bacteria.**

Dado que los filos más abundantes en el dominio Bacteria coincidieron con los identificados en el análisis global sin delimitaciones taxonómicas (**Figura 3 y Figura 4**), se detalla a continuación el análisis de la composición específica de filos dentro de este dominio. Los filos bacterianos predominantes en la Laguna Cube fueron Pseudomonadota y Verrucomicrobiota, lo que contrasta parcialmente con lo reportado en otros estudios en lagunas tropicales y subtropicales (Liu et al., 2024; Wang et al., 2022; Yadav et al., 2024). Por ejemplo, en la laguna Pangong Tso se identificaron como principales Pseudomonadota, Bacteroidetes y Actinomycetota (Yadav et al., 2024), mientras que en el lago Mendota se destacaron Proteobacteria, Verrucomicrobiota, Bacteroidota y Actinobacteriota (Yang et al., 2024). En estudios basados en *eDNA* en lagunas chinas, se ha reportado la predominancia de Proteobacteria, Bacteroidota, Actinobacteria y Cyanobacteria, alcanzando más del 90% de la abundancia relativa (Liu et al., 2024; Wang et al., 2022).

En Latinoamérica, Alegría-Gómez et al. (2023) hallaron que Proteobacteria, Cyanobacteria y Bacteroidetes fueron dominantes en la laguna La Encantada, independientemente de la profundidad. Del mismo modo, en la laguna Carioca (Brasil), Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes fueron prevalentes (Santos et al., 2015), mientras que en la laguna Sentani en Papúa, destacaron Proteobacteria, Chloroflexi y

Acidobacteria (Nomosatryo et al., 2025). En ecosistemas tropicales de Bangladés, se encontraron Cyanobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Chloroflexi, Actinobacteria y Verrucomicrobia como principales grupos bacterianos (Azmuda et al., 2019).

En conjunto, estos estudios sugieren que los filos Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes y Cyanobacteria constituyen un núcleo bacteriano común en lagos tropicales (Humbert et al., 2009). Se ha propuesto que estos filos *core* son generalistas con amplia distribución, capaces de colonizar múltiples hábitats (Brown, 1984), a diferencia de los filos satélite, que presentan baja abundancia y mayor especificidad ambiental. Sin embargo, en la Laguna Cube, los filos más predominantes fueron Pseudomonadota y Verrucomicrobiota, considerados menos frecuentes en estudios previos.

Aunque estudios previos no lo reportan como un componente central del microbioma en lagos tropicales, en la Laguna Cube los filos más predominantes fueron Pseudomonadota y Verrucomicrobiota. Los resultados del análisis metagenómico de *eDNA* mostraron que Pseudomonadota fue el filo más abundante dentro del dominio Bacteria y a nivel general, como se observa en la **;Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Esta alta representación podría deberse a la amplia diversidad de estrategias respiratorias de los microorganismos que lo conforman, lo que les permitiría adaptarse a distintos nichos ecológicos (Gao et al., 2024).

Algunos miembros de Pseudomonadota presentan una alta eficiencia en la respiración aeróbica gracias a enzimas con gran afinidad por el oxígeno, lo que les permite adaptarse tanto a condiciones óxidas como subóxidas y ocupar diversos nichos ecológicos. Además, se han identificado capacidades metabólicas en Pseudomonadota y

Bacteroidota asociadas al uso de compuestos nitrogenados como donadores de electrones, lo que sugiere un papel relevante de estos microorganismos en el ciclo del nitrógeno dentro de las lagunas (Gao et al., 2024).

Otro factor que podría explicar la elevada abundancia de Pseudomonadota es su participación en la fijación de carbono a través del ciclo de Calvin–Benson–Bassham (CBB). Se ha reportado que esta vía metabólica ocurre predominantemente en los filos Cyanobacteriota y Pseudomonadota (Gao et al., 2024). Dado que Cyanobacteriota representa menos del 5 % de la comunidad microbiana en todas las profundidades analizadas, se puede inferir que Pseudomonadota desempeña un papel clave en la fijación de carbono mediante la ruta CBB en este ecosistema.

La presencia de Verrucomicrobia es ubicua en cuerpos de agua dulce, con una distribución cosmopolita en lagunas y ríos. Generalmente, este filo representa entre el 1 % y el 6 % de la comunidad microbiana total (Deng et al., 2014). Sin embargo, en la Laguna Cube su abundancia es significativamente mayor, alcanzando aproximadamente el 15 % de la comunidad. Esta alta densidad podría estar relacionada con su participación en el ciclo del carbono, dado que Verrucomicrobia posee genes implicados en diversos procesos metabólicos asociados a este elemento (Deng et al., 2014).

Se ha identificado la presencia de sulfatasas capaces de degradar polisacáridos sulfatados, así como varios genes involucrados en el transporte de carbono a través de la membrana celular, lo que sugiere que miembros de este filo actúan como degradadores de polisacáridos en sistemas de agua dulce (Deng et al., 2014). Los análisis enzimáticos y genómicos, incluyendo datos metagenómicos de ecosistemas dulceacuícolas, marinos y sedimentarios, han vinculado a Verrucomicrobia con el metabolismo de diversos carbohidratos, como laminarina, xilano, manano, quitina, celulosa y almidón. Además

de hidrolasas de glucósidos, este filo posee genes que codifican esterasas de carbohidratos y peptidasas extracelulares, destacándose como el grupo bacteriano con la mayor cantidad de estos genes dentro de la comunidad microbiana (Chiang et al., 2018).

Estudios previos han asociado a Verrucomicrobia con Cyanobacteria, dado que estas últimas constituyen una fuente de compuestos de carbono. No obstante, otros organismos, como el fitoplancton eucariota, también pueden aportar este sustrato, por ejemplo, a través de la quitina (Herlemann et al., 2013).

La abundancia del filo Bacteroidota en la Laguna Cube es particularmente notable en las muestras obtenidas a profundidades de 0 m y 3.5 m, en comparación con aquellas tomadas a 20 m. Esta distribución sugiere una posible asociación con zonas productivas donde la concentración de carbono orgánico disuelto es mayor. Estos hallazgos coinciden con estudios previos, que reportan la presencia de Bacteroidota tanto en el epilimnio como en el hipolimnio en ecosistemas con altos aportes de carbono de origen algal (Bicaldo et al., 2024). Adicionalmente, varios miembros de este filo han sido identificados como degradadores activos de quitina y compuestos de origen vegetal, lo que refuerza su papel en la degradación de materia orgánica compleja en ecosistemas acuáticos (Beier & Bertilsson, 2013).

Por otro lado, el filo Planctomycetota es uno de los más comúnmente asociados con organismos eucarióticos, especialmente en comunidades microbianas vinculadas a algas. Se ha demostrado que el florecimiento de diatomeas y cianobacterias tiene un efecto positivo sobre la abundancia de Planctomycetota, ya que estas bacterias pueden utilizar los compuestos exudados por estos microorganismos como fuente de nutrientes. En particular, este filo presenta una notable capacidad para degradar polímeros sulfatados producidos por las algas, gracias a su repertorio enzimático especializado. De

manera similar, en este estudio observamos un enriquecimiento de estas funciones enzimáticas en las comunidades asociadas a partículas (PA), lo que sugiere una posible interacción funcional entre este filo y la materia orgánica de origen algal. De hecho, estudios genómicos y proteómicos han demostrado que Planctomycetota cuenta con mecanismos para degradar detritos vegetales y polisacáridos derivados de algas. Los carbohidratos disueltos y los detritos vegetales suelen ser altamente abundantes en el material biológico que desciende por la columna de la laguna (Tadonléké, 2007), lo que podría explicar por qué la abundancia de este filo es mayor a 0 m y 20 m en comparación con la de 3.5 m.

La presencia de Chlorobiota muestra una clara tendencia en función de la profundidad en la laguna Cube, con la mayor abundancia observada en la profundidad de 20 m, seguida por las profundidades de 3.5 m y 0 m, en orden descendente. Esta distribución podría explicarse por las condiciones ambientales y los requisitos específicos para la fotosíntesis anoxigénica que caracteriza a las bacterias de este filo. De manera similar a las Cyanobacteria, el filo Chlorobiota está compuesto completamente por bacterias fotosintéticas, que realizan una fotosíntesis sin oxígeno (Bryant & Frigaard, 2006).

Las especies de Chlorobiota se encuentran predominantemente en ambientes acuáticos anóxicos donde la luz solar todavía puede penetrar la columna de agua. Este tipo de hábitat es más común en las profundidades intermedias de los cuerpos de agua, lo que podría justificar la mayor densidad de Chlorobiota observada a 20 m. En comparación, las profundidades más superficiales, como los 0 m y 3.5 m, pueden estar más afectadas por la presencia de oxígeno y otros factores que podrían limitar la proliferación de estos microorganismos (Bryant & Frigaard, 2006; Gupta, 2013).

Aunque muchas de las funciones específicas de Chlorobiota aún no han sido completamente caracterizadas, se ha observado que este filo presenta capacidades clave relacionadas con el proceso de fotosíntesis. En particular, se ha identificado su participación en la formación y mantenimiento de estructuras especializadas para la captación de luz, conocidas como clorosomas. Estas estructuras permiten una alta eficiencia en la absorción de luz bajo condiciones de baja luminosidad, lo cual podría ser un factor determinante para su supervivencia en hábitats anóxicos donde este grupo bacteriano tiende a predominar (Gupta, 2013).

Filos más abundantes dentro de las muestras acuáticas de la Laguna Cube:

Dominio Arquea.

El análisis metagenómico reveló que los filos correspondientes al dominio Arquea más abundantes en la laguna Cube fueron Euryarchaeota, Woesearchaeota, Nitrososphaerota, Bathyarchaeota y Thermoproteota, como se refleja en la ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Esta composición coincide en parte con lo observado en otros ecosistemas tropicales y subtropicales (Tran et al., 2021; Silveira et al., 2013; Kurt, 2019). Por ejemplo, en el lago Tanganyika se reportó una alta abundancia de Thaumarchaeota (ahora Nitrososphaerota), Woesearchaeota, Euryarchaeota y Bathyarchaeota, resaltando su relevancia ecológica en ambientes dulceacuícolas tropicales (Tran et al., 2021). Asimismo, Thaumarchaeota fue dominante en el río Paranóica en Brasil (Silveira et al., 2013), y Euryarchaeota se ha identificado como recurrente en lagunas tropicales (Inceoğlu et al., 2014; Kurt, 2019). En la laguna Valle de Bravo (México), Nanoarchaeota y Woesearchaeota fueron predominantes (Barjau-Aguilar et al., 2025), mientras que en el lago Cohai (China) se encontraron altas proporciones de Crenarchaeota, Thermoplasmatota y Halobacterota (Liu et al., 2024).

Con base en estos estudios y en nuestros resultados, se infiere que Euryarchaeota, Woesearchaeota, Nitrososphaerota y Bathyarchaeota podrían representar el núcleo común de comunidades arqueanas en ecosistemas tropicales. En contraste, la notable abundancia de Thermoproteota en la Laguna Cube, pese a su escasa representación en otros sistemas, sugiere que podría desempeñar funciones específicas aún poco exploradas en estos ambientes.

Euryarchaeota representa más del 50% de la abundancia relativa total en la muestra a 20 m de profundidad, más del 25% a 0 m y aproximadamente el 10% a 3.5 m. Su dominio en la zona hipolimnética de la laguna coincide con hallazgos previos en la laguna Cote, Costa Rica (Brenes-Guillén et al., 2022). Esta distribución puede atribuirse a la presencia de microorganismos con capacidad de fijación de nitrógeno en condiciones subóxicas y anóxicas, similar a lo observado en los filos Chloroflexi y Chlorobiota (Tran et al., 2021). Además, se ha reportado la capacidad de metanogénesis en este filo, lo que explicaría su alta abundancia en mayores profundidades, donde el oxígeno disuelto es menor y la materia orgánica se acumula por sedimentación (Rodrigues et al., 2014). Dado que la metanogénesis es un proceso restringido principalmente a la zona hipolimnética, es probable que una gran proporción de los organismos de Euryarchaeota a 20 m correspondan a taxones metanotrofos.

