

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

**Investigación de patógenos humanos y zoonóticos en
potenciales fuentes de agua para Quito**

Melina de Lourdes Rodríguez Badillo

Gabriel Trueba, Ph.D.

Director de Trabajo de Titulación

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito para la obtención del
título de Magister en Microbiología

Quito, 21 de mayo del 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Investigación de Patógenos humanos y Zoonóticos en potenciales fuentes
de agua para Quito**

Melina de Lourdes Rodríguez Badillo

Firmas

Gabriel Trueba, Ph.D.

Director de la Maestría en Microbiología

Director del Trabajo de Titulación

Andrea Encalada, Ph.D.

Co-Director del Trabajo de Titulación

Sonia Zapata, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Hugo Burgos, Ph.D.

Decano del Colegio de Posgrados

Quito, 21 de mayo del 2018

© 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 el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombre: Melina Rodríguez Badillo

Código de estudiante: 00121611

C. I.: 1716301229

Lugar, Fecha Quito, 21 de mayo del 2018

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Fondo de Agua para Quito (FONAG). Los autores desean agradecer al personal del FONAG y EPMAPS por el acceso y facilidades en los predios donde se realizó el estudio. También damos las gracias al apoyo del Instituto de Microbiología y del Laboratorio de Ecología Acuática de la Universidad San Francisco de Quito USFQ (Ecuador), en especial a José Schrekinger, Romel Arboleda y María Elisa Sánchez por su ayuda en el campo.

RESUMEN

Los páramos son fuentes de agua potable para varias comunidades y ciudades de la región Andina. Este estudio investigó la presencia de patógenos transmitidos por el agua en ríos y arroyos de los páramos: Antisana, Mudadero y Cerro Puntas, ubicados entre los 3.700 a 4.200 de altitud, que abastecen de agua potable al Distrito Metropolitano de Quito (DMQ). Estos arroyos y ríos están siendo monitoreados y algunos de ellos son actualmente parte del sistema de manejo del Fondo para la Protección del Agua (FONAG). Este sistema contempla varias intervenciones para proteger a los páramos y el agua, entre estos el control de ganado, y por lo tanto se toma como hipótesis que este control reduciría la contaminación fecal que reciben estas aguas. Los objetivos de esta investigación fueron: 1) evaluar la contaminación fecal de los ríos bajo intervención y los ríos sin intervención; 2) correlacionar los recuentos de *Escherichia coli* con los parámetros físicos, químicos y biológicos de estos ríos; 3) detectar por métodos moleculares la presencia de protozoos zoonóticos: *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium spp.* La cuantificación del indicador bacteriano *E. coli* indicó una baja contaminación fecal tanto en las fuentes de agua intervenidas como en las no intervenidas, lo que sugiere una buena calidad del agua en estas fuentes hídricas. El análisis molecular de protozoos indicó la ausencia de *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium spp* en las muestras de fuentes de agua.

Palabras clave: Páramos, fuentes de agua, patógenos zoonóticos transmitidos por el agua, Escherichia coli, Cryptosporidium, Giardia intestinalis manejo de ríos, Distrito Metropolitano de Quito.

ABSTRACT

The highlands are sources of drinking water for several communities and cities in the Andean region. This study investigated the presence of waterborne pathogens in rivers and streams of the highlands: Antisana, Mudadero and Cerro Puntas, located between 3,700 and 4,200 meters of altitude, which supply drinking water to the Metropolitan District of Quito (DMQ). These streams and rivers are being monitored and some of them are currently part of the management system of the Water Protection Fund (FONAG). This system contemplates several interventions to protect the highlands and water, including the control of livestock, and therefore it is hypothesized that this control would reduce the fecal contamination that these waters receive. The objectives of this research were: 1) to evaluate the fecal contamination of the rivers under intervention and the rivers without intervention; 2) correlate the counts of *Escherichia coli* with the physical, chemical and biological parameters of these rivers; 3) detect by molecular methods the presence of zoonotic protozoa: *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium spp.* The quantification of the bacterial indicator *E. coli* indicated a low fecal contamination in both the water sources intervened and those not intervened, which suggests good water quality in these water sources. The molecular analysis of protozoa indicated the absence of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium spp* in the samples of water sources.

Key words: *Highlands, water sources, waterborne pathogens, Escherichia coli, Cryptosporidium, Giardia intestinalis, river management, Metropolitan District of Quito (DMQ).*

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Área de Estudio	17
Diseño de Estudio	19
Recolección y transporte de las muestras.....	21
Detección y cuantificación de <i>Escherichia coli</i>	21
Mediciones ambientales	22
Investigación de Protozoarios patógenos.....	22
Extracción de ADN	22
Obtención de controles positivos	23
PCR Convencional	25
PCR anidada	26
PCR Cuantitativa (qPCR).....	27
Secuenciación Sanger	31
Filo-tipificación por secuenciación masiva	31
Análisis estadístico.....	33
Normalidad de los datos y Análisis de varianza (ANOVA)	33
Correlación entre <i>E. coli</i> y parámetros ambientales	34
RESULTADOS.....	34
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Puntos geográficos de toma de muestras de las fuentes de agua de los predios Antisana, Mudadero y Cerro Puntas, localizadas en las cuencas Guayllabamba y Napo, en Ecuador.	64
Tabla 2. Cebadores y sondas empleadas para la investigación de <i>Giardia intestinalis</i> y <i>Cryptosporidium</i> spp por los métodos moleculares qPCR y PCR anidada.	65
Tabla 5. Cuantificación de <i>E. coli</i> (UFC/50 ml) en las fuentes de agua de los predios: Antisana, Mudadero y Cerro Puntas, de las cuencas: Guayllabamba y Napo, en Ecuador.	68
Tabla 6. Concentración de <i>E. coli</i> (UFC/ 50 ml) y su correlación con parámetros ambientales de los ríos evaluados en los predios: Antisana, Mudadero y Cerro Puntas...	69
Tabla 7. Temperaturas de fusión del ADN en un sistema qPCR con cebadores específicos para la detección de <i>Giardia intestinalis</i> en fuentes de agua de predios: Antisana, Mudadero y Cerro Puntas.	70
Tabla 8. Detección y cuantificación por qPCR (TaqMan) del número de copias del gen β -Giardin y el número de quistes de <i>Giardia intestinalis</i> en los controles positivos.....	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa general de todas las zonas de interés del FONAG/EPMAPS	72
Figura 2. Mapas de las zonas de estudio: Zona de investigación Cerro Puntas; zona de investigación Mudadero; Zona de investigación Antisana y Zona de Investigación Jatunhuaico.....	73
Figura 3. Cuantificación de <i>E. coli</i> con la técnica de filtración en membrana a partir de muestras de agua de riachuelos.....	74
Figura 4. Concentración del indicador fecal (<i>E. coli</i>) y su variación por predio: Antisana, Cerro Puntas y Mudadero; y por tipo de río: Control y Manejo.....	75
Figura 5. Concentración del Indicador fecal (<i>E. coli</i>) y su variación por tipo de ríos: Control y Manejo, dentro de los tres predios: Antisana, Mudadero y Cerro Puntas.....	76
Figura 6. Concentración del indicador fecal (<i>E. coli</i>) en la sub-cuenca del río Jatunhuaico y su variación de acuerdo al gradiente de altitud: Mayor altitud, altitud media, Menor altitud; y por fecha de muestreo: agosto de 2015 y mayo de 2014.....	77
Figura 7. Correlaciones significativas entre la concentración de <i>E. coli</i> (UFC/ 50 ml) y parámetros ambientales de los ríos en las localidades de Antisana, Mudadero y Cerro Puntas.	79
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de la amplificación de un segmento del gen β Giardin (74 pb) de <i>Giardia intestinalis</i> por PCR punto final en controles positivos y ADN del río Jatunhuaico.	80
Figura 9. Cromatograma de la reacción de secuenciación con los cebadores de PCR: β -Giardin P241F y β -Giardin P241R, para la detección de <i>Giardia intestinalis</i> en el Río San Pedro.....	81
Figura 10. Curva estándar de los controles y muestras de ADN de fuentes de agua para la detección de <i>Giardia intestinalis</i> por qPCR.	82
Figura 11. Curva de temperaturas de fusión (T_m) de controles y ADN de fuentes de agua, para la detección de <i>Giardia intestinalis</i> por qPCR.....	83
Figura 12. Curva de amplificación en escala lineal de controles y ADN de fuentes de agua, para la detección de <i>Giardia intestinalis</i> por qPCR con sonda TaqMan.	84
Figura 13. Cuantificación del número de quistes de <i>Giardia intestinalis</i> en los estándares del control positivo amplificados por qPCR con sonda TaqMan.	85
Figura 14. Árbol filogenético (Neighbor Joining, Mega 7) de las secuencias de ADN amplificadas por PCR de las fuentes de agua: Quebrada Alambrado, río Jatunhuaico y río Patugllana; y secuencias obtenidas del GenBank.....	86
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los ensayos de pre-anidación (550 pb) y anidación (311 pb), para la amplificación de un segmento del gen COWP de	

Cryptosporidium spp, por PCR anidada en muestras de agua de los ríos Jatunhuaico y San Pedro..... ¡Error! Marcador no definido.

Figura 16. Diversidad y frecuencia de OTU de los ríos Jatunhuaico y San Pedro agrupados por taxón Género..... ¡Error! Marcador no definido.

Figura 17. Diversidad y frecuencia de OTU de los ríos Jatunhuaico y San Pedro agrupados por taxón Especies de OTUs d 87

Figura 18. Árbol filogenético (Neighbor Joining, Mega 7) de las secuencias de ADN de las fuentes de agua: río Jatunhuaico y río San Pedro obtenidas por secuenciación masiva del gen 18S rRNA en la plataforma de secuenciación MiSeq (ILLUMINA), y secuencias de *Cryptosporidium* spp obtenidas del GenBanken el porcentaje de identidad (97%)..... 88

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso vital que se encuentra cada vez más amenazado por el consumo masivo y contaminación humana [1]. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) más de cinco millones de personas al año mueren debido a enfermedades asociadas al agua, principalmente enfermedades diarreicas agudas, en niños menores de cinco años, ancianos y personas inmunodeprimidas [2].

En países en vías de desarrollo, estas enfermedades suelen ser comunes debido a la falta de acceso a agua segura, falta de saneamiento y a pobres condiciones higiénicas [3]. Los patógenos que se transmiten por agua son bacterias, virus, protozoarios y helmintos [2]; estos son algunos patógenos transmitidos por agua: *Campylobacter jejuni*, *E. coli* patógenas, *Salmonella enterica*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterovirus*, *Norovirus*, Virus de la hepatitis A, *Rotavirus*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma spp.* [2].