Woesearchaeota representa aproximadamente el 50% de la abundancia relativa total a 3.5 m de profundidad, más del 25% a 0 m y alrededor del 10% a 20 m. Su elevada abundancia puede atribuirse a su diversidad metabólica, ya que se ha identificado la presencia de genes asociados a los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre (Liu et al., 2021). Además, se ha propuesto que Woesearchaeota podría interactuar bioquímicamente con metanógenos en el ciclo anaeróbico del carbono. Se ha observado

que estos microorganismos realizan fermentación y convierten sustratos orgánicos, como el almidón, en ácido acético o hidrógeno, lo que favorecería el crecimiento de metanógenos acetotróficos o hidrogenotróficos (Huang et al., 2021). Su diversidad metabólica puede explicar su abundante presencia en las tres profundidades muestreadas.

El filo Nitrososphaerota (anteriormente Thaumarchaeota) está altamente representado en la Laguna Cube, aunque su abundancia disminuye con la profundidad. Sus miembros desempeñan un papel clave en los ciclos del carbono y del nitrógeno. En particular, la clase Nitrososphaeria incluye arqueas capaces de oxidar amonio, lo que favorece su presencia en zonas profundas de la columna de agua. Además, estas arqueas presentan un metabolismo autótrofo, utilizando rutas específicas para la fijación de carbono. Algunas especies también muestran una capacidad completa para llevar a cabo el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), lo cual podría estar relacionado con su presencia en zonas más superficiales. Otras características metabólicas frecuentes en este grupo incluyen la producción de cofactores asociados a procesos de metanogénesis y la síntesis de compuestos de almacenamiento, lo que puede contribuir a su persistencia en ambientes profundos y con limitaciones energéticas (Ren & Wang, 2022; Spang et al., 2010; Stieglmeier et al., 2014).

El filo Bathyarchaeota se encuentra distribuido de manera relativamente homogénea en las tres profundidades muestreadas. Aunque suele estar predominantemente asociado con sedimentos, su amplia distribución en la columna de agua puede explicarse por su notable diversidad metabólica. Algunos de sus representantes presentan un metabolismo fotoautótrofo, mientras que otros se han propuesto como metanógenos metilotróficos, capaces de utilizar diversos compuestos

metilados y llevar a cabo procesos fermentativos de péptidos, glucosa y ácidos grasos. Estas capacidades podrían explicar su persistencia en condiciones anóxicas y su presencia a mayores profundidades. Además, se ha documentado su participación en interacciones sintróficas con bacterias reductoras de sulfato durante la oxidación anaerobia del metano (AOM), lo cual refuerza su rol funcional en zonas profundas de ambientes acuáticos (Evans et al., 2015; Zhou et al., 2018).

Finalmente el filo Thermoproteota se encuentra distribuido de manera relativamente homogénea en las tres profundidades muestreadas. Dentro de este filo se han identificado órdenes metanogénicos, como Methylarchaeales (Ma et al., 2024), involucrados en el proceso de metanogénesis previamente mencionado, lo que nuevamente explica la presencia de este filo en la profundidad de 20m. No obstante, también se han registrado microorganismos de este filo que presentan rutas metabólicas alternativas a la metanogénesis, incluyendo la reducción disimilatoria de sulfito, lo que puede explicar su presencia en capas superficiales (Kohtz et al., 2024).

La presencia de estos filos arqueanos sugiere que la Laguna Cube tiene un ecosistema con una rica estratificación funcional y una notable diversidad metabólica. La predominancia de arqueas metanogénicas como Euryarchaeota, Bathyarchaeota y algunos Thermoproteota en las profundidades indica que hay procesos anaeróbicos en marcha, como la metanogénesis activa, que están relacionados con la acumulación de materia orgánica y condiciones anóxicas. Al mismo tiempo, la presencia de filos como Nitrososphaerota en la superficie (un área más oxigenada), donde se llevan a cabo procesos como la oxidación de amonio y la fijación de carbono (Rae & Wang, 2022). La abundancia de Woesearchaeota en las capas intermedias podría ser un vínculo bioquímico entre los procesos fermentativos y metanogénicos, a profundidad, pero también su rol en la participación en ciclos de nitrógeno, azufre y carbono en menores

profundidades (Lui et al., 2021), lo que resalta la complejidad y la interconexión de los ciclos biogeoquímicos en esta laguna.

Filos más abundantes dentro de las muestras acuáticas de la Laguna Cube:

Dominio Eucariotes.

Los resultados muestran que los filos predominantes dentro del grupo taxonómico Eucariota son Rotifera, Euglenozoa, Bacillariophyta, Streptophyta y Ciliophora, mientras que el resto representa en conjunto el 5 % de la abundancia total, como se visualiza en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Estos hallazgos son parcialmente consistentes con estudios metagenómicos previos en lagunas tropicales. Por ejemplo, en las llanuras de inundación del río Araguaia, los filos dominantes son Ciliophora, Chlorophyta y Charophyta (Targueta et al., 2023). De manera similar, estudios sobre comunidades microbianas en humedales urbanos de Bogotá han identificado como filos más abundantes a Ciliophora, Ascomycota, Mesomycetozoa, Opalozoa y Sagenista (Ballesteros et al., 2023). En adición a estos estudios, se ha identificado que los filos fitoplanctónicos con mayor riqueza de especies son: Euglenozoa, Baccillariophyta, Cholophyta y Charophyta, en lagunas tropicales del Noreste de los Andes Colombianos (Ciales-Hernández et al., 2020).

En la Laguna Cube, el filo predominante es Rotifera, con una ligera mayor abundancia a 20 m y 3.5 m de profundidad en comparación con la superficie (0 m), aunque la diferencia es mínima. Los rotíferos constituyen un grupo clave del zooplancton, representando más del 50 % de su productividad. Gracias a su alta adaptabilidad y rápida ocupación de nichos, se han documentado en diversos cuerpos de agua y se han reportado como altamente diversos y abundantes en lagunas tropicales, como en la región de Da Nang, Vietnam (Phan et al., 2021). En los ecosistemas

acuáticos, los rotíferos desempeñan un papel crucial en el flujo de energía, transfiriendo carbono desde el picoplancton y nanoplanciton hacia el macrozooplancton, actuando así como un vínculo entre los bucles microbianos y la red trófica acuática (Devetter & Sed'a, 2003). Diferentes poblaciones de rotíferos participan en distintas redes tróficas, alimentándose de fitoplancton, bacteriplanciton, diatomeas u otras bacterias, dependiendo del tamaño del rotífero y de la disponibilidad de presas en el ambiente. Incluso, se ha demostrado que algunos pueden contrarrestar la toxicidad de las cianotoxinas y depredar cianobacterias, contribuyendo a su control en los ecosistemas (Bonecker & Aoyagui, 2005). Si bien el aumento de la profundidad reduce la penetración de luz y modifica la densidad de fitoplancton y cianobacterias, lo que podría afectar a los rotíferos (Sweeney et al., 2022), los resultados obtenidos no reflejan esta influencia. Esto sugiere que las familias presentes podrían ser generalistas y alimentarse de otras bacterias no fotótrofas, así como de pequeños ciliados y dinoflagelados (Chorus et al., 2000).

El filo Euglenozoa se encuentra predominantemente en la superficie (0 m) en comparación con las otras profundidades analizadas. En las muestras analizadas no se detectó este género, sino el orden Euglenales, caracterizado por su alimentación fotótrofa y, secundariamente, osmótrofa (Kostygov et al., n.d.). Su presencia en la laguna sugiere que estas comunidades se desarrollan principalmente en la zona epilimnética, lo que explica su mayor abundancia en dichas zonas en la columna de agua. Por otro lado, la detección de Euglenozoa a 20 m de profundidad podría atribuirse a la presencia de miembros de la familia Diplonemidae, conocida por habitar nichos con menor disponibilidad de luz y aguas desde moderadamente oxigenadas hasta anóxicas (Flegontova et al., 2020).

El filo Bacillariophyta es uno de los más abundantes en las muestras analizadas, especialmente a 20 m de profundidad. Este grupo, compuesto por diatomeas incluye organismos fotoautótrofos que pueden ser planctónicos, bénicos o ticoplanctónicos (Montero et al., 2023). Su presencia en la laguna es clave, ya que dominan el microfitobentos y desempeñan un papel esencial en la fijación de carbono, proporcionando una fuente fundamental de carbono en zonas tanto fóticas como bénicas; lo que explica su presencia en las profundidades de 0m y 3.5m. En hábitats bénicos, las diatomeas influyen significativamente en el ciclo del carbono. Su movimiento deslizante a través del rafe facilita la excreción de grandes cantidades de mucílago rico en carbono, formado por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Pickett-Heaps, 2003). Estas sustancias constituyen una fuente importante de carbono orgánico, estimulando el crecimiento de bacterias heterotróficas y su actividad de remineralización en zonas profundas. Además, las diatomeas tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones de oscuridad prolongada, a menudo mientras permanecen enterradas en sedimentos anóxicos, recuperando su actividad fotosintética y fijación de carbono al exponerse nuevamente a condiciones favorables en la superficie (Serôdio & Lavaud, 2020).

El filo Streptophyta es otro de los más representados en la Laguna Cube. Aunque su abundancia es similar entre las tres profundidades muestreadas, es ligeramente mayor en la profundidad de 3.5m. Este filo incluye a las algas verdes (charofitas) y las plantas terrestres (Leliaert, 2019). Su abundancia en este ecosistema puede deberse a las condiciones de la laguna, pues esta es una laguna oligótrofa con una temperatura alta que favorece el desarrollo de las especies de este filo, tanto como macrófitas de la familia Charophyaceae en las zonas litorales de la laguna, como algas unicelulares de la familia Zygnematophyceae (Rondón, 2024, Lockridge, 2012). Estas

características explican su presencia a lo largo del perfil vertical de la columna de agua, y sobre todo por qué predominan ligeramente más en la profundidad de 3.5m pues este es un grupo de eucariotas oxigénicos fotosintéticos.

Finalmente, Ciliophora es uno de los filos más representados en la Laguna Cube, con una ligera predominancia a 20 m de profundidad. Los ciliados desempeñan un papel ecológico clave como consumidores de bacterias, algas y otros protistas heterótrofos, además de ser una fuente de alimento para organismos de mayor tamaño, principalmente microcrustáceos como los cladóceros (Weisse & Montagnes, 2022). El análisis metagenómico reveló la presencia de la clase Heterotrichea, caracterizada por su gran tamaño y su modo de nutrición omnívora, alimentándose de una amplia variedad de organismos, desde bacterias hasta metazoos pequeños y microalgas (Wang et al., 2022). Asimismo, se identificaron organismos de la clase Oligohymenophorea, mayormente compuesta por filtradores que consumen bacterias y algas de pequeño tamaño. Mientras que los Oligohymenophorea se encuentran principalmente en la zona epilimnética, los Heterotrichea están presentes tanto en la zona epilimnética como en la hipolimnética, lo que sugiere diferencias en sus nichos ecológicos dentro de la laguna.

Estudios en lagunas de Brasil han reportado una composición similar de ciliados, asociándola a un aporte constante de materia orgánica proveniente tanto de las zonas marginales como de la región central de la laguna (Pauleto et al., 2017). La predominancia de Ciliophora en la Laguna Cube podría estar influenciada por procesos similares, reflejando la importancia del flujo de materia orgánica en la estructura de la comunidad microbiana.