Giardia intestinalis y *Cryptosporidium spp.*, son protozoarios parásitos, reconocidos como importantes agentes de gastroenteritis transmitida por el agua en todo el mundo [3,4]. *Giardia intestinalis* (también conocida como *Giardia lamblia* o *Giardia intestinalis*), presenta siete genotipos; los genotipos A y B, infectan con

mayor frecuencia a humanos, mientras que los genotipos C a G generalmente infectan a distintos mamíferos domésticos y silvestres [5-9]. *Cryptosporidium* contiene siete especies (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* y *C. muris*) capaces de causar enfermedad en humanos; *C. hominis*, infecta únicamente a humanos [7-10].

La transmisión de estos parásitos se produce en estados quísticos por vía fecal-oral; de forma directa (persona a persona, animal a persona) o indirecta (transmisión por agua o alimentos contaminados).

Los quistes de *Giardia intestinalis* y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. poseen una gruesa pared que los hace resistentes a la cloración del agua, tienen una viabilidad prolongada de hasta varios meses en el ambiente y bajas dosis infectivas [11-14].

Luego de la ingestión, los quistes de *Giardia intestinalis* llegan al medio ácido del estómago donde ocurre la exquistación, se forman los trofozoitos que pasan al duodeno y yeyuno donde se multiplican y se adhieren a los enterocitos mediante una ventosa en forma de disco; aquí el parásito produce aplanamiento de las vellosidades e inflamación de la mucosa. En el intestino grueso sufren un proceso de enquistamiento y se excretan como quistes y trofozoitos [11, 12].

Los ooquistes de *Cryptosporidium* al ser ingeridos liberan esporozoitos que se unen a la superficie de las células epiteliales del intestino delgado, se

multiplican mediante esquizogonia y gametogonia, finalmente pasan por una esporogonia que conduce a la formación de nuevos ooquistes infecciosos eliminados por las heces [11, 12]. En el ambiente tanto los quistes como los ooquistes permanecen latentes hasta completar sus respectivos ciclos con una nueva infección [12].

Varios factores contribuyen a la dispersión de quistes y ooquistes en el ambiente: los estados infectantes presentan alta resistencia a procesos de cloración del agua y alta persistencia en condiciones ambientales desfavorables [15,16, 17], en aguas superficiales de ríos permanecen infectantes hasta por seis meses a una temperatura de 20°C [18]. Otro factor que agrava la contaminación del suelo y del agua es la cantidad de ooquistes y quistes eliminados en las heces; por ejemplo, un solo bovino puede eliminar 1.000 millones de ooquistes durante 1 semana [19].

La infectividad es alta; la ingestión de pocos quistes de *Giardia* (10-25) o de ooquistes de *Cryptosporidium* (30-132) puede causar infección en personas sanas [21, 22], aunque otros estudios señalan dosis infectivas de *Cryptosporidium* aún más bajas (1-10 ooquistes) [23, 24]. El tamaño reducido de los quistes (8 a 15 micrómetros) y los ooquistes (3 a 5 micrómetros), les permite escapar al proceso de filtración, pasar al agua tratada y, por esta vía, ser propagados a los consumidores [20].

La Organización Mundial de la Salud recomienda monitorear la calidad del agua de consumo humano [2] y las normativas nacionales e internacionales indican que el agua de consumo no debe tener ningún quiste de parásito [25, 26].

Los estudios de calidad del agua normalmente hacen una evaluación microbiológica del agua empleando indicadores bacterianos de contaminación fecal. Los indicadores más utilizados son los coliformes totales y termo tolerantes, *Escherichia coli* y enterococos; sin embargo, debido a las limitaciones asociadas con la aplicación de estas bacterias como indicadores, como es su escasa supervivencia en cuerpos de agua, su habilidad para multiplicarse después de su liberación en una fuente de agua y su debilidad frente a los procesos de desinfección, se han utilizado como indicadores alternativos las bacterias anaerobias fecales: *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, virus (colifagos) y componentes orgánicos fecales (coprostanol) [1, 27-28].

Entre el grupo de microorganismos indicadores se utiliza generalmente a *Escherichia coli*, porque su presencia indica contaminación de origen fecal y la posibilidad de la presencia de otros patógenos intestinales [2]. Sin embargo, debido a que el tiempo de sobrevivencia de *E. coli* en el ambiente es menor que el tiempo de sobrevivencia de los quistes de protozoarios, la ausencia de *E. coli* no necesariamente significa la ausencia de protozoos patógenos [2, 29].

En el Ecuador muchas ciudades y centros poblados son beneficiados con agua que viene directamente de las zonas altas, donde predominan los ecosistemas de bosque andino y páramo [34]. Cerca del 80% del agua que abastece a Quito, viene de áreas protegidas como son: El Parque Nacional Cayambe Coca (PNCC), la Reserva Ecológica Antisana (REA) y el Parque Nacional Cotopaxi (PNC). A pesar de su importancia estratégica, estas reservas están rodeadas por zonas de ganadería y agricultura intensivas [35].

En el año 2012, la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento (EPMAPS) adquirió tres haciendas: Mudadero, Antisana y Contadero, que en total suman 14 mil hectáreas de zonas de amortiguamiento de las reservas, con la idea de recuperar, restaurar y conservar el páramo andino, gestión que se lleva a cabo a través del Fondo para la Protección del Agua (FONAG) que tiene como finalidad garantizar la calidad y cantidad del agua a más de 2,5 millones de habitantes en el Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) [36]. Una de las principales acciones emprendidas por el FONAG consiste en mantener los ríos y páramos libres de ganado vacuno (y otros animales domésticos) para evitar la contaminación del agua.

Este estudio tuvo como objetivo principal la investigación de microorganismos patógenos en varias fuentes de agua superficial ubicadas en las cuencas altas de los ríos Guayllabamba (Mudadero y Cerro Puntas) y Napo

(Antisana) y en la sub-cuenca del río Jatunhuaico (Cuenca del Antisana). Los objetivos específicos del estudio son: 1) Evaluar la contaminación fecal de los ríos bajo intervención (ríos manejados por el FONAG) y de los ríos sin intervención (ríos de control, fuera de los predios EPMAPS). 2) Correlacionar los recuentos de *E. coli* con los parámetros físicos, químicos y biológicos de estos ríos. 3) Investigar la presencia de protozoos patógenos (*Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium spp*) mediante PCR cuantitativo (qPCR), y PCR Anidado.

La ausencia de información disponible sobre la ocurrencia de patógenos que se transmiten por el agua en ríos de potencial aprovechamiento para la captación de agua hace necesario un estudio sobre la calidad microbiológica de estos ríos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

El área de estudio comprende los predios Antisana, Mudadero y Cerro Puntas, ubicados en las provincias de Pichincha y Napo, en el Centro Norte del Ecuador (Fig. 1), entre los 3.700 y 4.200 metros de altitud, con coordenadas geográficas que se detallan en la Tabla 1. Las tres zonas presentan ecosistemas de páramos formados por pajonales, turberas, zonas arbustivas y pequeños remanentes de bosque alto-andino con diferentes grados de alteración antropogénica.

El predio Antisana está ubicado en el flanco occidental del volcán Antisana (Tabla 1, Fig. 1), tiene un área total de 7.549 ha y un gradiente altitudinal de 3.800 a 4.200 m. Este predio formaba parte de las haciendas ganaderas Antisana y Contadero, hasta que fueron adquiridas por la EPMAPS en el año 2012. La zona presenta extensas áreas con sobre-pastoreo y escasa cobertura vegetal. En la actualidad, la mayor parte del ganado ovino y bovino ha sido removido del predio, como estrategia de manejo de páramos por parte del FONAG; sin embargo, aún subsiste el ingreso de ganado bovino y equino desde las haciendas que colindan con el predio. Las fuentes hídricas que protege esta zona son las sub-cuencas de los ríos Micahuaico y Antisana, que alimentan directamente al sistema de agua potable de la Mica; y la sub-cuenca del río Jatunhuaico [37].

El predio de Mudadero se ubica en el valle que se forma entre el flanco sur-oriental del volcán Sincholagua, y el flanco nor-oriental del Cotopaxi (Tabla 1, Fig. 1); tiene un área total de 7.389 ha y altitudes entre 3.800 y 4.100 m. Al igual que el Antisana, el predio de Mudadero fue una hacienda privada dedicada a la ganadería, adquirida por EPMAPS en el año 2012. Esta zona también presenta efectos del sobre-pastoreo, especialmente en las zonas bajas del predio. Actualmente el ganado ha sido removido, sin embargo, aún se presentan incursiones de bovinos y equinos salvajes proveniente de las haciendas aledañas. La principal fuente hídrica que protege este predio es la cuenca del río Pita que alimenta al sistema de agua potable del mismo nombre [37].

El predio Cerro Puntas, ubicado en la vertiente occidental del Cerro Puntas (Tabla 1, Fig. 1), tiene un área total de 5.291 ha, con altitudes entre 3.700 y 4.200 m. Este predio se encuentra dentro de la zona alta del Parque Nacional Cayambe-Coca (PNCC) y colinda con territorios comunitarios y con haciendas dedicadas a la agricultura y ganadería. En el predio Cerro Puntas, al igual que en Antisana y Mudadero, se removió el ganado bovino; aunque todavía se presenta el ingreso ocasional de bovinos desde las haciendas aledañas. Esta zona protege la cuenca alta del río Guayllabamba, sus quebradas alimentan sistemas locales de provisión de agua para riego y consumo doméstico en los sectores de Quinche, Yaruquí, Pifo y Puenbo [37].

Los tres predios considerados en este estudio, no sólo resguardan fuentes hídricas, sino que además son parte de la zona de influencia de áreas protegidas de importancia para la conservación de ecosistemas de páramo andino. Antisana limita con la Reserva Ecológica Antisana (REA); Mudadero colinda con el Parque Nacional Cotopaxi (PNC) y Cerro Puntas está dentro de la parte alta del Parque Nacional Cayambe-Coca (PNCC).

Diseño de Estudio

En este estudio se utilizó un diseño pareado que consiste en establecer ríos de interés (Cuencas representativas que se encuentran dentro de la zona protegida del FONAG) y a cada uno de ellos parearlo con un río “Control” con características ambientales similares, y fuera del área de influencia del FONAG (Tabla 1, Fig. 2). Este diseño fue utilizado anteriormente por Encalada *et al.* (2014) para evaluar comparativamente el estado de las fuentes hídricas y a la vez seleccionar variables sensibles que sean utilizadas para mantener un sistema de monitoreo permanente de los recursos hídricos [37].

En los ríos de interés que se encuentran bajo la influencia del FONAG, el ganado ha sido removido y existe la vigilancia de guarda parques que impiden el acceso del ganado salvaje a las fuentes de agua, por esta intervención se los denominó ríos “Manejo”.

En el predio Antisana, se estableció 8 puntos de muestreo: cuatro ríos manejo con sus respectivos pares control (Fig. 2A). En el predio Mudadero, se estableció 8 puntos de muestreo: cuatro ríos manejo con sus respectivos pares control (Fig. 2B). En el predio Cerro Puntas, debido a la falta de sitios representativos, se estableció 4 puntos de muestreo: dos ríos manejo con sus respectivos pares control (Fig. 2C): dos ríos manejo con sus respectivos pares control (Tabla 1).

Adicionalmente, se tomó al río Jatunhuico (parte de la cuenca del Antisana) como una unidad de evaluación distinta debido al interés del FONAG en conocer la calidad microbiológica del agua de esta sub cuenca, considerada como potencial fuente de captación para el suministro de agua del DMQ, debido a un presunto hallazgo de *Giardia intestinalis* en este río. Por tanto, se estableció tres puntos de muestreo ubicados en un pequeño gradiente de elevación del río Jatunhuaico (Fig. 2A), (Tabla 1).

Para los fines de este estudio se incluyó al río San Pedro, tributario de la Cuenca del Guayllabamba, como indicador de río contaminado para evaluar la eficacia de los métodos moleculares empleados. Las fuentes de contaminación del río San Pedro son aguas residuales provenientes de poblados cercanos a Quito, haciendas ganaderas e industrias.

Recolección y transporte de las muestras

En cada punto de muestreo se colectó 3.3 L de agua en fundas Whirl-pack (Nasco, USA) estériles en dos fechas distintas: Mayo del 2014 y agosto del 2015. En Mudadero se tomó sólo una muestra de agua en mayo del 2014, debido a que las autoridades nacionales prohibieron el paso al Parque Nacional Cotopaxi (entrada al predio Mudadero) en agosto del 2015, por el alto riesgo de erupción del volcán Cotopaxi. Las muestras colectadas fueron transportadas y almacenadas a 4°C en el laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) hasta su procesamiento dentro de las siguientes 24 horas.

Detección y cuantificación de *Escherichia coli*

Se empleó la técnica de filtración por membrana, por ser la técnica de aislamiento más recomendada para aguas poco o muy poco contaminadas [1]. Se filtró 50 y 100 mL de agua (por duplicado) a través de un filtro de membrana con poro 0.45 µm (Merck, Millipore, USA) colocado en un embudo de acero y filtrado al vacío mediante una bomba de alta presión (Millipore 115V 60HZ). Se cultivó cada membrana en una caja petri con agar Chromocult (Merck, Millipore, USA). Se incubó a 36 °C durante 48 horas. Se cuantificó las colonias de *E. coli* en un contador de colonias y los resultados se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias (UFC), UFC/50 mL y UFC/100 mL.

Mediciones ambientales

En cada uno de los puntos de muestreo se realizaron mediciones de variables físicas, químicas, biológicas y ecológicas de los ríos. Estos parámetros se midieron en el año 2014 durante el estudio “Diagnóstico de la calidad ecológica de los ríos y la vegetación de ribera de las zonas de manejo del FONAG” [37].

Los parámetros físicos que se midieron fueron: Temperatura del agua, composición del sustrato (sólidos totales, sedimentos en suspensión), morfología fluvial (ancho, profundidad, cantidad de meandros, porcentaje de rápidos, cantidad de piscinas, caudal instantáneo). Los parámetros químicos fueron: PH, Oxígeno disuelto, nitratos, nitritos, fosfatos, sulfatos, amonio, conductividad. Los parámetros biológicos fueron: Invertebrados acuáticos y coliformes fecales. Los parámetros ecológicos fueron: Calidad de vegetación de ribera (QBR), calidad del hábitat fluvial (IHF) y biomasa de algas. Las mediciones de los parámetros ambientales corresponden al estudio de Encalada *et al.* (2014) [37].

Investigación de Protozoarios patógenos

Extracción de ADN

Para la investigación de *Giardia intestinalis* y de *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua de río se filtró 3L de agua de cada muestra a través de una membrana de fibra de vidrio con tamaño de poro 1.2 μm (Merck, Millipore, USA)

por el sistema de bombeo indicado más arriba. Se guardó la membrana a - 80°C para su posterior extracción de ADN.

Se extrajo el ADN total de las muestras de agua de río a partir de las membranas filtradas, por medio del Kit comercial “Power Soil Isolation Kit” (MOBIO Laboratories, QUIAGEN, USA), según las instrucciones del fabricante, con una pequeña modificación, que consistió en utilizar la membrana cortada en lugar de la muestra sugerida [38].

Obtención de controles positivos

Un control positivo de *Giardia intestinalis* se obtuvo a partir de una muestra de heces humana con numerosos quistes del parásito que fueron observados por microscopía. La muestra de heces se confirmó positiva para *Giardia intestinalis* mediante la técnica bioquímica de ELISA que detecta los antígenos del parásito en las heces.

Se recuperó los quistes a través de la técnica de flotación con solución de sulfato de zinc (ZnSO₄) al 33% [39]. Brevemente, se disolvió 50 mg de heces en 750 µL de Solución ZnSO₄ al 33%, se filtró la mezcla a través de un colador y se dejó reposar por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante junto con los quistes y se diluyó en agua pura (dilución 1:10). Se cuantificó los quistes mediante la técnica de conteo celular en cámara de Neubauer [40]. Brevemente, se tomó 20

μL de la dilución para llenar la cámara de Neubauer y se contó los quistes presentes en 4 cuadrantes. Se repitió el procedimiento 5 veces para obtener la densidad celular o número de quistes por μL de solución en 50 mg de heces aplicando la fórmula:

$$\text{Quistes}/\mu\text{L} = \frac{\text{número de quistes}}{\text{Superficie recontada (mm}^2\text{)} \times \text{profundidad (mm)} \times \text{dilución}}$$

Número de quistes= Número de quistes recontados en la cámara

Superficie recontada = 4 cuadrados ($4 \times 1 \text{ mm}^2 = 4 \text{ mm}^2$)

Profundidad de la cámara = 0,1 mm

Dilución = 1:10

Un control positivo de ADN de *Cryptosporidium sp* fue donado por la Université de Reims, Francia. Un segundo control positivo se obtuvo a partir de una muestra de heces de bovino. La muestra de heces se confirmó positiva para *Cryptosporidium sp* mediante la técnica bioquímica de ELISA que detecta los antígenos del parásito en las heces.

Se recuperó los ooquistes presentes en las heces a través de la técnica de flotación con solución de sulfato de zinc (ZnSO_4) al 33% descrita anteriormente [39]. Se realizó la extracción de ADN total de la muestra positiva de *Cryptosporidium sp* mediante el Kit comercial Power Fecal Isolation Kit (MOBIO Laboratories, QUIAGEN, USA), con 250 mg de heces de la muestra, según las instrucciones del fabricante [41]. La medición de la cantidad y calidad del ADN se

realizó mediante espectrofotometría en el equipo NanoDrop 1000 spectrophometer.

PCR Convencional

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es la amplificación enzimática de un fragmento de interés (ADN) localizado entre dos oligonucleótidos (cebadores), que se realiza en tres ciclos que se repiten. Los ciclos son: Denaturación de la doble hebra de ADN; Alineamiento de los cebadores con su región complementaria; y, Extensión o síntesis de ADN por la polimerasa.

Se empleó la técnica de PCR convencional con los cebadores JVAF y JVAR [43, 44], que amplifican un segmento del gen que codifica para la pequeña subunidad ribosomal 18S rRNA de *Cryptosporidium spp*, los mismos que fueron sintetizaron según las secuencias de genes diana presentadas en la Tabla 2. Se realizó el análisis in silico de los cebadores con el programa Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) para su validación (Tabla 3).

La amplificación se llevó a cabo en un equipo BioRad CFX-96; cada reacción de 25 μL contenía: Green Go Taq Buffer 5 μL (1x), Solución MgCl_2 2 μL (2 mM), dNTP Mix 0,5 μL (200 μM), GoTaq Polymerase 0,1 μL (0.5 U/ μL), cebadores forward 0,625 μL (0,25 μM) y reverse 0,625 μL (0,25 μM), 14,15 μL de agua y 2 μL

de ADN. Las condiciones de la PCR fueron: denaturación inicial 95.0°C por 2 minutos, seguida de 45 ciclos de denaturación 94.0°C por 1 minuto, anidación 55.0°C por 1 minuto, extensión 72.0°C por 1 minuto, y una extensión final de 72.0°C por 5 minutos. Se evaluó los productos de amplificación por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.

PCR anidada

La PCR anidada es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. La primera reacción se realiza con cebadores externos que amplifican una región de ADN extensa que contiene a la secuencia objetivo. La segunda reacción utiliza el producto de amplificación anterior como molde y cebadores internos que amplifican la región específica.

Se sintetizó los cebadores de pre-anidación (Cry-15 y Cry-9) y anidación (Cowpnest-F1 y Cowpnest-R2) que amplifican una región del gen COWP de *Cryptosporidium spp* [45], de acuerdo a las secuencias presentadas en la Tabla 2.

La amplificación de PCR anidada se efectuó en un equipo BioRad CFX-96. En la pre-anidación cada 10 µL de reacción contenía: Green Go Taq Buffer 2 µL (1x); solución MgCl₂ 1 µL (2,5 mM); dNTP Mix 0,25 µL (250 µM); GoTaq Polymerase

0,4 μL (2 U/ μL); cebadores forward 0,2 μL (0,2 μM) y reverse 0,2 μL (0,2 μM); 3,95 μL de agua y 2 μL de ADN. El protocolo de ciclado de la pre-anidación consistió en una denaturación inicial 94.0°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de denaturación 94.0°C por 50 segundos, anidación 52.0°C por 30 segundos, extensión 72.0°C por 50 segundos, y una extensión final de 72.0°C por 10 minutos.

En la anidación cada 10 μL de reacción contenía: Green Go Taq Buffer 2 μL (1x); solución MgCl_2 1 μL (2,5 mM); dNTP Mix 0,25 μL (250 μM); GoTaq Polymerase 0,4 μL (2 U/ μL); cebadores forward 0,2 μL (0,2 μM) y reverse 0,2 μL (0,2 μM); 5,45 μL de agua y 0,5 μL del amplicón de pre-anidación. El protocolo de ciclado de la anidación consistió en: denaturación inicial 94.0°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de: denaturación 94.0°C por 50 segundos, anidación 60.0°C por 30 segundos, extensión 72.0°C por 50 segundos, y una extensión final de 72.0°C por 10 minutos.