Filos más abundantes dentro del grupo taxonómico de los Virus en las muestras de agua de la Laguna Cube.

En los ecosistemas acuáticos, los virus son ubicuos y juegan un papel esencial en el funcionamiento biogeoquímico, no solo los organismos procariotas y eucariotes. Los virus, mediante la lisis celular, liberan materia orgánica disuelta (DOM) y nutrientes, favoreciendo el reciclaje de elementos clave. Además, regulan procesos como la respiración, la producción primaria y la diversidad microbiana y eucariota, al afectar directamente a sus hospedadores (Almeida et al., 2015); por lo que es importante de igual manera conocer su abundancia en las muestras analizadas.

Los resultados muestran que los filos virales más predominantes en las muestras fueron Uroviricota, Nucleocytoviricota, Dishui Lake Large Algae Virus 1 y Cressdnnaviricota, como se observa en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** La dominancia de Uroviricota ya ha sido reportada en otros ecosistemas dulceacuícolas, como en el estudio de Oliver et al. (2024), donde representó el 71,3 % de las secuencias virales en la laguna Mendota (Wisconsin, EE. UU.). De manera similar, Nucleocytoviricota, un grupo de virus gigantes de ADN de doble hebra con replicación nucleocitoplasmática, ha sido identificado en varios cuerpos de agua dulce del hemisferio norte (Mohiuddin & Schellhorn, 2020). Dentro de este filo, destacan géneros como Paramecium bursaria Chlorella virus 1, virófagos que infectan microalgas verdes del género Chlorella (Sheng et al., 2022).

Dishui Lake Large Algae Virus 1 también es un virófago común en sistemas templados, y en ambientes como el lago Ontario puede llegar a representar hasta el 80 % de la población viral (Palermo et al., 2019). Se trata de un virus de ADN de doble

hebra, de pequeño tamaño, que parasita virus gigantes e infecta eucariotes unicelulares como protozoos y algas (Shengzhong et al., 2020).

Por otro lado, Cressdnnaviricota agrupa virus con genomas circulares de ADN monocatenario (ssDNA), conocidos por su diversidad y amplio rango de hospederos, que incluye tanto organismos acuáticos como invertebrados terrestres. Han sido detectados en muestras de agua dulce y aislados a partir de moluscos, gasterópodos y crustáceos (Kim et al., 2020).

Esta influencia viral se enmarca en la hipótesis de "eliminando al ganador" (killing the winner), la cual plantea que los procariotas más abundantes enfrentan mayor presión viral, ya que la tasa de infección depende de la abundancia y el tipo de hospedador (Winter et al., 2010). Así, los virus modulan la dinámica poblacional bacteriana y promueven la diversidad al limitar el crecimiento de especies dominantes. Se estima que pueden ser responsables de hasta el 40 % de la mortalidad bacteriana en aguas superficiales (Fuhrman & Noble, 1995).

En este contexto, la alta abundancia de Uroviricota y Nucleocytoviricota observada en este estudio es consistente con la composición microbiana identificada mediante *eDNA*. Uroviricota incluye principalmente bacteriófagos, mientras que Nucleocytoviricota agrupa virus que infectan eucariotas, incluidos virófagos (Mohiuddin & Schellhorn, 2020; Oliver et al., 2024). Este patrón viral concuerda con la dominancia bacteriana encontrada en los resultados taxonómicos, lo que sugiere una presión viral significativa sobre los filos microbianos más abundantes, en línea con la hipótesis de "eliminando al ganador". Esta interacción viral podría tener un rol clave en la regulación de la diversidad y los flujos de materia en el ecosistema.

Análisis de diversidad alfa y distribución de filos

Una vez caracterizada la composición taxonómica a nivel de filos en los distintos dominios (Bacteria, Arquea, Eucariotes y Virus), se procedió a analizar la diversidad biológica de las muestras de *eDNA*. El objetivo fue evaluar si la riqueza, equitatividad y dominancia de filos varían entre las tres profundidades muestreadas. Este análisis es fundamental, ya que la diversidad biológica influye directamente en los procesos ecológicos que sostienen el funcionamiento del ecosistema en los ecosistemas acuáticos (Van der Plas et al., 2025).

Para evaluar la diversidad alfa, se realizó el cálculo de dos índices de diversidad: Shannon e inverso de Simpson; y del mismo modo se cuantificó la riqueza específica a nivel de filo de las muestras de *eDNA* analizadas. En cuanto al índice de Shannon, esta es una medida de diversidad que combina la riqueza de especies con la equitatividad en su abundancia. Valores más altos indican comunidades más diversas y equitativas (Shannon, 1948). A su vez, la riqueza específica es una medida de biodiversidad que indica simplemente el número total de especies presentes en una comunidad (Pielou, 1966).

Como se visualiza en la **Tabla 3**, la riqueza específica entre filos no presenta variaciones significativas. A una profundidad de 0 m, se registraron un total de 225 filos, a 3.5 m 243 filos, y finalmente, a 20 m, 216 filos. Esto indica que la mayor riqueza de filos se encuentra a una profundidad de 3.5 m. Del mismo modo al contemplar el índice de diversidad de Shannon, tampoco es evidente variaciones importantes al comparar entre profundidades. El hecho de que no existan diferencias relevantes en la riqueza taxonómica a nivel de filos, que el índice de diversidad de Shannon no varíe notoriamente entre profundidades y que además la mayoría de estos

filos sean compartidos entre las tres profundidades muestreadas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), puede estar relacionado con las dinámicas hidrológicas de las lagunas tropicales.

De acuerdo con Lockridge, 2012; la Laguna Cube presenta un comportamiento meromíctico, caracterizado por una estratificación vertical estable. En estos sistemas, la capa más profunda —conocida como monimolimnio— permanece aislada del resto del cuerpo de agua, es completamente anóxica y no participa en los procesos de mezcla estacional. En contraste, las capas superiores, correspondientes al mixolimnio, experimentan mezclas periódicas promovidas por la acción del viento y las variaciones térmicas superficiales (De Crop & Verschuren, 2019).

En regiones cercanas al Ecuador, como en el caso de la Laguna Cube, la variación estacional de la insolación solar es mínima (aproximadamente un 12 %), lo que reduce las diferencias térmicas entre estaciones y, por ende, disminuye la ocurrencia de períodos de mezcla bien definidos. Esta configuración climática favorece que las lagunas tropicales cálidas presenten una estratificación más débil y transitoria, con episodios de mezcla parcial o completa en las capas superficiales a lo largo del año, mientras que la capa profunda puede mantenerse aislada (Berger & Loutre, 1991).

No obstante, como señala Lockridge (2012), aunque se registraron condiciones de hipoxia (niveles bajos de oxígeno disuelto) en mediciones realizadas en el fondo, ninguna presentó anoxia completa. Esto sugiere la posibilidad de mezclas ocasionales entre el epilimnio (capa superficial) y el hipolimnio (capa profunda), que interrumpen temporalmente la estratificación y permiten el ingreso de oxígeno a capas intermedias o profundas, lo que explicaría la presencia de hipoxia en lugar de anoxia total.

Esta interpretación se sustenta en el mismo estudio de Lockridge et al. (2012), donde se describe un patrón claro de disminución del oxígeno disuelto con la profundidad, con valores superiores a 8 ppm en la superficie que descienden a menos de 2 ppm en las capas más profundas. Sin embargo, entre los 8 y 12 metros de profundidad, se observó un aumento localizado del oxígeno disuelto (de 4 a 6 ppm), lo que podría indicar la presencia de procesos biológicos o físicos que alteran temporalmente el perfil vertical de oxígeno (Material Suplementario 2).

La mezcla estacional de la laguna, aunque parcial y transitoria, genera condiciones abióticas más homogéneas a lo largo de la columna de agua. Durante los eventos de mezcla, los nutrientes, el oxígeno disuelto y otras sustancias se distribuyen de manera más uniforme entre las diferentes capas, lo que contribuye a una mayor uniformidad en las condiciones del entorno acuático. En particular, las mediciones de fluoruro (F^-), nitrito (NO_2^-), fosfato (PO_4^{3-}), cloruros (Cl^-), carbono orgánico total, bario (Ba), calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg) y sodio (Na) presentaron poca variación entre las tres profundidades muestreadas (Material Suplementario 1) lo que respalda la idea de que la distribución de estos parámetros es más homogénea debido a los procesos de mezcla.

La diversidad microbiana también fue evaluada mediante el índice inverso de Simpson. Esta medida considera tanto la riqueza de especies como su equitatividad, y aumenta a medida que la comunidad es más diversa. Se interpreta como el número efectivo de especies dominantes: valores más altos indican mayor diversidad, mientras que valores bajos reflejan dominancia de pocas especies (Simpson, 1949). En cuanto a la diversidad microbiana evaluada mediante el índice inverso de Simpson (1/D), se evidencia un patrón de aumento de la diversidad con el aumento de la profundidad,

como se representa en la **Tabla 3**. Un patrón similar, aunque con diferencias menos marcadas, se evidenció con el índice de Shannon (H'), cuyo valor fue más alto a 20 m (2.51) y más bajo a 0 m (2.28). Esta tendencia de aumento en la diversidad con la profundidad ha sido reportada en otros sistemas tropicales, como en la Laguna Cote, donde las diferencias entre zonas eran aún más pronunciadas ($1/D = 109$ en el hipolimnio y $1/D = 35$ en el epilimnio) (Brenes-Guillén et al., 2022).

Una posible explicación para esta tendencia se relaciona con las condiciones abióticas características del hipolimnio. En esta zona, donde se presentan condiciones hipóxicas y concentraciones elevadas de nutrientes clave como el amonio, es posible que se favorezca una mayor diversidad microbiana debido a la coexistencia de procesos metabólicos aeróbicos y anaeróbicos (Fernandez et al., 2020).

El perfil vertical del oxígeno disuelto en la Laguna Cube, según Lockridge (2012), revela una capa superficial bien oxigenada de aproximadamente 2 metros, seguida de un descenso progresivo del oxígeno con la profundidad. Sin embargo, este patrón no es lineal: entre los 8 y 10 metros se observa un incremento inusual en la concentración de oxígeno, que sugiere la presencia de una zona de coexistencia con distintas disponibilidades de oxígeno. Este fenómeno podría explicarse por una floración metalimnética de cianobacterias autótrofas fijadoras de nitrógeno que producen oxígeno por fotosíntesis en esa capa intermedia (Gallon, 2001; Lockridge, 2012). Estas variaciones verticales en el oxígeno disuelto podrían explicar el incremento observado en la diversidad y riqueza de filos en el hipolimnio y el mixolimnio en comparación con el epilimnio. La coexistencia de zonas con diferentes disponibilidades de oxígeno favorece la presencia de microorganismos con rutas metabólicas diversas,

tanto aerobias como anaerobias, lo que contribuye a una mayor de la comunidad microbiana.

No obstante, es importante considerar que el *eDNA* presente en la superficie (0 m) puede ser más difícil de detectar e identificar, ya que la exposición a la radiación ultravioleta acelera su degradación (Barnes & Turner, 2016). Esto implica que tanto la diversidad como la riqueza observadas en esta capa superficial podrían estar subrepresentadas en el análisis debido a la pérdida de material genético.

Análisis funcional de la Laguna Cube

Los resultados obtenidos hasta ahora sobre la caracterización taxonómica de las muestras de *eDNA* a nivel de filo en las tres profundidades analizadas (0 m, 3.5 m y 20 m) revelan que no todos los filos varían significativamente en abundancia entre profundidades, sino únicamente unos puntuales. En cuanto a la diversidad, se observa que la mayoría de los filos están presentes en las tres profundidades analizadas, y que esta diversidad se mantiene relativamente constante en cada profundidad, aunque con una ligera tendencia al aumento de diversidad conforme aumenta la profundidad. Esto sugiere que, más que en la composición taxonómica, las diferencias entre profundidades podrían encontrarse en los procesos metabólicos del ecosistema acuático.