PCR Cuantitativa (qPCR)

La técnica de qPCR es el monitoreo continuo de la acumulación del producto amplificado durante una PCR, basado en la detección y cuantificación de la fluorescencia de una molécula reportera (sonda) medida a lo largo de los ciclos de PCR. Los niveles de fluorescencia bajos durante los primeros ciclos no son

detectados (fluorescencia de fondo). El nivel por encima de la fluorescencia de fondo o nivel umbral (Ct), es el primer incremento significativo en la cantidad de producto de la PCR. Los valores Ct menores al nivel de fluorescencia de fondo no se toman en cuenta.

La qPCR de cuantificación absoluta se basa en la elaboración de una curva de calibración que se construye mediante la determinación del nivel umbral (Ct) en diluciones conocidas de ADN. La cuantificación por qPCR compara los valores Ct de las muestras con los Ct de la curva de calibración.

La curva de calibración se construyó con cinco estándares de ADN: Una dilución 10^0 (1 μL de ADN de control positivo de *G. intestinalis* a una concentración de 10 ng/ μL) y cuatro diluciones en serie 1:10 de la dilución madre (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). La gráfica de la curva de calibración forma una pendiente que permite calcular la eficiencia de la reacción de amplificación mediante la Ecuación: $E = 10^{-1/m}$. Donde E, eficiencia de la amplificación; m, pendiente.

Para la investigación de *G. intestinalis* se utilizó los cebadores β -Giardin P241F y β -Giardin P241R y la sonda Glamb probe (TaqMan) (Tabla 2), que amplifican un segmento del gen β -Giardin (74 pb) de *Giardia intestinalis*, probados previamente en la detección de *G. intestinalis* en muestras ambientales [42]. Se sintetizaron los cebadores y sonda según las secuencias de genes diana presentadas en la Tabla 2 y se realizó el análisis in silico de los cebadores (Tabla 4) con el programa

Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) para su validación (Tabla 4).

Se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional como referencia para estandarizar el protocolo de qPCR. La amplificación se llevó a cabo en un equipo BioRad CFX-96; cada reacción de 25 μL contenía: Green Go Taq Buffer 5 μL (1x), Solución MgCl_2 2 μL (2 mM), dNTP Mix 0,5 μL (200 μM), GoTaq Polymerase 0,1 μL (0.5 U/ μL), cebadores forward 0,75 μL (0,3 μM) y reverse 0,75 μL (0,3 μM), 13,9 μL de agua y 2 μL de ADN. Los cebadores β -Giardin P241F y β -Giardin P241R se sintetizó según las secuencias de genes diana presentadas en la Tabla 2. Las condiciones de ciclado de la PCR fueron: denaturación inicial 95.0°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de denaturación 95.0°C por 30 segundos, hibridación 60.0°C por 1 minuto, extensión 72.0°C por 30 segundos, y una extensión final de 72.0°C por 5 minutos. Se evaluó los productos de amplificación por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.

Se estandarizó dos protocolos de amplificación de qPCR. El primero con la tecnología de EvaGreen, que consiste en un agente intercalante de ácidos nucleicos fluorescente con características similares a SyberGreen; y, el segundo, con la tecnología de sondas fluorescentes (TaqMan).

La amplificación se llevó a cabo en un equipo BioRad CFX-96. El protocolo de

amplificación con EvaGreen se realizó en 20 μL de reacción que contenía: SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad laboratories, USA) 10 μL (1x), 1 μL de cebadores forward (0,5 μM) y reverse (0,5 μM), 7 μL de agua y 1 μL de ADN. Las condiciones de ciclado fueron: denaturación inicial 95.0°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de denaturación 95.0°C por 15 segundos, anidación 60.0°C por 1 minuto, extensión 72.0°C por 30 segundos.

El análisis de resultados de la qPCR con EvaGreen se basó en la interpretación de la curva de fusión. La temperatura de fusión (T_m), o temperatura de separación de las hebras de ADN, es una medida de la estabilidad de los híbridos definida como la temperatura a la cual 50% de los híbridos se encuentran formados y 50% permanecen disociados.

El protocolo de amplificación con TaqMan se realizó en 20 μL de reacción que contenía: iTaq Probes Supermix (BioRad laboratories, USA) 10 μL (1x), 2 μL de cebadores forward (1 μM) y reverse (1 μM), 2 μL de sonda (0,1 μM), 3 μL de agua y 1 μL de ADN. Las condiciones de ciclado fueron: denaturación inicial 95.0°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de denaturación 95.0°C por 15 segundos, anidación 60.0°C por 1 minuto. El análisis de resultados se realizó mediante la interpretación de la curva de amplificación.

En cada ensayo se incluyó un control positivo (*Giardia intestinalis*), un control negativo (*Cryptosporidium sp.*) y un control NTC (agua de PCR). Las muestras se

analizaron por duplicado.

Secuenciación Sanger

La Secuenciación de ADN tiene como finalidad la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en una secuencia de ADN, la cual constituye la información genética heredable de los seres vivos. Los productos de amplificación de ADN de las reacciones positivas a PCR para los genes blanco β -Giardin de *G. intestinalis* y 18S rRNA de *Cryptosporidium sp* se enviaron a los laboratorios Functional Biosciences (Madison, USA) para obtener sus secuencias por el método de Sanger.

Filo-tipificación por secuenciación masiva

A diferencia de los sistemas de secuenciación tradicionales, las plataformas de secuenciación masiva son capaces de generar paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación; debido al gran rendimiento de éste método es idóneo para un sin fin de estudios.

En esta investigación se empleó el método de secuenciación masiva en la plataforma Illumina MiSeq (d bTEFAP® illumina, 20k) del Laboratorio MRDNA LAB (Texas, USA) con la finalidad de analizar el ADN de los ríos San Pedro y Jatunhuico, el primero como referente de un río contaminado y el segundo como

referente de un río de interés. El punto de muestreo “Vertedero 1” fue la muestra analizada del Río Jatunhuaico, donde presuntamente se halló *Giardia intestinalis*; este punto se sitúa en el gradiente de elevación más bajo del río dentro del predio Antisana (Tabla 1).

Se envió 50 μ L de ADN de cada uno de los ríos señalados anteriormente, a una concentración de 20 ng/ μ L. Además, se envió los productos de amplificación de PCR del gen β -Giardin para la detección de *Giardia intestinalis*.

Las lecturas de secuenciación masiva fueron obtenidas a partir de la amplificación gen 18S rRNA de eucariotas unicelulares y de los productos de amplificación del gen β -Giardin. Se realizó un análisis de los datos obtenidos con la finalidad de contrastar la composición de microorganismos en estos ríos y confirmar los resultados obtenidos por PCR en la detección de *Cryptosporidium* spp y de *Giardia intestinalis*.

Los datos de las secuencias amplificadas de los genes 18S rRNA y β -Giardin se procesaron por separado, usando una red de análisis de ADN (MR DNA, Shallowater, TX, EE. UU.). Se generó unidades taxonómicas operacionales (OTU) agrupadas por nivel taxonómico basado en el porcentaje de identidad a una secuencia de referencia de NCBI. Las OTU se definieron con el 97% de similitud y se clasificaron taxonómicamente utilizando BLASTn.

Análisis estadístico

Normalidad de los datos y Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de la normalidad de los datos se realizó mediante estadística descriptiva. Se aplicó transformación logarítmica (Log e) para aquellas variables que no cumplieron con la homogeneidad de varianza. Todos los análisis se los realizó con el programa estadístico JMP (9.0) (SAS Company).

Se evaluó la variación en la concentración de *E. coli* (UFC/50 mL) de los ríos control versus los ríos manejo, en las localidades de Antisana, Mudadero y Cerro Puntas, para determinar si existe una mayor o menor contaminación fecal dependiendo del tratamiento de los ríos (ríos control y ríosmanejo) y/o de la localidad (Antisana, Mudadero y Cerro Puntas), lo cual nos permite inferir sobre el efecto del manejo de los ríos en estas localidades. Para dar cumplimiento a este objetivo, se realizó un ANOVA de dos vías; donde, el Factor 1= sitio de muestreo y el Factor 2= Tipo de tratamiento.

Así mismo se midió la concentración de *E. coli* (UFC/50 mL) a lo largo de un gradiente de elevación en la cuenca del río Jatunhuaico para evaluar la contaminación fecal a lo largo de este río y determinar en qué punto existe una mejor calidad de agua que sea apta para captación; además para evaluar si la contaminación fecal depende de la época del año en que se midió el indicador.

Para ello, se empleó un ANOVA de 2 vías; donde, el Factor 1= Gradiente de

elevación del río (Bajo, Medio, Alto) y el Factor 2= Época de recolección de las muestras (mayo de 2014 y agosto de 2015).

Correlación entre *E. coli* y parámetros ambientales

Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre las concentraciones de *E. coli* (UFC/50 mL) versus los parámetros ambientales físicos, químicos, biológicos y ecológicos de los ríos estudiados, para determinar si la presencia de *E. coli* está relacionada o no con ciertas características de los ríos que puedan favorecer la supervivencia de esta bacteria en el medio acuático.

Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se aplicó la corrección de Bonferroni para evitar error estadístico tipo 5.

RESULTADOS

Detección y cuantificación de *E. coli*

Se encontró *E. coli* en el 87% de las muestras colectadas (Tabla 5). Los contajes de *E. coli* variaron entre 0 y 64 UFC/100 ml (Fig.3). El río que presentó mayores concentraciones de *E. coli* (64 UFC/100 ml) fue el río Puyurima, que es el par control del río Jatunhuaico, pero que se encuentra fuera del predio Antisana;

seguido de los ríos de la Quebrada Alambrada baja (52 UFC/100 ml) y Quebrada Alambrada alta (52 UFC/100 ml), también situados fuera del predio Antisana. Todos los demás ríos analizados tuvieron contajes de *E. coli* menores a 50 UFC/100 mL).

El análisis de ANOVA indicó que las diferencias en la concentración de *E. coli* entre localidades (Antisana, Mudadero y Cerro Puntas) y entre tipos de tratamiento (ríos control y ríos de manejo) no son estadísticamente significativas ($F_{5, 19} = 1.4506$, $p = 0.2670$).

No obstante, el análisis de varianza de cada uno de los factores por separado, muestra que las diferencias en la concentración de *E. coli* son significativas entre ríos control y ríos de manejo ($F_{5, 19} = 4.8991$, $p = 0.0440^*$) y que las diferencias entre las localidades de Antisana, Mudadero y Cerro Puntas, no son significativas ($F_{5, 19} = 1.0387$, $p = 0.3737$) (Fig. 4). El ANOVA que analiza únicamente el factor tipo de tratamiento, dio como resultado una menor concentración de *E. coli* en los predios manejados comparado con los predios control ($F_{1, 19} = 5.4841$, $p = 0.0309^*$) (Fig. 5).

En el río Jatunhuaico, donde los sitios de muestreo están ubicados en un gradiente altitudinal, se encontró que las concentraciones de *E. coli* varían significativamente entre los gradientes de muestreo; así, en el sitio de muestreo

más bajo existe una mayor concentración de *E. coli* comparado con los sitios de mayor elevación ($F_{3,7}=10.9560$, $p=0.0213^*$). En contraste, no se encontró diferencia significativa de la concentración de *E. coli* entre las épocas de muestreo ($F_{3,7}=2.2728$, $p=0.1909$) (Fig. 6).

El análisis de correlación de Pearson indicó correlaciones positivas entre la concentración de *E. coli* (UFC por 50 mL) y algunos parámetros ambientales como son la temperatura ($r=0,6651$, $p=0,0183^*$) y el ancho del riachuelo ($r=0,5374$, $p=0,0145^*$) (Fig.7). También hubo una correlación de *E. coli* con otros parámetros ambientales tales como: amonio, oxígeno disuelto y sólidos suspendidos; sin embargo, estas correlaciones tuvieron un valor de significancia menor ($p < 0.1$) (Tabla 6).

Investigación de *Giardia intestinalis*

En el ensayo de PCR convencional para la detección de *Giardia intestinalis* en muestras de ríos, se obtuvo una reacción positiva en la muestra del río San Pedro (Figura 8). Sin embargo, no se pudo confirmar este resultado debido a que no se obtuvo una secuencia válida, por el método de sanger, que pueda ser comparada con secuencias de *G. intestinalis* presentes en el genbank (Figura 9).

En los ensayos de qPCR con EvaGreen se obtuvo una curva de calibración formada por las diluciones en serie del control positivo de *Giardia intestinalis* que

tuvo un coeficiente de correlación $R^2 = 0,98$ y una pendiente = $-3,023$ (Fig. 10).

La discriminación entre muestras positivas y negativas se realizó mediante el análisis de la curva de fusión, formada por los valores T_m de las muestras analizadas (Fig.11). Los estándares de ADN del control positivo de *Giardia intestinalis*, alcanzaron un valor $T_m = 81^\circ\text{C}$; en base a estos resultados, las muestras con T_m igual a 81°C son consideradas positivas, en tanto que, las muestras con T_m inferior o superior a 81°C son consideradas negativas. Las muestras analizadas de riachuelos de páramo, así como también la muestra de río contaminado, obtuvieron valores T_m que variaron entre 88°C y 89.5°C (Tabla 7, Fig. 11), es decir, todas las muestras de fuentes de agua fueron negativas para *G. intestinalis*.

En el ensayo de qPCR con sonda TaqMan, se obtuvo una curva de calibración con diluciones de ADN de *G. intestinalis* de cuatro órdenes de magnitud (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). La curva de calibración tuvo un coeficiente de correlación $R^2 = 0,98$ y una pendiente = $-2,388$. El umbral de detección (C_t) del control positivo y de las diluciones varió entre 28 y 37, por lo que, los valores C_t comprendidos entre 28 y 37, se consideró positivos y los valores C_t mayores a 38 se consideró negativos (Fig. 12). Todas las muestras de ADN proveniente de fuentes de agua resultaron negativas para *Giardia intestinalis* debido a valores C_t mayores a 38 (Tabla 7).

La sensibilidad de la qPCR se estimó por el número de quistes detectados en los controles positivos; el límite de detección fue de 0,0045 quistes/ μL de ADN, lo que equivale a 1 pg/ μL de ADN (Tabla 8). Se validó la eficacia del método mediante la amplificación de un control positivo de prueba, que dio como resultado la detección de 0,011 copias del gen β Giardin equivalentes a 0,47 quistes/ μL de ADN (Tabla 8, Fig. 13).

Investigación de *Cryptosporidium spp.*

En el análisis de PCR convencional, tres de las muestras de ADN proveniente de fuentes de agua del predio Antisana (Quebrada Alambrada, río Jatunhuaico y río Patugllana) presentaron reacciones positivas a PCR de *Cryptosporidium spp.*; sin embargo, cuando se analizó las secuencias del ADN amplificado, obtenidas con el método de secuenciación de Sanger, se encontró que estas secuencias no corresponden a *Cryptosporidium sp.*, sino quizá, a algún protista ambiental cercano (*Labyrinthula sp*) (Figura 14).

A pesar de que en el presente estudio se utilizó una técnica diseñada para la detección ambiental de *Cryptosporidium spp* [44], los resultados de los análisis de secuenciación y filogenéticos, sugieren que estas sondas no son específicas porque fueron capaces de amplificar protistas ambientales.

Para corroborar los resultados anteriores, se procedió a realizar una prueba

de PCR anidado. El análisis de PCR anidada amplificó correctamente el control positivo de *Cryptosporidium* sp., sin embargo, ninguna de las muestras de agua amplificó con el sistema de PCR aplicado (Fig. 15), por tanto, son negativas para *Cryptosporidium* sp.

Filo-tipificación por secuenciación masiva

Los resultados obtenidos en el análisis de las OTU del 18S rRNA, indicaron que la diversidad taxonómica de eucariotas es distinta en las muestras del río Jatunhuaico respecto al río San Pedro. En el río Jatunhuaico hubo mayor diversidad de OTU que en el río San Pedro, lo cual se traduce en una mayor diversidad de géneros y especies (Fig. 16 y 17). Los géneros dominantes en el río San Pedro fueron *Loxophyllum* y *Rhogostoma* que suman el 97% de los OTU obtenidos de este río; mientras que, en el río Jatunhuaico los géneros más abundantes fueron: *Vorticella*, *Bromeliophrya*, *Loxophyllum*, *Balantidion*, *Cephaloidophora*, *Plasmodiophora* y *Rhogostoma* que suman el 74% de los OTU obtenidos de este río.

Los protozoarios ciliados del género *Loxophyllum* suelen vivir en hábitats de agua dulce y marinos con contaminación orgánica, aunque con menor frecuencia han sido encontrados en aguas limpias. El género *Rhogostoma* son protistas de agua dulce que viven en aguas contaminadas con estiércol y se

alimentan de bacterias. Por lo tanto, la presencia de estos protistas estaría indicando que el agua del río San Pedro tiene una alta carga orgánica y está contaminada con materia fecal.

En el río Jatunhuiaco los géneros *Loxophyllum* y *Rhogostoma* apenas suman el 18% de la diversidad encontrada, estos resultados sugieren que aunque el río Jatunhuico presenta evidencia de contaminación orgánica de origen fecal, la calidad del agua de este río aparentemente es mejor ya que existe una mayor diversidad de géneros y especies.

El análisis de las secuencias del gen 18S rRNA, reveló cuatro OTU con secuencias similares a *Cryptosporidium* sp. (OTU254, OTU322 OTU221 y OTU355); sin embargo, el análisis filogenético de estas secuencias, indicó que no correspondían al protozooario investigado, sino a otro eucariota ambiental no cultivable (Figura 18). Por lo tanto, la secuenciación masiva permitió confirmar que los resultados obtenidos por PCR para la detección de *Cryptosporidium* spp. en muestras de ríos, corresponden a falsos positivos.

El análisis de las secuencias de ADN de los productos de amplificación para el gen β -Giardin dio como resultado varios OTU que no tenían ninguna homología con β -Giardin; se analizó los principales OTU mediante BLASTn y se encontró homologías con *Caulobacter* sp., una bacteria Gram negativa distribuida ampliamente en suelos, lagos, corrientes de agua y agua de mar. Estos resultados

confirman que las secuencias amplificadas por PCR para el gen β -Giardin, no pertenecían a *Giardia intestinalis*, sino probablemente a una bacteria, lo cual sugiere que hubo una reacción cruzada en la amplificación del ADN que condujo a la obtención de productos de amplificación inespecíficos.

DISCUSIÓN

Detección y cuantificación de *Escherichia coli*

Las fuentes de agua evaluadas en esta investigación tuvieron niveles de contaminación de *E. coli* entre 0-64 UFC/100 mL, considerados bajos de acuerdo a la Norma Ambiental ecuatoriana para “Aguas de consumo humano que únicamente requieren tratamiento convencional”, la cual establece el límite máximo permisible de concentración de coliformes fecales de 600/100 mL de agua, medidos a través de la metodología de fermentación en tubos múltiples y expresada en Número más Probable (NMP) [25]. La metodología empleada en esta investigación para medir la concentración del coliforme fecal *E. coli*, fue la de filtración por membrana, que a diferencia de la técnica semi cuantitativa de fermentación en tubos múltiples, tiene la ventaja de ser cuantitativa, además de estar aceptada y aprobada por la Organización Mundial de la Salud y otras normas ambientales internacionales para monitorear la calidad del agua [2, 26]; sin

embargo, es considerada menos sensible que la recomendada por la Norma Ambiental ecuatoriana.

La mayoría de ríos analizados tuvieron concentraciones de *E. coli* menores a 50 UFC/100 mL, probablemente debido a que se encuentran ubicados en zonas de páramo andino, distantes de centros poblados y, en su mayoría, dentro de reservas protegidas, lo cual los hace menos susceptibles a la contaminación fecal de origen humano, siendo las únicas fuentes probables de contaminación fecal, las provenientes de animales silvestres y ganado salvaje. Estos resultados son similares a los de otros estudios realizados en aguas superficiales dentro de reservas ecológicas en varias regiones del mundo, donde se mide el nivel de contaminación de las fuentes de agua por medio de la cuantificación del indicador *E. coli* [46-49]. Por ejemplo, en un estudio realizado a lo largo de la cuenca del río Colorado dentro del Parque Nacional del Gran Cañón, en Estados Unidos, se encontró que las concentraciones del indicador fecal (*E. coli*) en las fuentes de agua estaban dentro del rango de 10 a 100 UFC por 100 ml de agua [47].

En esta investigación se observó una menor concentración de *E. coli* en los ríos manejados por el FONAG que en los ríos control, aunque esta diferencia fue significativa únicamente para los ríos de la zona de investigación del Antisana (Fig. 4 y 5). Sin embargo, esta tendencia sugiere que la remoción del ganado fue una acción efectiva que permitió el control de la contaminación fecal en las fuentes

hídricas. Esta hipótesis estaría sustentada también por varios estudios se han demostrado que la presencia de ganado está relacionada con la contaminación fecal del suelo y el agua tanto superficial como subterránea [50-52].