El metabolismo acuático es una herramienta clave para comprender las dinámicas ecológicas en cuerpos de agua, ya que regula procesos fundamentales como los ciclos del carbono y el flujo energético (Zhang et al., 2023). Para explorar el metabolismo en la Laguna del Cube, se eligió analizar un proceso central: la fotosíntesis; debido a su papel esencial en el ciclo del carbono, la producción primaria y

la respiración, todos ellos procesos clave dentro del flujo energético del sistema (Rodríguez-Castillo et al., 2019).

Genes relacionados a procesos fotosintéticos.

Para analizar el proceso fotosintético dentro de la Laguna Cube, se analizaron los 10 genes ortólogos (KO) más abundantes relacionados a este proceso. Un ortólogo funcional o KO, es un grupo de genes o proteínas de diferentes organismos que realizan la misma función biológica, aunque no sean idénticos en su secuencia (*KEGG ORTHOLOGY*, n.d.).

En la **Figura 9**, se representan los 10 Kegg Orthologs más abundantes relacionados al proceso de fotosíntesis. De los 10 de los KO identificados, se identificaron 2 rutas metabólicas conocidas a las cuales estos KO se encuentran relacionados. Estas rutas son: fotosíntesis y fosforilación oxidativa; y las dos presentan un mayor número de transcritos por millón en la zona epilimnótica de la laguna (0m).

Análisis de KO relacionados a fotosíntesis.

El gen ortólogo K02703 (*psbA*) corresponde a la proteína D1 del centro de reacción P680 del fotosistema II, un componente esencial del aparato fotosintético en organismos oxigénicos. Esta proteína juega un papel central en la captura de energía luminosa y en la excitación de electrones, facilitando la fotólisis del agua, proceso mediante el cual se libera oxígeno molecular y se generan electrones. Estos electrones son transferidos a la plastoquinona (PQ), que es reducida a plastoquinol (PQH₂) a través de la reacción R09503: H₂O:plastoquinona reductasa (dependiente de la luz) (Ravnikar et al., 1989). La detección de este ortólogo sugiere la presencia de organismos fotosintéticos funcionales capaces de realizar la fase luminosa de la fotosíntesis, lo cual

podría estar vinculado a las condiciones de luz y oxígeno en las capas superiores de la columna de agua.

El ID K02689 corresponde a la apoproteína A1 de la clorofila P700 del fotosistema I (*psaA*). Esta proteína es esencial para la función del fotosistema I (PSI), donde participa directamente en la reacción R09542: plastocianina:ferredoxina oxidorreductasa (dependiente de la luz). En esta etapa, los electrones transportados desde el fotosistema II son utilizados para reducir la ferredoxina, un paso clave en la generación de poder reductor (NADPH) para la fijación de carbono (Smart & McIntosh, 1991).

El gen ortólogo K02704 (*psbB*) corresponde a la apoproteína CP47 de la clorofila del fotosistema II, la cual se asocia directamente con el centro de reacción del fotosistema II y participa en la fase lumínica de la fotosíntesis captando y transfiriendo la energía lumínica hacia la proteína D1 (*psbA*). Finalmente, el ortólogo K02705 corresponde a la apoproteína CP43 de la clorofila del fotosistema II, y tiene el mismo rol que la apoproteína CP47 (*psbB*) (*KEGG ORTHOLOGY, n.d.*).

Los genes ortólogos mencionados anteriormente corresponden únicamente al proceso del metabolismo de la fotosíntesis, sin embargo, el resto de ortólogos analizados en la muestra también son parte de esta vía metabólica pero a su vez se encuentran dentro del metabolismo de la fosforilación oxidativa (*KEGG ORTHOLOGY, n.d.*).

El ID K02108 corresponde a la subunidad a de la ATPasa tipo F (*atpB*), una enzima esencial tanto en la fosforilación oxidativa como en la fotosíntesis. AtpB se encuentra como subunidad del complejo F de la ATP sintasa en procariotas y

cloroplastos; por lo tanto, está involucrada en el transporte de protones (H^+) a través de la membrana tilacoidal o plasmática. Dicho transporte crea el gradiente protónico que impulsa el complejo ATP sintasa para generar ATP (Pierson et al., 2011)

También se identificaron los genes ortólogos: K02108, K02110 y K02115; correspondientes a las subunidades a, c y gamma de la ATPasa tipo F (*atpB*), una enzima esencial tanto en la fosforilación oxidativa como en la fotosíntesis. Estas subunidades forman parte del complejo F_0 de la ATP sintasa en procariotas y cloroplastos, y están involucradas en el transporte de protones (H^+) a través de la membrana tilacoidal o plasmática. El gradiente de protones generado durante el transporte de electrones fotosintético impulsa este complejo en la síntesis de ATP. Su participación en múltiples rutas metabólicas refleja la interconexión entre la fotosíntesis y la producción de energía química (Pierson et al., 2011; Werner et al., 1990).

De manera similar, los genes ortólogos K02111 y K02112 corresponden a las subunidades alfa y beta de la ATPasa tipo F dependiente de H^+/Na^+ , y de igual manera corresponden a enzimas translocasas responsables de catalizar la translocación de protones por la membrana plasmática o tilacoidal, y se vinculan con la hidrólisis del nucleósido trifosfato (Boyer, 1993).

Familias de organismos asociadas a genes fotosintéticos.

Al vincular el análisis funcional con la composición taxonómica, los resultados metagenómicos revelan que la capacidad fotosintética está asociada a distintas familias microbianas según la profundidad.

En la capa superficial (0 m), la familia Euglenaceae representa aproximadamente el 35 % de los genes relacionados con procesos fotosintéticos (Material Suplementario

3), lo que sugiere un predominio de estos eucariotas fotosintéticos en esta zona con mayor disponibilidad de luz. Esto es soportado en la literatura pues microorganismos de esta familia contienen los pigmentos de clorofila a y b que les permite capturar la energía lumínica para gatillar los procesos fotosintéticos. Es interesante notar que esta familia es capaz de utilizar tanto la fotosíntesis como la asimilación heterotrófica oxidativa como dos mecanismos intercambiables para conseguir energía como carbono (Buetow, 2011); sin embargo en base a los resultados obtenidos, se puede inferir que hay una tendencia a que los miembros de esta familia obtengan su energía y carbono primordialmente mediante procesos fotosintéticos. Este hallazgo es interesante pues, en comparación con otros estudios no solo en lagunas tropicales, sino en lagunas en general, se ha reportado comúnmente que Cyanobacteriota es uno de los filos dominantes dentro de las capas oxigenadas de agua y que de hecho generalmente es el fotótrofo bacteriano dominante (Yannarell & Kent, 2009).

La baja representatividad del filo Cyanobacteriota en la Laguna de Cube puede atribuirse a su naturaleza oligotrófica. Esta laguna presenta concentraciones reducidas de nutrientes esenciales, particularmente nitrógeno y fósforo, los cuales son elementos limitantes clave para el crecimiento de las cianobacterias. En ecosistemas acuáticos tropicales, se ha documentado que la escasez de estos nutrientes restringe el desarrollo y posterior proliferación (*o bloom*) de cianobacterias (Yannarell & Kent, 2009).

Además, la Laguna de Cube se caracteriza por estar en constante mezcla, lo que impide la estratificación térmica y permite la oxigenación del hipolimnio (Lockridge, 2012). Estas condiciones favorecen la limitación de nutrientes al inhibir la liberación interna de nutrientes desde los sedimentos hacia la columna de agua, lo que refuerza un estado de baja disponibilidad nutricional (Kibuye et al., 2021).

Por otro lado, aunque las cianobacterias poseen una ventaja competitiva frente a otros fitoplancton al poder regular su flotabilidad y optimizar su acceso a la luz y nutrientes, esta capacidad se ve afectada en sistemas altamente mezclados (Huisman et al., 1999). Cuando la tasa de mezcla de la columna de agua supera la velocidad de ascenso de las células de cianobacterias, estas se ven desplazadas hacia zonas más profundas y con menor disponibilidad de luz, lo que limita su crecimiento (Huisman et al., 2004). En estos escenarios, el crecimiento de cianobacterias se ve suprimido, favoreciendo en su lugar a organismos como las diatomeas y algas verdes, que están mejor adaptados a condiciones de luz variables (Visser et al., 2016). Esta dinámica parece reflejarse en las condiciones ecológicas observadas en la Laguna de Cube.

En contraste, a profundidades mayores, la familia Chlorobiaceae, compuesta por bacterias fotosintéticas anaerobias, adquiere mayor relevancia, representando cerca del 35 % a 3.5 m y más del 50 % a 20 m (Material Suplementario 3). La estrecha asociación de esta familia con los genes fotosintéticos y su aumento en abundancia a mayores profundidades, se relaciona con su caracterización de ser organismos fotosintéticos anoxigénicos que poseen clorosomas con pigmentos especiales como bacterioclorofilas y carotenoides, que les permite capturar la luz a menor intensidad (Overmann, 2006).

Este cambio en la composición, donde en capas superficiales Euglanaceae parece realizar los procesos fotosintéticos, mientras que en capas más profundas la familia Chlorobiaceae es la encargada de este proceso; sugiere una posible estratificación comunidad microbiana relacionada a la funcionalidad, en la que los tipos de organismos fotosintéticos varían en función de factores como la disponibilidad de luz y oxígeno a lo largo de la columna de agua.

CONCLUSIÓN

En cuanto a la composición taxonómica, se determinó que los filos predominantes son bacterianos, y que la mayoría de los filos identificados para los dominios Bacteria, Arquea, Eucariotes y Virus han sido previamente reportados en otras lagunas tropicales, lo que respalda la validez de los resultados obtenidos. En términos de abundancia, aunque algunos filos variaron su presencia entre profundidades, otros se mantuvieron constantes a lo largo de la columna de agua.

Los análisis de diversidad mostraron que tanto la riqueza de filos como el índice de Shannon permanecieron estables a lo largo de las profundidades muestreadas, y que la mayoría de los filos fueron compartidos entre las tres capas analizadas. Estos resultados pueden explicarse por las dinámicas limnológicas propias de una laguna mezclada ubicada en la región tropical. En cuanto al índice inverso de Simpson, se evidenció un ligero aumento de la diversidad con la profundidad, posiblemente relacionado con las variaciones del perfil de oxígeno disuelto a lo largo de la columna de agua.

Respecto al análisis funcional, la visualización de los genes ortólogos más abundantes relacionados con la fotosíntesis sugiere una estratificación funcional, con una mayor abundancia de estos genes en las capas superficiales, lo cual se relaciona con la mayor disponibilidad de luz y CO₂ en esas zonas. Podría existir una concordancia con las familias taxonómicas asociadas, ya que se observó que Euglenozoa predominó en las capas superficiales, mientras que Chlorobiaceae fue más abundante en las capas profundas. Esto sugiere que la identidad de los microorganismos responsables de este

proceso metabólico varía de acuerdo con su fisiología y con las condiciones abióticas del entorno.

Al comparar estos resultados con estudios realizados en otras lagunas tropicales, se destaca la baja representatividad de Cyanobacteriota, un filo comúnmente reportado como dominante en lagunas tropicales, subtropicales y templadas. Esta observación sugiere que la comunidad microbiana de la Laguna de Cube posee características particulares.