En cuanto a la evaluación de la calidad del agua del río Jatunhuaico dentro del predio Antisana, se encontró que las concentraciones de *E. coli* en este río son mayores en el gradiente más bajo de elevación, lo cual supone un posible arrastre de material desde las zonas más altas del río hacia la parte más baja (Fig. 6) o que la cantidad de ganado que consigue acceder al río por este sitio es mayor. Sin embargo, cabe mencionar que el río Puyurima, que corresponde al par control del río manejo Jatunhuico, tiene los niveles más altos de concentración de *E. coli*, por lo tanto, se presume que la contaminación fecal de los ríos de esta zona aún no han sido del todo controlada con las acciones de vigilancia llevadas a cabo por el FONAG.

La concentración de *E. coli* registrada en agosto del 2015 con respecto a mayo de 2014 no varió significativamente; aunque se observó menores concentraciones de *E. coli* en el año 2015; esto probablemente se deba a la estacionalidad, ya que en la época de lluvia, como es mayo, existe una mayor escorrentía y arrastre del suelo hacia las fuentes hídricas, lo cual supone una mayor cantidad de materia orgánica fecal en los ríos.

Las correlaciones de Pearson indican que la temperatura, el ancho de río, el

amonio, el oxígeno disuelto, los sólidos disueltos y los coliformes, son los parámetros ambientales que tuvieron una asociación significativa con la presencia de *E. coli* (Tabla 6). La correlación positiva entre *E. coli* y la temperatura, es un indicativo de que *E. coli* sobrevive mejor en temperaturas más cálidas, esta correlación ha sido documentada anteriormente en el río Febros de Portugal [53].

La correlación negativa entre el oxígeno disuelto en el agua y las concentraciones de *E. coli*, podría sugerir que aguas con menor cantidad de oxígeno disuelto son un mejor hábitat para la supervivencia de *E. coli*; sin embargo, el hecho de que todos estos ríos de páramo tuvieran una gran cantidad de oxígeno disuelto no se tradujo en la ausencia de *E. coli*, por lo que se cree que esta relación pudo ser aleatoria.

La correlación positiva entre sólidos disueltos y concentraciones de *E. coli*, se explica por la presencia de materia orgánica fecal presente en los ríos; esta relación puede ser aleatoria y deberse al día en que se tomaron las muestras, ya que en épocas de lluvia suele existir un mayor arrastre de material orgánico hacia los ríos. De igual manera las correlaciones entre amonio con *E. coli* y ancho del río con *E. coli* serían tomadas como aleatorias debido a que no existe un sustento teórico para ellas.

La correlación de los coliformes totales con *E. coli* es evidente, dado que los coliformes son bacterias con exigencias similares a *E. coli*, y algunos de ellos

también pueden multiplicarse en el ambiente, sin embargo, una de las características que diferencia al *E. coli* de otros coliformes es su origen fecal.

Entre los limitantes de esta investigación fue que las concentraciones de *E. coli* se midieron en dos distintos años: mayo 2014 y agosto 2015, mientras que la medición de los parámetros ambientales se realizó en el año 2014, por lo tanto, puede haber una variación de los parámetros ambientales respecto al tiempo.

Investigación de protozoarios patógenos

La presencia de quistes de *Giardia intestinalis* y de ooquistes de *Cryptosporidium spp* en aguas superficiales de ríos, ha sido reportada en varios países. Las concentraciones reportadas de quistes de *Giardia* varían de 0,01 a 112 quistes /L, concentraciones de *Cryptosporidium spp* varían entre 0,07 a 484 ooquistes /L [54-63]. Por ejemplo, Franco *et al.*, 2001, en el río Atibaia de Campiñas, Brasil, detectó quistes y ooquistes de estos protozoos en todas las muestras analizadas [59]. El hallazgo frecuente de estos protozoos en el agua de suministro para consumo humano es importante desde el punto de vista de la salud pública ya que los métodos usuales de tratamiento de aguas potables (filtración, floculación, sedimentación y desinfección) no son muy eficaces para eliminar o destruir los quistes y ooquistes de estos parásitos [60-64].

Además, se ha descrito que la presencia de estos protozoos en agua de

ríos, tiene una relación directa con los indicadores bacterianos de contaminación fecal: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, con *Pseudomonas aeruginosa*, con la materia orgánica y con la turbidez [64].

De acuerdo a la “Norma de Calidad Ambiental y descarga de efluentes: Recurso Agua” el criterio de calidad para aguas de riego es de cero quistes u ooquistes de parásitos en 1 litro de agua [25]. Nuestros resultados de qPCR indicaron que no hubo la presencia de quistes de *Giardia intestinalis* en las fuentes de agua analizadas de los predios Antisana, Mudadero y Cerro Puntas (Tabla 7); en tanto que, los resultados de PCR anidada confirmaron la ausencia de *Cryptosporidium spp* en las fuentes de agua señaladas.

A pesar de que los cebadores utilizados mostraron en el análisis in-silico específicos para los protozoarios investigados, curiosamente tampoco se detectó a los protozoarios *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium spp*. en el río San Pedro, donde se esperaría encontrar alguna evidencia de dichos patógenos debido a que recibe descargas orgánicas sin un previo tratamiento del agua y que además está afectada por poblados y haciendas ganaderas. Estos resultados sugieren que la detección con los métodos moleculares empleados no es confiable.

Las razones de la existencia de resultados confusos por métodos moleculares pueden ser varias. Entre ellas, destacan las siguientes:

- 1) la región genómica en la que se basaron los autores que diseñaron los

cebadores para detección de éstos protozoos pudo no haber sido una región conservada para distintos taxones, lo que hace que algunas variantes genómicas del microorganismo no puedan ser identificadas por esos cebadores. Este podría ser el caso de los cebadores P241F y P241R diseñados para la detección del gen β -Giardin, que codifica para una proteína específica de *Giardia intestinalis*, sin embargo, debido a que esta especie tiene siete variantes genómicas (A-G), los cebadores empleados pudieron no haber reconocido a algunas de ellas. En el estudio de Guy *et. al.* (2003) los cebadores P241F y P241R fueron probados únicamente para los genotipos A y B de la especie, que son más frecuentes en humanos, más no siempre presentes en animales silvestres.

2) los cebadores empleados pueden no ser específicos o las condiciones de la PCR no son óptimas, en consecuencia, se pueden amplificar productos no específicos. Lo anterior puede guiar a la detección de falsos negativos o falsos positivos, ésta podría ser la causa de la supuesta detección de *Cryptosporidium* spp con los cebadores JVAF y JVAR en muestras de los ríos del predio Antisana (incluyendo al río Jatunhuaico), en este caso se demostró que las secuencias de ADN de los fragmentos amplificados por PCR correspondían a un protista ambiental (*Labyrinthula* sp) y no a *Cryptosporidium* spp. (Fig.12).

3) La especificidad de la prueba puede ser afectada por la contaminación de las muestras con inhibidores de la enzima polimerasa (ácidos húmicos,

polifenoles, carbohidratos, etanol, etc) durante su procesamiento, esto puede ocasionar también falsos negativos. Sin embargo, esto se suele solucionar incorporando siempre controles positivos en los ensayos.

4) La identificación de microorganismos directamente en muestras ambientales utilizando PCR presenta algunos retos como es la baja sensibilidad provocada por la inhibición debida a algunos sólidos disueltos en el agua. Las muestras de agua ambiental normalmente llevan consigo inhibidores como son los ácidos húmicos propios de suelos, esto suele ser parcialmente solucionado con enriquecedores como son el BSA (Bovine Serum Albumine), sin embargo, dicho enriquecimiento no funciona con las formas quísticas de *Cryptosporidium* spp y *Giardia intestinalis*. Estos inconvenientes hacen que la detección de quistes de *Giardia intestinalis* y ooquistes de *Cryptosporidium* spp en muestras ambientales mediante métodos moleculares, no sea fácil [16, 29-31].

No han sido reportadas anteriormente amplificaciones inespecíficas de *Giardia intestinalis* con los cebadores P241F y P241R en muestras de ríos o de heces; sin embargo, en el estudio donde se usó por primera vez estos cebadores para la detección de quistes de *Giardia* en aguas superficiales, no se pudo amplificar el ADN de β -Giardin en aguas del río Colorado, con turbidez moderada, a menos que los quistes fueran previamente separados con el método de Inmunofluorescencia (IBM) y la muestra de agua tratada con Chelex 100 [67]. Guy et

al. (2003), en el estudio que realizaron para detectar *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium parvum* en ríos de Canadá, añadieron polivinilpirrolidona y Chelex 100 previo a la extracción de ADN de las muestras de agua de ríos para neutralizar a los inhibidores de la PCR, sin embargo esto no tuvo tan buenos resultados en la detección de *Cryptosporidium*, puesto que no amplificó el ADN del parásito en ninguna muestra de río, aduciendo los autores que hubieron sustancias inhibidoras en los extractos de ADN de las muestras de aguas o que el parásito no se encontraba presente en la época de toma de muestra en el río [42].

El análisis de las secuencias de ADN de los productos de amplificación con los cebadores P241F y P241R, obtenidas por secuenciación masiva, no permitió analizar la filogenia de estas secuencias debido a que los OTU generados, presentaron homologías únicamente con bacterias ambientales y no con *Giardia intestinalis*, lo cual indica que hubo una reacción cruzada en la amplificación del gen β - Giardin. Sin embargo, para un análisis detallado de genes como β - Giardin, se necesita contar un mayor número de secuencias que amplíen las bases de datos para dicho gen.

Una de las mayores limitaciones de la secuenciación masiva es la ausencia de bases de datos y genomas de referencia para especies no modelo, que dificultan el análisis de los datos. Por ejemplo, no se tiene en las bases de datos las secuencias de eucariotas ambientales no cultivables y por esta razón las

secuencias de ADN obtenidas con el 18S rRNA fueron relacionadas con la secuencia conocida y verificada más cercana. Sin embargo, mediante el análisis filogenético de las secuencias de ADN obtenidas se pudo esclarecer que las secuencias que se asemejaban a *Cryptosporidium spp* eran en realidad falsos positivos.

La secuenciación masiva gen 18S rRNA para protozoarios, mostró que la diversidad del río Jatunhuiaco es mayor que la del río San Pedro. Los principales géneros hallados en el río Jatunhuiaco (*Vorticella*, *Bromeliophrya*, *Loxophyllum*, *Balantidium*, *Cephaloidophora*, *Plasmodiophora* y *Rhogostoma*) indican que la diversidad de microorganismos de este río son en su mayoría de vida libre; si bien el género *Balantidium* agrupa a la especie parásita *Balantidium coli*, sin embargo, en este estudio, no se encontró la presencia de esta especie (Fig. 17). Estos resultados sugieren que el hábitat acuático del río Jatunhuaico es mejor que el del río San Pedro, porque permiten el desarrollo de una mayor diversidad de microorganismos, en tanto que en el río San Pedro, la dominancia de apenas dos géneros (*Loxophyllum*, *Rhogostoma*) es un indicativo de una pobre calidad del agua.

En cuanto a las limitaciones en la investigación de protozoos patógenos, cabe considerar que los cebadores empleados no fueron precisamente los más específicos para la detección de *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium spp* en

fuentes de agua.

Además, existieron algunas diferencias en la metodología empleada comparada con la de otros estudios; por ejemplo, en esa investigación se filtró 3L de agua por cada muestra de ríos y 2L de agua del río San Pedro, estos volúmenes de agua puede parecer insuficientes considerando que en otros estudios se filtra hasta 10 L de muestras de agua [44, 62, 66]. Sin embargo, la filtración de mayores cantidades de agua no fue posible debido al taponamiento de las membranas con sedimentos, lo cual, probablemente significaría una recuperación pobre de quistes y ooquistes de una muestra en caso que la hubiera.

Otro limitante de la metodología empleada, fue la falta de una purificación adecuada de las muestras previa a la extracción de ADN. Esta condición posiblemente perjudicó la amplificación del ADN de los protozoarios investigados, especialmente en las muestras del río San Pedro, donde se esperaba su presencia. Este limitante podría corregirse con el uso de polivinilpirrolidona y Chelex 100 como lo han reportado otros autores [42, 67].

CONCLUSIONES

Se encontró evidencia de contaminación fecal en la mayoría de fuentes de agua analizadas, aunque las cantidades encontradas del indicador fecal *E. coli*

están muy por debajo de los límites permitidos en la normativa ecuatoriana para agua de consumo humano previo su potabilización. Por lo tanto, se concluye, que los ríos analizados tienen una buena calidad microbiológica del agua que los hace aptos para la captación.

Los ríos manejados por el FONAG tuvieron concentraciones de *E. coli* menores que los ríos control, principalmente en la zona de investigación del Antisana. Esto sugiere que las acciones de control y vigilancia emprendidas por el FONAG podrían tener un efecto positivo en el mantenimiento de la calidad del agua de los ríos.

El análisis microbiológico de la calidad del agua del río Jatunhuaico indicó que las concentraciones de *E. coli* son mayores en el gradiente de elevación bajo de este río, aunque no superan a las concentraciones de *E. coli* fuera del predio; por lo tanto, se sospecha que la contaminación fecal de los ríos de esta zona aún no han sido del todo controlada con las acciones de vigilancia llevadas a cabo por el FONAG.

Tanto el análisis de secuenciación masiva del gen 18S rRNA, como el análisis de secuencias de ADN obtenidas con el método de Sanger, permitieron concluir que los cebadores JVAF y JVAR para *Cryptosporidium* spp no son específicos porque son capaces de amplificar regiones genómicas de protistas ambientales.

El análisis de secuenciación masiva de los productos de amplificación para el gen β -Giardin con los cebadores P241F y P241R, permitió concluir que dichos cebadores son capaces de producir amplificaciones inespecíficas por reacciones cruzadas con bacterias del género *Caulobacter*.

En conclusión, no se detectó la presencia de *Cryptosporidium* spp ni de *Giardia intestinalis* en los ríos de páramo analizados, ni en el río contaminado San Pedro. Estos resultados sugieren que los métodos moleculares empleados no son confiables.

Debido a los resultados no satisfactorios de la investigación de *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium* spp en aguas de río, se recomienda una investigación de estos protozoarios en las heces de los animales que circundan el área de este estudio, debido a que la detección molecular de estos protozoarios es más fiable en heces que en muestras ambientales. Para ello, se sugiere el diseño o selección de cebadores apropiados para la detección de estos patógenos en las heces.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cabral, J. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental and Public Health*, 7, 3657-3703. DOI: 103390/ijerph7103657.
2. World Health Organization. (2008). *Guidelines for Drinking-water Quality, Incorporating 1st and 2nd Addenda*. Vol. 1. Geneva, Switzerland.
3. Carmena, D. (2010). Waterborne transmission of Cryptosporidium and Giardia: detection, surveillance and implications for public health. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A. Méndez-Vilas (Ed.)
4. Snelling, W. J., Xiao, L., Ortega-Pierres, G., Lowery, C. J., Moore, J. E., Rao, J. R., & Kenny, F. (2007). Cryptosporidiosis in developing countries. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 1(03), 242-256.
5. Thompson, R. C., & Monis, P. (2012). Giardia-from genome to proteome. *Adv Parasitol*, 78(78), 57-95.
6. Thompson, R. A. (2004). The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis. *Veterinary parasitology*, 126(1), 15-35.
7. Xiao, L., & Fayer, R. (2008). Molecular characterization of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic

- transmission. *International journal for parasitology*, 38(11), 1239-1255.
8. Cacciò, S. M., Thompson, R. A., McLauchlin, J., & Smith, H. V. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in parasitology*, 21(9), 430-437.
 9. Monis, P. T., & Thompson, R. C. A. (2003). *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infection, genetics and evolution*, 3(4), 233-244.
 10. Caccio, S. M. (2005). Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*, 47(2), 185-192.
 11. Cordero del campillo, M.; Rojo, F. A.; Martínez, A.; Sánchez, C.; Hernández, S.; Navarrete, J.; Díez, P.; Quiroz, H.; Carvalho, M. 1999. *Parasitología Veterinaria*. Ed. Mc Graw-Hill, Interamericana. 213-221pp.
 12. Marshall, M. M., Naumovitz, D., Ortega, Y., & Sterling, C. R. (1997). Waterborne protozoan pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 10(1), 67-85.
 13. Yoder, J. S., & Beach, M. J. (2010). *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. *Experimental parasitology*, 124(1), 31-39.
 14. Molina, R., Mercado, R., & Fredes, F. (2010). Importancia de la detección del protozooario zoonótico *Cryptosporidium parvum* en muestras de agua en Chile. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 25(1-2).

15. Olson ME, Goh J, Phillips M, Guselle N, McAllister TA. Giardia cyst and Cryptosporidium oocyst survival in water, soil, and cattle feces. (1999). *Journal of Environmental Quality* 28(6) DOI: 10.2134/jeq1999.00472425002800060040x
16. Franco, R. M. B. (2007). Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. *Rev Panam Infectol*, 9(4), 36-43.
17. Betancourt, W. Q., & Rose, J. B. (2004). Drinking water treatment processes for removal of Cryptosporidium and Giardia. *Veterinary parasitology*, 126(1), 219-234.
18. Fayer, R., Morgan, U., & Upton, S. J. (2000). Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification. *International journal for parasitology*, 30(12), 1305-1322.
19. Fayer, R., Dubey, J. P., & Lindsay, D. S. (2004). Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in parasitology*, 20(11), 531-536.
20. Heller, L., Bastos, R. K. X., Vieira, M. B. C. M., Bevilacqua, P. D., Brito, L. L. A. D., Mota, S. M. M., & Cardoso, A. B. (2004). Oocistos de Cryptosporidium e cistos de Giardia: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 13(2), 79-92.
21. Rendtorff, R. C. (1954). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. Giardia lamblia cysts given in capsules. *American Journal of Hygiene*, 59(2), 209-20.

22. DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B., & Jakubowski, W. (1995). The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine*, 332(13), 855-859.
23. Dillingham, R. A., Lima, A. A., & Guerrant, R. L. (2002). Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, 4(10), 1059-1066.
24. Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Crabb, J. H., Sterling, C. R., & DuPont, H. L. (1999). Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *Journal of Infectious Diseases*, 180(4), 1275-1281.
25. MAE (Ministerio del Ambiente del Ecuador). (2014). Anexo 1 del Libro VI del texto unificado de Legislación secundaria del Ministerio del Ambiente: Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua.
26. EPA. (2009). *Source Water Protection Practices Bulletin. Managing Stormwater Runoff to Prevent Contamination of Drinking Water*, Office of Water (4606); United States Environmental Protection Agency (EPA): Washington, DC, USA.
27. Francy DS, Donna N, Myers T, et al. (2013) *Escherichia coli* and fecal coliform bacteria as indicators of recreational water quality. Water Resources Investigations Report 93-4083.
28. Byamukama, D., Mach, R. L., Kansiime, F., Manafi, M., & Farnleitner, A. H. (2005). Discrimination efficacy of fecal pollution detection in different aquatic

- habitats of a high-altitude tropical country, using presumptive coliforms, *Escherichia coli*, and *Clostridium perfringens* spores. *Applied and environmental microbiology*, 71(1), 65-71.
29. Dechesne, M., & Soyeux, E. (2007). Assessment of source water pathogen contamination. *Journal of Water and Health*, 5(S1), 39-50.
30. Aw, T. G., & Rose, J. B. (2012). Detection of pathogens in water: from phylochips to qPCR to pyrosequencing. *Current opinion in biotechnology*, 23(3), 422-430.
31. Zarlenga, D. S., & Trout, J. M. (2004). Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Veterinary parasitology*, 126(1), 195-217.
32. Ongerth, J. E., & Stibbs, H. H. (1987). Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(4), 672-676.
33. Ongerth, J. E., Hunter, G. D., & DeWalle, F. B. (1995). Watershed use and *Giardia* cyst presence. *Water Research*, 29(5), 1295-1299.
34. Josse, C., Mena, P., & Medina, G. (1999). *El páramo como fuente de recursos hídricos* (Vol. 3). Editorial Abya Yala.
35. Ordóñez Arízaga, M. V. (2011). Influencia del uso del suelo y la cobertura vegetal natural en la integridad ecológica de los ríos altoandinos al noreste del Ecuador (Bachelor's thesis, Quito: USFQ, 2011).

36. FONAG. (2017). Fondo para la protección del agua.
<http://www.fonag.org.ec/web/>
37. Encalada, A.C., Suárez, E., Arboleda, R., Scherekinger, J. y M.E. Sandhez. (2014). Diagnóstico de la calidad ecológica de los ríos y la vegetación de ribera de las zonas de manejo del FONAG. Informe técnico no publicado. Convenio TNC-FONAG-USFQ.
38. MO BIO Laboratories Inc. (2013). Instruction Manual: PowerSoil DNA Isolation Kit.
39. Kaminsky, R. G. (2003). Manual de parasitología. Métodos para laboratorios de atención primaria de salud.
40. Brand Laboratories (2017). Cámaras de recuento de laboratorio clínico.
<http://www.brand.de/es/productos/laboratorio-clinico/camaras-de-recuento/>
41. MO BIO Laboratories Inc. (2013). Instruction Manual: Powerfecal DNA Isolation Kit.
42. Guy, R. A., Payment, P., Krull, U. J., & Horgen, P. A. (2003). Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5178-5185. doi: 10.1128/AEM.69.9.5178-5185.2003
43. Jothikumar, N., Da Silva, A. J., Moura, I., Qvarnstrom, Y., & Hill, V. R.