Los hallazgos de esta investigación permiten establecer una línea base para estudios a largo plazo en este ecosistema o en sistemas similares. El conocimiento generado sobre la composición taxonómica y funcional del ecosistema acuático de la Laguna de Cube es de gran importancia, no solo por tratarse de un sitio RAMSAR, sino también por ser una laguna alimentada por ríos intermitentes. En un contexto de cambio climático, crecimiento poblacional y aumento en la demanda de recursos naturales, resulta fundamental comprender la ecología de los sistemas hidrológicos alimentados por ríos intermitentes, ya que estos factores actúan como presiones ambientales que pueden convertir más ríos perennes en intermitentes (Chiu et al., 2017).

Recomendaciones

A partir de los hallazgos obtenidos, se pueden plantear algunas recomendaciones que podrían guiar investigaciones futuras en este ecosistema o en otros similares. En primer lugar, se recomienda aumentar el número de muestras a analizar, así como el volumen de agua filtrada por muestra, con el fin de maximizar la robustez de los resultados y mejorar la concentración de ADN recuperado, respectivamente. También se sugiere realizar la toma de muestras no solo en la zona más profunda del cuerpo de agua, sino también en otros sectores de la laguna, como la zona litoral, para evaluar

cómo influye la cercanía a la orilla en la composición y funcionalidad del ADN ambiental. Además, sería pertinente llevar a cabo estudios similares en otras lagunas costeras tropicales, con el objetivo de contrastar si se observan patrones similares en cuanto a abundancia taxonómica y funcional, como los obtenidos en la Laguna de Cube. Finalmente, considerando que los resultados revelaron una estratificación funcional de los genes ortólogos relacionados con la fotosíntesis, se recomienda extender el análisis a otros procesos metabólicos relevantes para los sistemas acuáticos, con el propósito de evaluar si también presentan una distribución funcional diferenciada a lo largo del perfil vertical de la columna de agua.

En conjunto, esta investigación representa un aporte significativo al conocimiento sobre la ecología microbiana de ecosistemas acuáticos tropicales poco estudiados, como la Laguna de Cube. El uso de herramientas metagenómicas de última generación permitió no solo describir la diversidad microbiana presente, sino también evidenciar patrones funcionales asociados en cada el perfil vertical de agua muestreado. Estos hallazgos no solo refuerzan la importancia de aplicar enfoques multidimensionales (proporcionados por el secuenciamiento tipo *shotgun*) para comprender la complejidad de los sistemas acuáticos, sino que también resaltan la necesidad de continuar investigando en ecosistemas locales, donde factores geográficos, climáticos y antropogénicos específicos, pueden generar comunidades únicas. De esta manera, este estudio sienta las bases para el monitoreo futuro del ecosistema y contribuye al diseño de estrategias de conservación más precisas en un contexto de cambio ambiental global.

REFERENCIAS

- Alegría-Gómez, J., Castañón-González, J. H., Hernández-García, J. A., González-Terreros, E., Velázquez-Ríos, I. O., & Ruíz-Valdiviezo, V. M. (2023). Changes in the abundance and diversity of bacterial and archaeal communities at different depths in a eutrophic freshwater lake in southwestern Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(43), 98362–98376.
<https://doi.org/10.1007/s11356-023-29380-1>
- Almeida, R. M., Roland, F., Cardoso, S. J., Farjalla, V. F., Bozelli, R. L., & Barros, N. O. (2015). Viruses and bacteria in floodplain lakes along a major Amazon tributary respond to distance to the Amazon River. *Frontiers in Microbiology*, Volume 6-2015.
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.00158>
- Altermatt, F., Carraro, L., Antonetti, M., Albouy, C., Zhang, Y., Lyet, A., Zhang, X., & Pellissier, L. (2023). Quantifying biodiversity using eDNA from water bodies: General principles and recommendations for sampling designs. *Environmental DNA*, 5(4), 671–682. <https://doi.org/10.1002/edn3.430>
- Ballesteros, N., Páez, L., Luna, N., Reina, A., Urrea, V., Sánchez, C., Ramírez, A., Ramírez, J. D., & Muñoz, M. (2023). Characterization of microbial communities in seven wetlands with different anthropogenic burden using Next Generation Sequencing in Bogotá, Colombia. *Scientific Reports*, 13(1), 16973.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-42970-w>
- Barjau-Aguilar, M., Reyes-Hernández, A. M. J., Merino-Ibarra, M., Vilaclara, G., Ramírez-Zierold, J. A., & Alcántara-Hernández, R. J. (2025). Diversity and

- Structure of the Prokaryotic Community in Tropical Monomictic Reservoir.
Microbial Ecology, 88(1), 12. <https://doi.org/10.1007/s00248-025-02508-1>
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Beier, S., & Bertilsson, S. (2013). Bacterial chitin degradation—Mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in Microbiology, Volume 4-2013*. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2013.00149>
- Berger, A., & Loutre, M. F. (1991). Insolation values for the climate of the last 10 million years. *Quaternary Science Reviews*, 10(4), 297–317. [https://doi.org/10.1016/0277-3791\(91\)90033-Q](https://doi.org/10.1016/0277-3791(91)90033-Q)
- Bessey, C., Jarman, S. N., Berry, O., Olsen, Y. S., Bunce, M., Simpson, T., Power, M., McLaughlin, J., Edgar, G. J., & Keesing, J. (2020). Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding. *Environmental DNA*, 2(4), 493–504. <https://doi.org/10.1002/edn3.74>
- Beule, L., & Karlovsky, P. (2020). Improved normalization of species count data in ecology by scaling with ranked subsampling (SRS): Application to microbial communities. *PeerJ*, 8, e9593. <https://doi.org/10.7717/peerj.9593>
- Bicaldo, I. E. C., Padilla, K. S. A. R., Tu, T.-H., Chen, W. T., Mendoza-Pascual, M. U., Vicera, C. V. B., de Leon, J. R., Poblete, K. N., Austria, E. S., Lopez, M. L. D., Kobayashi, Y., Shiah, F.-K., Papa, R. D. S., Okuda, N., Wang, P.-L., & Lin, L.-H. (2024). The methane-oxidizing microbial communities of three maar lakes in tropical monsoon Asia. *Frontiers in Microbiology*, 15.

- <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.140666>
- Bonecker, C., & Aoyagui, A. (2005). Relationships Between Rotifers, Phytoplankton and Bacterioplankton in the Corumbá Reservoir, Goiás State, Brazil. In *Hydrobiologia* (Vol. 546, pp. 415–421). https://doi.org/10.1007/1-4020-4408-9_43
- Boyer, P. D. (1993). The binding change mechanism for ATP synthase—Some probabilities and possibilities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1140(3), 215–250. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90063-L](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90063-L)
- Brenes-Guillén, L., Vidaurre-Barahona, D., Avilés-Vargas, L., Castro-Gutierrez, V., Gómez-Ramírez, E., González-Sánchez, K., Mora-López, M., Umaña-Villalobos, G., Uribe-Lorío, L., & Hassard, F. (2022). First insights into the prokaryotic community structure of Lake Cote, Costa Rica: Influence on nutrient cycling. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.941897>
- Broadhurst, H. A., Gregory, L. M., Bleakley, E. K., Perkins, J. C., Lavin, J. V., Bolton, P., Browett, S. S., Howe, C. V., Singleton, N., Tansley, D., Sales, N. G., & McDevitt, A. D. (2021). Mapping differences in mammalian distributions and diversity using environmental DNA from rivers. *Science of The Total Environment*, 801, 149724. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149724>
- Brown, J. H. (1984). On the Relationship between Abundance and Distribution of Species. *The American Naturalist*, 124(2), 255–279. JSTOR. <http://www.jstor.org/stable/2461494>

- Brown, M. V., Ostrowski, M., Grzymski, J. J., & Lauro, F. M. (2014). A trait based perspective on the biogeography of common and abundant marine bacterioplankton clades. *Marine Genomics*, 15, 17–28.
<https://doi.org/10.1016/j.margen.2014.03.002>
- Bryant, D. A., & Frigaard, N.-U. (2006). Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends in Microbiology*, 14(11), 488–496.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.09.001>
- Buetow, D. E. (2011). Euglena. In *ELS*.
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001964.pub3>
- Carraro, L., Blackman, R. C., & Altermatt, F. (2022). Modelling eDNA transport in river networks reveals highly resolved spatio-temporal patterns of freshwater biodiversity. *BioRxiv*, 2022.01.25.475970.
<https://doi.org/10.1101/2022.01.25.475970>
- Celi, J. E., & Villamarín, F. (2020). Freshwater ecosystems of Mainland Ecuador: Diversity, issues and perspectives. *Acta Limnologica Brasiliensis*, 32.
- CEPF. (2005). *Tumbes-Chocó-Magdalena—Threats*. <https://www.cepf.net/our-work/biodiversity-hotspots/tumbes-choco-magdalena/threats>
- Chiang, E., Schmidt, M. L., Berry, M. A., Biddanda, B. A., Burtner, A., Johengen, T. H., Palladino, D., & Denef, V. J. (2018). Verrucomicrobia are prevalent in north-temperate freshwater lakes and display class-level preferences between lake habitats. *PLoS ONE*, 13(3), e0195112.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195112>
- Chiu, M.-C., Leigh, C., Mazor, R., Cid, N., & Resh, V. (2017). Chapter 5.1—Anthropogenic Threats to Intermittent Rivers and Ephemeral Streams. In T. Datry, N. Bonada, & A. Boulton (Eds.), *Intermittent Rivers and Ephemeral*

- Streams* (pp. 433–454). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803835-2.00017-6>
- Chorus, I., Falconer, I., Salas, H., & Bartram, J. (2000). Health Risks Caused by Freshwater Cyanobacteria in Recreational Waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 3, 323–347.
<https://doi.org/10.1080/109374000436364>
- Cowart, D. A., Matabos, M., Brandt, M. I., Marticorena, J., & Sarrazin, J. (2020). Exploring Environmental DNA (eDNA) to Assess Biodiversity of Hard Substratum Faunal Communities on the Lucky Strike Vent Field (Mid-Atlantic Ridge) and Investigate Recolonization Dynamics After an Induced Disturbance. *Frontiers in Marine Science, Volume 6-2019*.
<https://www.frontiersin.org/journals/marine-science/articles/10.3389/fmars.2019.00783>
- Criales-Hernández, M.-I., Sanchez-Lobo, D.-M., Almeyda-Osorio, J.-K., Criales-Hernández, M.-I., Sanchez-Lobo, D.-M., & Almeyda-Osorio, J.-K. (2020). Expanding the knowledge of plankton diversity of tropical lakes from the Northeast Colombian Andes. *Revista de Biología Tropical*, 68, 159–176.
<https://doi.org/10.15517/rbt.v68is2.44347>
- De Crop, W., & Verschuren, D. (2019). Determining patterns of stratification and mixing in tropical crater lakes through intermittent water-column profiling: A case study in western Uganda. *Journal of African Earth Sciences*, 153, 17–30.
<https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2019.02.019>
- Deng, Y., Cui, X., Hernández, M., & Dumont, M. G. (2014). Microbial Diversity in Hummock and Hollow Soils of Three Wetlands on the Qinghai-Tibetan Plateau

- Revealed by 16S rRNA Pyrosequencing. *PLOS ONE*, 9(7), e103115.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103115>
- Devetter, M., & Sed'a, J. (2003). Rotifer fecundity in relation to components of microbial food web in a eutrophic reservoir. *Hydrobiologia*, 504(1), 167–175.
<https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000008516.19947.a6>
- Eichmiller, J. J., Best, S. E., & Sorensen, P. W. (2016). Effects of Temperature and Trophic State on Degradation of Environmental DNA in Lake Water. *Environmental Science & Technology*, 50(4), 1859–1867.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05672>
- Eisen, J. A. (2007). Environmental Shotgun Sequencing: Its Potential and Challenges for Studying the Hidden World of Microbes. *PLOS Biology*, 5(3), e82.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050082>
- Evans, P. N., Parks, D. H., Chadwick, G. L., Robbins, S. J., Orphan, V. J., Golding, S. D., & Tyson, G. W. (2015). Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science*, 350(6259), 434–438. <https://doi.org/10.1126/science.aac7745>
- Fernandez, L., Peura, S., Eiler, A., Linz, A. M., McMahon, K. D., & Bertilsson, S. (2020). Diazotroph Genomes and Their Seasonal Dynamics in a Stratified Humic Bog Lake. *Frontiers in Microbiology*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01500>
- Flegontova, O., Flegontov, P., Londoño, P. A. C., Walczowski, W., Šantić, D., Edgcomb, V. P., Lukeš, J., & Horák, A. (2020). Environmental determinants of the distribution of planktonic diplomonads and kinetoplastids in the oceans. *Environmental Microbiology*, 22(9), 4014–4031. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15190>

- Francisco Cuesta, P. M., Manuel Peralvo, Andrés Merino-Viteri, Macarena Bustamante, Francis Baquero, Juan F. Freile, & Torres-Carvajal, O. (2017). Priority areas for biodiversity conservation in mainland Ecuador. *Neotropical Biodiversity*, 3(1), 93–106. <https://doi.org/10.1080/23766808.2017.1295705>
- Fuentes-Pardo, A. P., & Ruzzante, D. E. (2017). Whole-genome sequencing approaches for conservation biology: Advantages, limitations and practical recommendations. *Molecular Ecology*, 26(20), 5369–5406. <https://doi.org/10.1111/mec.14264>
- Fuhrman, J. A., & Noble, R. T. (1995). Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology and Oceanography*, 40(7), 1236–1242. <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.7.1236>
- Gallon, J. R. (2001). N₂ fixation in phototrophs: Adaptation to a specialized way of life. *Plant and Soil*, 230(1), 39–48. <https://doi.org/10.1023/A:1004640219659>
- Gao, C.-H., Yu, G., & Cai, P. (2021). ggVennDiagram: An Intuitive, Easy-to-Use, and Highly Customizable R Package to Generate Venn Diagram. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.706907>
- Gao, L., Rao, M. P. N., Liu, Y.-H., Wang, P.-D., Lian, Z.-H., Abdugheni, R., Jiang, H.-C., Jiao, J.-Y., Shurigin, V., Fang, B.-Z., & Li, W.-J. (2024). SALINITY-Induced Changes in Diversity, Stability, and Functional Profiles of Microbial Communities in Different Saline Lakes in Arid Areas. *Microbial Ecology*, 87(1), 135. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02442-8>
- Gupta, R. S. (2013). Chapter Two—Molecular Markers for Photosynthetic Bacteria and Insights into the Origin and Spread of Photosynthesis. In J. T. Beatty (Ed.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 66, pp. 37–66). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397923-0.00002-3>

- Harrison, J. B., Sunday, J. M., & Rogers, S. M. (2019). Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1915), 20191409.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1409>
- Herlemann Daniel P. R., Lundin Daniel, Labrenz Matthias, Jürgens Klaus, Zheng Zongli, Aspeborg Henrik, & Andersson Anders F. (2013). Metagenomic De Novo Assembly of an Aquatic Representative of the Verrucomicrobial Class Spartobacteria. *MBio*, 4(3), 10.1128/mbio.00569-12.
<https://doi.org/10.1128/mbio.00569-12>
- Huang, W.-C., Liu, Y., Zhang, X., Zhang, C.-J., Zou, D., Zheng, S., Xu, W., Luo, Z., Liu, F., & Li, M. (2021). Comparative genomic analysis reveals metabolic flexibility of Woesearchaeota. *Nature Communications*, 12(1), 5281.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-25565-9>
- Huisman, J., Sharples, J., Stroom, J. M., Visser, P. M., Kardinaal, W. E. A., Verspagen, J. M. H., & Sommeijer, B. (2004). CHANGES IN TURBULENT MIXING SHIFT COMPETITION FOR LIGHT BETWEEN PHYTOPLANKTON SPECIES. *Ecology*, 85(11), 2960–2970. <https://doi.org/10.1890/03-0763>
- Huisman, J., van Oostveen, P., & Weissing, F. J. (1999). Species Dynamics in Phytoplankton Blooms: Incomplete Mixing and Competition for Light. *The American Naturalist*, 154(1), 46–68. <https://doi.org/10.1086/303220>
- Humbert, J.-F., Dorigo, U., Cecchi, P., Le Berre, B., Debroas, D., & Bouvy, M. (2009). Comparison of the structure and composition of bacterial communities from temperate and tropical freshwater ecosystems. *Environmental Microbiology*, 11(9), 2339–2350. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01960.x>

- Inceoğlu, Ö., Dupré, M., Garcia-Armisen, T., Crowe, S., Michiels, C., Darchambeau, F., Descy, J.-P., & Servais, P. (2014). Distribution of Bacteria and Archaea in meromictic tropical Lake Kivu (Africa). *Aquatic Microbial Ecology*, 74. <https://doi.org/10.3354/ame01737>
- Jaeger, K. L., Sando, R., McShane, R. R., Dunham, J. B., Hockman-Wert, D. P., Kaiser, K. E., Hafen, K., Risley, J. C., & Blasch, K. W. (2019). Probability of Streamflow Permanence Model (PROSPER): A spatially continuous model of annual streamflow permanence throughout the Pacific Northwest. *Journal of Hydrology X*, 2, 100005. <https://doi.org/10.1016/j.hydroa.2018.100005>
- Jeffries, T. C., Schmitz Fontes, M. L., Harrison, D. P., Van-Dongen-Vogels, V., Eyre, B. D., Ralph, P. J., & Seymour, J. R. (2016). Bacterioplankton Dynamics within a Large Anthropogenically Impacted Urban Estuary. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.01438>
- Kannan, M., Colinvaux, P. A., & Kannan, R. (1983). Limnological studies in Ecuador: 1. A survey fo chemical and physical properties of Ecuadorian lakes. *Archiv Fur Hydrobiologie, Arch. Hydrobiol./Suppl.* 65.
- Kazuaki Matsui, Mie Honjo, & Zen'ichiro Kawabata. (2001). Estimation of the fate of dissolved DNA in thermally stratified lake water from the stability of exogenous plasmid DNA. *Aquatic Microbial Ecology*, 26(1), 95–102. <https://www.int-res.com/abstracts/ame/v26/n1/p95-102/>
- Kibuye, F. A., Zamyadi, A., & Wert, E. C. (2021). A critical review on operation and performance of source water control strategies for cyanobacterial blooms: Part

- II-mechanical and biological control methods. *Harmful Algae*, 109, 102119. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102119>
- Kim, O., Kagaya, Y., Tran, H., Minei, R., Tran, T., Ha, D., Le, B., Lua, T., Kinoshita, K., Ogura, A., & Yura, K. (2020). A novel circular ssDNA virus of the phylum Cressdnaviricota discovered in metagenomic data from otter clams (Lutraria rhynchaena). *Archives of Virology*, 165. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04819-9>
- Kleemann, J., Koo, H., Hensen, I., Mendieta-Leiva, G., Kahnt, B., Kurze, C., Inclan, D., J., Cuenca, P., Noh, J. K., Hoffmann, M. H., Factos, A., Lehnert, M., Lozano, P., & Fürst, C. (2022). Priorities of action and research for the protection of biodiversity and ecosystem services in continental Ecuador. *Biological Conservation*, 265, 109404. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109404>
- KO (KEGG ORTHOLOGY) Database*. (n.d.). Retrieved April 17, 2025, from <https://www.kegg.jp/kegg/ko.html>
- Kohtz, A., Petrosian, N., Krukenberg, V., Jay, Z., Pilhofer, M., & Hatzenpichler, R. (2024). Cultivation and visualization of a methanogen of the phylum Thermoproteota. *Nature*, 632. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07631-6>
- Kostygov, A. Y., Karnkowska, A., Votýpka, J., Tashyreva, D., Maciszewski, K., Yurchenko, V., & Lukeš, J. (n.d.). Euglenozoa: Taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biology*, 11(3), 200407. <https://doi.org/10.1098/rsob.200407>
- Kurt, H. (2019). Chapter 6—Depth distribution of microbial diversity in lakes. In S. A. Bandh, S. Shafi, & N. Shameem (Eds.), *Freshwater Microbiology* (pp. 225–262). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00006-2>

- Leliaert, F. (2019). Green Algae: Chlorophyta and Streptophyta. In T. M. Schmidt (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)* (pp. 457–468). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20890-X>
- Liu, L., Yang, J., Yu, Z., & Wilkinson, D. M. (2015). The biogeography of abundant and rare bacterioplankton in the lakes and reservoirs of China. *The ISME Journal*, 9(9), 2068–2077. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.29>
- Liu, S., Lu, J., Adriaenssens, E. M., Wang, J., McCarthy, A. J., & Sekar, R. (2024). Industrial and agricultural land uses affected the water quality and shaped the bacterial communities in the inflow rivers of Taihu Lake. *Frontiers in Environmental Science*. ProQuest Central; Publicly Available Content Database. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1340875>
- Liu, X., Wang, Y., & Gu, J.-D. (2021). Ecological distribution and potential roles of Woesearchaeota in anaerobic biogeochemical cycling unveiled by genomic analysis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 794–800. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.013>
- Lockridge, G. (2012). A Limnological Assessment of a Rare Lacustrine Wetland Complex: Laguna De Cube, Ramsar Site 1143, Ecuador. *Electronic Theses and Dissertations*. <https://digitalcommons.coastal.edu/etd/57>
- Luo Chengwei, Rodriguez-R Luis M., Johnston Eric R., Wu Liyou, Cheng Lei, Xue Kai, Tu Qichao, Deng Ye, He Zhili, Shi Jason Zhou, Yuan Mengting Maggie, Sherry Rebecca A., Li Dejun, Luo Yiqi, Schuur Edward A. G., Chain Patrick, Tiedje James M., Zhou Jizhong, & Konstantinidis Konstantinos T. (2014). Soil Microbial Community Responses to a Decade of Warming as Revealed by Comparative Metagenomics. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1777–1786. <https://doi.org/10.1128/AEM.03712-13>

- Ma, Y., Qu, Y., Yao, X., Xia, C., Lv, M., Lin, X., Zhang, L., Zhang, M., & Hu, B. (2024). Unveiling the unique role of iron in the metabolism of methanogens: A review. *Environmental Research*, 250, 118495. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118495>
- Marques, V., Milhau, T., Albouy, C., Dejean, T., Manel, S., Mouillot, D., & Juhel, J.-B. (2021). GAPeDNA: Assessing and mapping global species gaps in genetic databases for eDNA metabarcoding. *Diversity and Distributions*, 27(10), 1880–1892. <https://doi.org/10.1111/ddi.13142>
- McKnight, E. G. W., Shafer, A. B. A., & Frost, P. C. (2024). Quantifying the effect of water quality on eDNA degradation using microcosm and bioassay experiments. *Environmental DNA*, 6(2), e530. <https://doi.org/10.1002/edn3.530>
- 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>
- Merck. (2024). Filtro a presión Millipore® Sterivex™ pore size 0.45 µm, PVDF membrane, capacity 1000 mL | Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/product/mm/svhv010>
- Mittermeier, R. A., Turner, W. R., Larsen, F. W., Brooks, T. M., & Gascon, C. (2011). Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. In F. E. Zachos & J. C. Habel (Eds.), *Biodiversity Hotspots: Distribution and Protection of Conservation Priority Areas* (pp. 3–22). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5_1
- Mohiuddin, M. M., & Schellhorn, H. E. (2020). Chapter 13—Epidemiology and Ecology of Emerging Viruses in Two Freshwater Lakes of the Northern Hemisphere. In M. M. Ennaji (Ed.), *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*

- (pp. 243–257). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814966-9.00013-5>
- Montero, E., Caballero, M., Vázquez, G., Favila, M. E., Montero, E., Caballero, M., Vázquez, G., & Favila, M. E. (2023). Diatom diversity and species composition in phytoplankton, sediment traps, and surface sediments from a warm monomictic tropical lake. *Hidrobiológica*, 33(3), 305–316.
<https://doi.org/10.24275/ioqq5892>
- Nayfach, S., Roux, S., Seshadri, R., Udwary, D., Varghese, N., Schulz, F., Wu, D., Paez-Espino, D., Chen, I.-M., Huntemann, M., Palaniappan, K., Ladau, J., Mukherjee, S., Reddy, T. B. K., Nielsen, T., Kirton, E., Faria, J. P., Edirisinghe, J. N., Henry, C. S., ... IMG/M Data Consortium. (2021). A genomic catalog of Earth's microbiomes. *Nature Biotechnology*, 39(4), 499–509.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0718-6>
- Nevado, B., Ramos-Onsins, S. E., & Perez-Enciso, M. (2014). Resequencing studies of nonmodel organisms using closely related reference genomes: Optimal experimental designs and bioinformatics approaches for population genomics. *Molecular Ecology*, 23(7), 1764–1779. <https://doi.org/10.1111/mec.12693>
- Nousias, O., Duffy, F. G., Duffy, I. J., Whilde, J., & Duffy, D. J. (2024). Long-read nanopore shotgun eDNA sequencing for river biodiversity, pollution and environmental health monitoring. *BioRxiv*, 2024.11.01.621618.
<https://doi.org/10.1101/2024.11.01.621618>
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Caceres, M. D., Durand, S., ... Stier, A. (n.d.). *vegan: Community Ecology Package*.

- Oliver, T., Varghese, N., Roux, S., Schulz, F., Huntemann, M., Clum, A., Foster, B., Foster, B., Riley, R., LaButti, K., Egan, R., Hajek, P., Mukherjee, S., Ovchinnikova, G., Reddy, T. B. K., Calhoun, S., Hayes, R. D., Rohwer, R. R., Zhou, Z., ... Eloé-Fadrosch, E. A. (2024). Coassembly and binning of a twenty-year metagenomic time-series from Lake Mendota. *Scientific Data*, 11(1), 966. <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03826-8>
- ONT. (2022). Oxford Nanopore Technologies. <https://nanoporetech.com/es/document/ligation-sequencing-amplicons-native-barcoding-v14-sqk-nbd114-24>
- Overmann, J. (2006). The Family Chlorobiaceae. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass* (pp. 359–378). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_13
- Palermo, C. N., Fulthorpe, R. R., Saati, R., & Short, S. M. (2019). Metagenomic analysis of virus diversity and relative abundance in a eutrophic freshwater harbour. *BioRxiv*, 690891. <https://doi.org/10.1101/690891>
- Pauleto, G. M., Oliveira, F. R. de, Segovia, B. T., Meira, B. R., Lansac-Tôha, F., Buosi, P. R. B., & Velho, L. F. M. (2017). Intra-annual variation in planktonic ciliate species composition (Protista: Ciliophora) in different strata in a shallow floodplain lake. *Acta Limnologica Brasiliensis*, 29, e107. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X5817>
- Pedrós-Alio, C. (2012). The Rare Bacterial Biosphere. In *Annual Review of Marine Science* (Vol. 4, Issue Volume 4, 2012, pp. 449–466). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100948>

- Phan, N.-T., Duong, Q. H., Tran-Nguyen, Q. A., & Trinh-Dang, M. (2021). The Species Diversity of Tropical Freshwater Rotifers (Rotifera: Monogononta) in Relation to Environmental Factors. *Water*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/w13091156>
- Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13, 131–144.
[https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90013-0)
- Pierson, H. E., Uhlemann, E.-M. E., & Dmitriev, O. Y. (2011). Interaction with Monomeric Subunit c Drives Insertion of ATP Synthase Subunit a into the Membrane and Primes a-c Complex Formation *. *Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38583–38591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.294868>
- Power, H., Takahashi, M., Jarman, S., & Berry, O. (2023). What is environmental DNA? *Environmental DNA*, 5(6), 1743–1758. <https://doi.org/10.1002/edn3.497>
- Puente-Sánchez, F., García-García, N., & Tamames, J. (2020). SQMtools: Automated processing and visual analysis of 'omics data with R and anvi'o. *BMC Bioinformatics*, 21(1), 358. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03703-2>
- Purushothaman, S., Meola, M., Roloff, T., Rooney, A. M., & Egli, A. (2024). Evaluation of DNA extraction kits for long-read shotgun metagenomics using Oxford Nanopore sequencing for rapid taxonomic and antimicrobial resistance detection. *Scientific Reports*, 14(1), 29531. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-80660-3>
- Raes, J., Letunic, I., Yamada, T., Jensen, L. J., & Bork, P. (2011). Toward molecular trait-based ecology through integration of biogeochemical, geographical and metagenomic data. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 473.
<https://doi.org/10.1038/msb.2011.6>

- RAMSAR. (n.d.). *Laguna de Cube | Ramsar Sites Information Service*. Retrieved February 10, 2025, from <https://rsis.ramsar.org/ris/1143>
- Ravnikar, P. D., Sevnnck, R. D., J., Saetaert, P., & McIntosh, L. (1989). Nucleotide sequence of a second psbA gene from the unicellular cyanobacterium Synechocystis 6803. *Nucleic Acids Research*, 17(10), 3991–3991. <https://doi.org/10.1093/nar/17.10.3991>
- Ren, M., & Wang, J. (2022). Phylogenetic divergence and adaptation of Nitrososphaeria across lake depths and freshwater ecosystems. *The ISME Journal*, 16(6), 1491–1501. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01199-7>
- Rodrigues, T., Catão, E., Bustamante, M. M. C., Quirino, B. F., Kruger, R. H., & Kyaw, C. M. (2014). Seasonal Effects in a Lake Sediment Archaeal Community of the Brazilian Savanna. *Archaea*, 2014(1), 957145. <https://doi.org/10.1155/2014/957145>
- Rodríguez-Castillo, T., Estévez, E., González-Ferreras, A. M., & Barquín, J. (2019). Estimating Ecosystem Metabolism to Entire River Networks. *Ecosystems*, 22(4), 892–911. <https://doi.org/10.1007/s10021-018-0311-8>
- Rondón, J. C. D. (2024). CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF DESMIDS (ZYGONEMATOPHYCEAE, STREPTOPHYTA) IN A TROPICAL LAKE (COLOMBIA). *Acta Biológica Colombiana*, 29(3), 3. <https://doi.org/10.15446/abc.v29n3.113925>
- Roussel, J.-M., Paillisson, J.-M., Tréguier, A., & Petit, E. (2015). The downside of eDNA as a survey tool in water bodies. *Journal of Applied Ecology*, 52(4), 823–826. <http://www.jstor.org/stable/43869253>
- Santos, A. B., Reis, M. P., Costa, P. S., Ávila, M. P., Lima-Bittencourt, C. I., Barbosa, F. A. R., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. A. (2015). Environmental

- diversity of bacteria in a warm monomictic tropical freshwater lake. *Annals of Microbiology*, 65(4), 2099–2108. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1048-7>
- Schloss, P. D. (2024). Rarefaction is currently the best approach to control for uneven sequencing effort in amplicon sequence analyses. *MSphere*, 9(2), e00354-23. <https://doi.org/10.1128/msphere.00354-23>
- Serôdio, J., & Lavaud, J. (2020). Diatoms and Their Ecological Importance. In *Life Below Water, Encyclopedia of the UN Sustainable Development Goals* (pp. 1–9). https://doi.org/10.1007/978-3-319-71064-8_12-1
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27(3), 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Sheng, Y., Wu, Z., Xu, S., & Wang, Y. (2022). Isolation and Identification of a Large Green Alga Virus (*Chlorella* Virus XW01) of *Mimiviridae* and Its Virophage (*Chlorella* Virus Virophage SW01) by Using Unicellular Green Algal Cultures. *J Virol*, 96(7), e0211421. PubMed. <https://doi.org/10.1128/jvi.02114-21>
- Shengzhong, X., Zhou, L., Liang, X., Zhou, Y., Chen, H., Yan, S., & Wang, Y. (2020). Novel Cell-Virus-virophage (CVv) tripartite infection systems are discovered in a freshwater lake, Dishui Lake, in Shanghai, China. *Journal of Virology*, 94. <https://doi.org/10.1128/JVI.00149-20>
- Silveira, C. B., Cardoso, A. M., Coutinho, F. H., Lima, J. L., Pinto, L. H., Albano, R. M., Clementino, M. M., Martins, O. B., & Vieira, R. P. (2013). Tropical Aquatic Archaea Show Environment-Specific Community Composition. *PLOS ONE*, 8(9), e76321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076321>
- SIMPSON, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163(4148), 688–688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>

- Siregar, I. Z., Dwiyanti, F. G., Pratama, R., Matra, D. D., & Majiidu, M. (2021). Generating long-read sequences using Oxford Nanopore Technology from *Diospyros celebica* genomic DNA. *BMC Research Notes*, 14, 75. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05484-0>
- Smart, L. B., & McIntosh, L. (1991). Expression of photosynthesis genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803:psaA-psaB and psbA transcripts accumulate in dark-grown cells. *Plant Molecular Biology*, 17(5), 959–971. <https://doi.org/10.1007/BF00037136>
- Spang, A., Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, P., Spieck, E., Streit, W., Stahl, D. A., Wagner, M., & Schleper, C. (2010). Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends in Microbiology*, 18(8), 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.06.003>
- Stieglmeier, M., Alves, R. J. E., & Schleper, C. (2014). The Phylum Thaumarchaeota. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea* (pp. 347–362). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_338
- Stolz, J. F. (2017). Gaia and her microbiome. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(2), fiw247. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw247>
- Sweeney, K., Rollwagen-Bollens, G., & Hampton, S. E. (2022). Grazing impacts of rotifer zooplankton on a cyanobacteria bloom in a shallow temperate lake (Vancouver Lake, WA, USA). *Hydrobiologia*, 849(12), 2683–2703. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04885-x>

- Tadonléké, R. D. (2007). Strong coupling between natural Planctomycetes and changes in the quality of dissolved organic matter in freshwater samples. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(3), 543–555. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00222.x>
- Tamames, J., & Puente-Sánchez, F. (2019). SqueezeMeta, A Highly Portable, Fully Automatic Metagenomic Analysis Pipeline. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03349>
- Targueta, C., Antunes, A., Machado, K., FERNANDES, J., Telles, M., Vieira, L., Logares, R., Nabout, J., & Soares, T. (2023). Diversity of eukaryotic and prokaryotic microbiota revealed by metabarcoding in Neotropical floodplain lakes. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 95. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202320201578>
- Thomson-Laing, G., Howarth, J. D., Vandergoes, M. J., & Wood, S. A. (2022). Optimised protocol for the extraction of fish DNA from freshwater sediments. *Freshwater Biology*, 67(9), 1584–1603. <https://doi.org/10.1111/fwb.13962>
- Tito, M (2018). *Estudio morfométrico de la laguna Cube*. https://www.academia.edu/76527726/Estudio_morfom%C3%A9trico_de_la_laguna_Cube
- Tooth, S. (2000). Process, form and change in dryland rivers: A review of recent research. *Earth-Science Reviews*, 51(1), 67–107. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(00\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(00)00014-3)
- Tosso, E. (2009). A Comparison of Herpetofauna Assemblages Among Tropical Forest Fragments and Subsistence Plantations Adjacent to an Ecuadorian Ramsar Wetland. *Electronic Theses and Dissertations*. <https://digitalcommons.coastal.edu/etd/84>

- Tran, P., Bachand, S., McIntyre, P., Kraemer, B., Vadeboncoeur, Y., Kimirei, I., Tamatamah, R., Mcmahon, K., & Anantharaman, K. (2021). Depth-discrete metagenomics reveals the roles of microbes in biogeochemical cycling in the tropical freshwater Lake Tanganyika. *The ISME Journal*, 15.
- <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00898-x>
- Tringe, S. G., & Rubin, E. M. (2005). Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 805–814.
- <https://doi.org/10.1038/nrg1709>
- Van der Plas, M., Trimbos, K. B., Bosker, T., & Vijver, M. G. (2025). eDNA-based approaches advance ecotoxicology: Insights and best practices from eDNA metabarcoding studies in evaluating stress-induced aquatic (macro-) invertebrate community composition. *Ecological Indicators*, 172, 113269.
- <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2025.113269>
- Wang, Y., Guo, M., Li, X., Liu, G., Hua, Y., Zhao, J., Huguet, A., & Li, S. (2022). Shifts in microbial communities in shallow lakes depending on trophic states: Feasibility as an evaluation index for eutrophication. *Ecological Indicators*, 136, 108691. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108691>
- Weisse, T., & Montagnes, D. J. S. (2022). Ecology of planktonic ciliates in a changing world: Concepts, methods, and challenges. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 69(5), e12879. <https://doi.org/10.1111/jeu.12879>
- Werner, S., Schumann, J., & Strotmann, H. (1990). The primary structure of the γ -subunit of the ATPase from Synechocystis 6803. *FEBS Letters*, 261(1), 204–208. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80671-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80671-5)

- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microbial Genomics*, 3(10), e000132. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000132>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., Vaughan, D., Software, P., & PBC. (2023). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation* (Version 1.1.4). <https://cran.r-project.org/web/packages/dplyr/index.html>
- Winter Christian, Bouvier Thierry, Weinbauer Markus G., & Thingstad T. Frede. (2010). Trade-Offs between Competition and Defense Specialists among Unicellular Planktonic Organisms: The “Killing the Winner” Hypothesis Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 42–57. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00034-09>
- Wommack, K. E., Bhavsar, J., & Ravel, J. (2008). Metagenomics: Read Length Matters. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1453–1463. <https://doi.org/10.1128/AEM.02181-07>
- Xiao, Z., Li, R., Ding, M., Cai, P., Guo, J., Fu, H., Zhang, X., & Song, X. (2024). Unveiling the hidden dynamics of intermittent surface water: A remote sensing framework. *Remote Sensing of Environment*, 311, 114285. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2024.114285>
- Yadav, P., Das, J., Sundharam, S. S., & Krishnamurthi, S. (2024). Analysis of Culturable Bacterial Diversity of Pangong Tso Lake via a 16S rRNA Tag Sequencing Approach. *Microorganisms*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020397>
- Yang, Q., Aghdam, R., Tran, P. Q., Anantharaman, K., & Solís-Lemus, C. (2024). Unraveling Keystone Taxa: Interactions Within Microbial Networks and

- Environmental Dynamics in Lake Mendota. *BioRxiv*, 2024.11.11.623027.
<https://doi.org/10.1101/2024.11.11.623027>
- Yannarell, A. C., & Kent, A. D. (2009). Bacteria, Distribution and Community Structure. In G. E. Likens (Ed.), *Encyclopedia of Inland Waters* (pp. 201–210). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00123-X>
- Zhang, M., Francis, R. A., & Chadwick, M. A. (2023). A synthesis of ecosystem metabolism of China's major rivers and coastal zones (2000–2020). *WIREs Water*, 10(2), e1628. <https://doi.org/10.1002/wat2.1628>
- Zhou, Z., Pan, J., Wang, F., Gu, J.-D., & Li, M. (2018). Bathyarchaeota: Globally distributed metabolic generalists in anoxic environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(5), 639–655. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy023>
- Zimmer, M. A., Kaiser, K. E., Blaszcak, J. R., Zipper, S. C., Hammond, J. C., Fritz, K. M., Costigan, K. H., Hosen, J., Godsey, S. E., Allen, G. H., Kampf, S., Burrows, R. M., Krabbenhoft, C. A., Dodds, W., Hale, R., Olden, J. D., Shanafied, M., DelVecchia, A. G., Ward, A. S., ... Allen, D. C. (2020). Zero or not? Causes and consequences of zero-flow stream gage readings. *WIREs Water*, 7(3), e1436.
<https://doi.org/10.1002/wat2.1436>
- Zonta, E., Nizard, P., & Taly, V. (2015). Chapter Five—Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research. In G. S. Makowski (Ed.), *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 70, pp. 197–246). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.03.002>

Material suplementario

1. Temperatura En la columna de agua en la Laguna Cube y medición de oxígeno Disuelto

Fuente: Lockridge. 2012

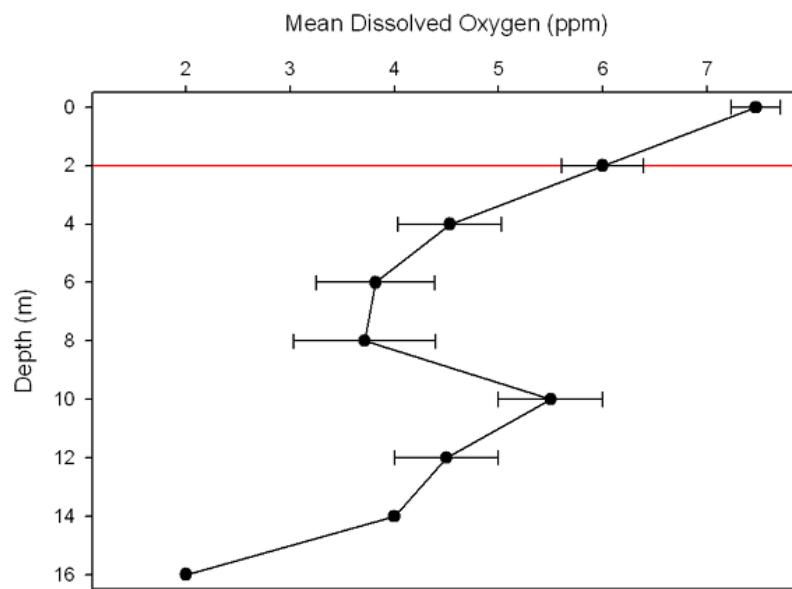


Figure 12: Vertical dissolved oxygen profile showing mean and standard errors from Laguna de Cube, Ecuador. Samples taken from all abiotic transect intersections at 2 meter depth intervals. Red line represents stratification depth.

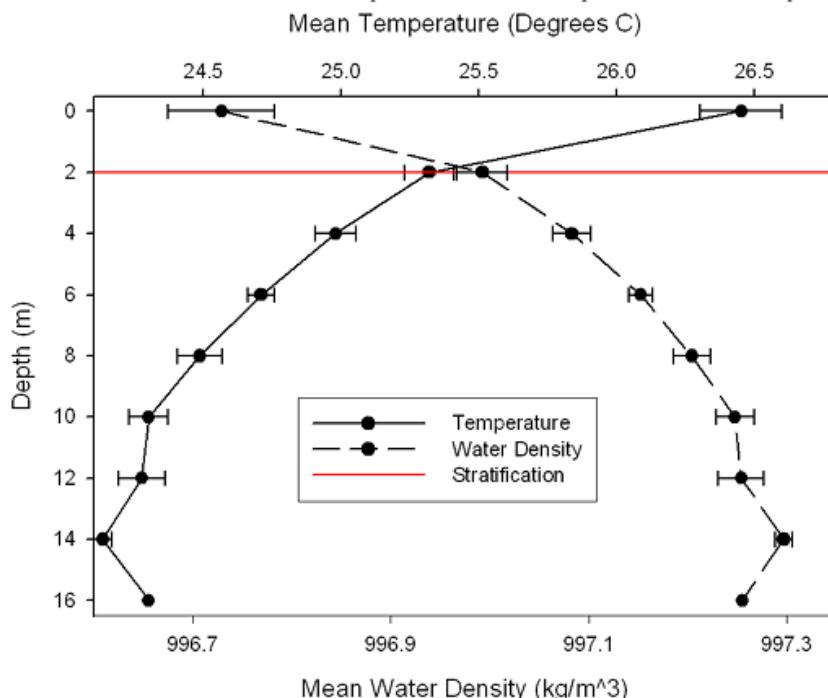


Figure 9: Vertical temperature and water density profile showing mean and standard errors from Laguna de Cube, Ecuador. Samples taken from all abiotic transect intersections at 2 meter depth intervals. Red line represents stratification depth.

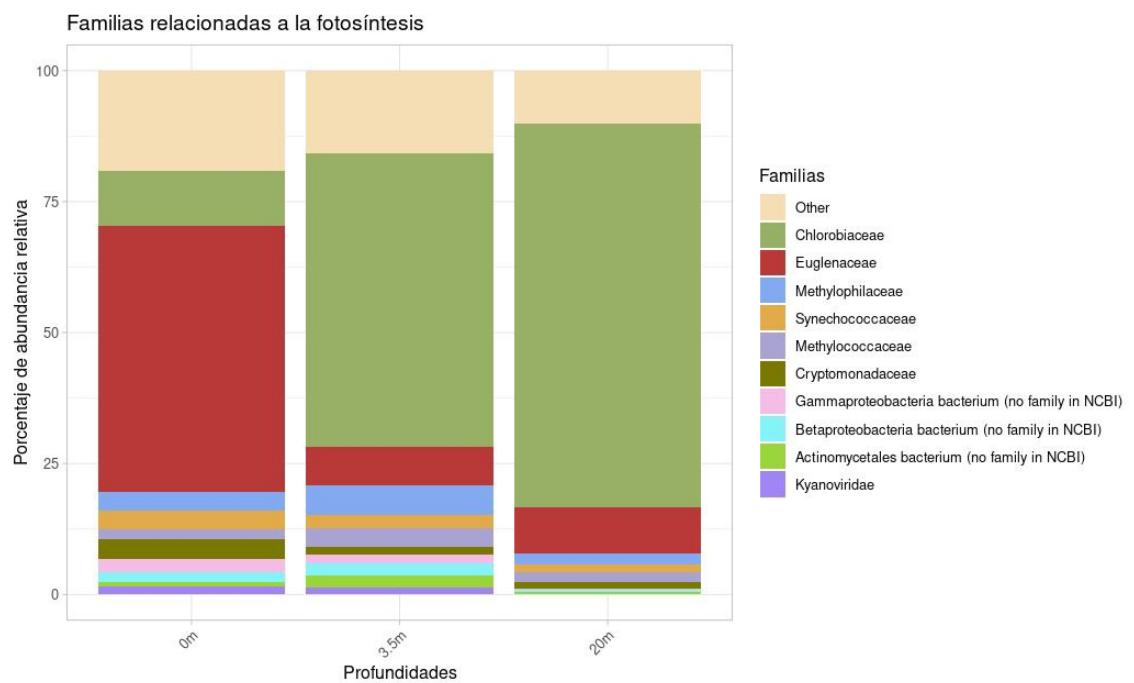


Ilustración 1. Porcentaje de abundancia relativa de las familias de microorganismos presentes en las muestras de *eDNA* tomadas en profundidades específicas (0m, 3.5m y 20m), más relacionadas con los genes ortólogos fotosintéticos