- (2008). Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. *Journal of medical microbiology*, 57(9), 1099-1105. DOI: 10.1099/jmm.0.2008/001461-0
44. Staggs, S. E., Beckman, E. M., Keely, S. P., Mackwan, R., Ware, M. W., Moyer, A. P., & Villegas, E. N. (2013). The applicability of TaqMan-based quantitative real-time PCR assays for detecting and enumerating *Cryptosporidium* spp. oocysts in the environment. *PloS one*, 8(6), e66562.
45. Yu, J. R., Lee, S. U., & Park, W. Y. (2009). Comparative sensitivity of PCR primer sets for detection of *Cryptosporidium parvum*. *The Korean journal of parasitology*, 47(3), 293-297.
46. Rivera, S. C., Hazen, T. C., & Toranzos, G. A. (1988). Isolation of fecal coliforms from pristine sites in a tropical rain forest. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(2), 513-517.
47. Tunnicliff, B. R. O. C. K., & Brickler, S. K. (1984). Recreational water quality analyses of the Colorado River corridor in Grand Canyon. *Applied and environmental microbiology*, 48(5), 909-917.
48. Niemi, R. & Niemi, J. (1991). Bacterial Pollution Waters in Pristine and Agricultural Lands. Published in *J. Environ. Qual.* 20:620-627 (1991).
49. Stuart, D., Bissonnet'e, G., Goodrich, T Walter, W. (1971). Effects of multiple use on water quality of high-mountain watersheds: bacteriological investigations of mountain streams. *Appid Microboogy*, p. 1048-1054

50. McDowell, R. W., & Wilcock, R. J. (2008). Water quality and the effects of different pastoral animals. *New Zealand Veterinary Journal*, 56(6), 289-296.
51. Thurman, R., Faulkner, B., Veal, D., Cramer, G., & Meiklejohn, M. (1998). Water quality in rural Australia. *Journal of applied microbiology*, 84(4), 627-632.
52. Kress, m. & Glifford, g. (1984). Fecal coliform release from cattle fecal deposits. American Water Resources Association. Vol 20 (1).
53. Cabral, J.P.; Marques, C. (2006) Faecal Coliform Bacteria in Febros River (Northwest Portugal): Temporal Variation, Correlation with Water Parameters, and Species Identification. *Environ. Monit. Assess* 118, 21–36
54. Solo-Gabriele, H. M., Ager Jr, A. L., Lindo, J. F., Dubón, J. M., Neumeister, S. M., Baum, M. K., & Palmer, C. J. (1998). Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water supplies of San Pedro Sula, Honduras. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 4(6).
55. Ongerth, J. E., & Stibbs, H. H. (1987). Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(4), 672-676.
56. Ongerth, J. E., Hunter, G. D., & DeWalle, F. B. (1995). Watershed use and *Giardia* cyst presence. *Water Research*, 29(5), 1295-1299.

57. LeChevallier, M. W., Norton, W. D., & Lee, R. G. (1991). Occurrence of Giardia and Cryptosporidium spp. in surface water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9), 2610-2616.
58. LeChevallier, M. W., & Norton, W. D. (1995). Giardia and Cryptosporidium in raw and finished water. *Journal-American Water Works Association*, 87(9), 54-68.
59. Franco, R. M. B., Rocha-Eberhardt, R., & Cantusio Neto, R. (2001). Occurrence of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 43(2), 109-111.
60. Neto, R. C., dos Santos, L. U., Sato, M. I. Z., & Franco, R. M. B. (2010). Cryptosporidium spp. and Giardia spp. in surface water supply of Campinas, southeast Brazil. *Water Science and Technology*, 62(1), 217-222.
61. Araújo, R. S., Dropa, M., Fernandes, L. N., Carvalho, T. T., Sato, M. I. Z., Soares, R. M., & Matté, M. H. (2011). Genotypic characterization of Cryptosporidium hominis from water samples in Sao Paulo, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85(5), 834-838.
62. Santos, L. U. D., Cantusio Neto, R., Franco, R. M. B., & Guimarães, J. R. (2011). Detecção de oocistos de Cryptosporidium spp. e cistos de Giardia spp. em amostras de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. *Engenharia Sanitária e Ambiental*.

63. Sato, M. I. Z., Galvani, A. T., Padula, J. A., Nardocci, A. C., de Souza Laretto, M., Razzolini, M. T. P., & Hachich, E. M. (2013). Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. *Science of The Total Environment*, *442*, 389-396.
64. Abramovich, B. L., Gilli, M. I., Haye, M. A., Carrera, E., Lurá, M. C., Nepote, A., & Contini, L. (2001). *Cryptosporidium* y *Giardia* en aguas superficiales. *Rev. argent. microbiol*, *33*(3), 167-176.
65. Dungan, R. S., Klein, M., & Leytem, A. B. (2012). Quantification of bacterial indicators and zoonotic pathogens in dairy wastewater ponds. *Applied and environmental microbiology*, *78*(22), 8089-8095.
66. Alonso, J. L., Amorós, I., & Cañigral, I. (2011). Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage samples. *Applied microbiology and biotechnology*, *89*(4), 1203-1211.
67. Mahbubani, M. H., Schaefer III, F. W., Jones, D. D., & Bej, A. K. (1998). Detection of *Giardia* in environmental waters by immuno-PCR amplification methods. *Current microbiology*, *36*(2), 107-113.

ANEXOS

TABLAS

Tabla 1. Puntos geográficos de toma de muestras de las fuentes de agua de los predios Antisana, Mudadero y Cerro Puntas, localizadas en las cuencas Guayllabamba y Napo, en Ecuador.

Predio	Sitio	Codigo	Par	Tipo de Río	Zona	Latitud	Longitud	Elevación (m)
Antisana	Río Totorá Chupa	An_Pu_1c	1	Control	17M	803634	9945183	3967
Antisana	Río Jatunhuaico	An_Ja_1m	1	Manejo	17M	807092	9944059	3992
Antisana	Acequia del Medio	An_Am_2c	2	Control	17M	813438	9939860	4030
Antisana	San Agustínjucho	An_Sa_2m	2	Manejo	17M	808240	9948211	4146
Antisana	Queb. Alambrada P.Baja	An_Al_3c	3	Control	17M	813291	9940496	4032
Antisana	Río Micahuaico	An-Mi-3m	3	Manejo	17M	811027	9941982	3998
Antisana	Queb. Alambrada P. Alta	An_Al2_4c	4	Control	17M	814266	9941712	4146
Antisana	Río Patugllana	An_Pa_4m	4	Manejo	17M	810984	9943768	4098
Cerro Puntas	Río Aglla Control	CP_Ag_1c	1	Control	17M	809449	9983703	3589
Cerro Puntas	Río Aglla Manejado	CP_Ag_1m	1	Manejo	17M	809774	9983028	3615
Cerro Puntas	Río Igiñaro Control	Cp_Ig_1c	2	Control	17M	810780	9984323	3590
Cerro Puntas	Río Igiñaro Manejado	CP_Ig_1m	2	Manejo	17M	811642	9983803	3578
Mudadero	Río Pita	Mu_Pi_1c	1	Control	17M	790820	9931834	2861
Mudadero	Río Mudadero	Mu_Mu_1m	1	Manejo	17M	793079	9930780	3891
Mudadero	Río Chan	Mu_Cn_2c	2	Control	17M	789718	9933297	3810
Mudadero	Río Carcelén	Mu_Ca_2m	2	Manejo	17M	795753	9931345	3988
Mudadero	Río Chamilco	Mu_Ch_3c	3	Control	17M	790708	9932632	3878
Mudadero	Quebrada Maucatambo	Mu_Ma_3m	3	Manejo	17M	795747	9924844	3838
Mudadero	Quebrada Chigtapamba	Mu_Ci_4c	4	Control	17M	796743	9923511	3771
Mudadero	Río Gualpaloma	Mu_Cu_4m	4	Manejo	17M	794300	9928996	3953
Cuenca del Jatunhuaico								
Antisana	Río Jatunhuaico	An_Ja_1m	1	Intensivo	17M	807092	9944059	3992
Antisana	Jatunhuaico Vertedero 1	An_V1_Int	INT	Intensivo	17M	807389	9944325	3992
Antisana	Jatunhuaico Vertedero 2	An_V2_Int	INT	Intensivo	17M	807257	9945937	4095
Antisana	Jatunhuaico Vertedero 3	An_V3_Int	INT	Intensivo	17M	807239	9946679	4091

Tabla 2. Cebadores y sondas empleadas para la investigación de *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium* spp por los métodos moleculares qPCR y PCR anidada.

Parásito	Gen blanco	Primer Forward, Reverse y Sonda	Secuencias
<i>Giardia intestinalis</i>	β - Giardin (74 bp)	β -Giardin P241F ¹	5´ - CAT CCG CGA GGA GGT CAA - 3´
		β -Giardin P241R ¹	5´ - GCA GCC ATG GTG TCG ATC T - 3´
		Glamb Probe ¹	5´ - 6 - FAM - AAG TCC GCC GAC AAC ATG TAC CTA ACG A - 3´
<i>Cryptosporidium</i> spp	18S rRNA (157 bp)	JVAF ²	5´ - ATG ACG GGT AAC GGG GAA T - 3´
		JVAR ²	5´ - CCA ATT ACA AAA CCA AAA AGT CC - 3
		JVAP18S Probe ²	5´ - VIC - 5´ - CGC GCC TGC TGC CTT CCT TAG ATG - 3´
<i>Cryptosporidium</i> spp	COWP (550 bp)	Cry-15 ³	5'-GTAGATAATGGAAGAGATTGT G-3'
		Cry-9 ³	5'-GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG-3'
	COWP (311 bp)	cowpnestF1 ³	5'-TGTGTTCAATCAGACACAGC-3'
		cowpnestR2 ³	5'-TCTGTATATCCTGGTGGGC-3'

¹ Guy *et al.*, 2003 [26].

² Jothikumar *et al.*, [27].

³ Jae-Ran *et al.*, 2009, [28].

Tabla 3. Análisis in-silico (Primer-BLAST) de los cebadores empleados en la detección de *Cryptosporidium* spp.

Cebador	Secuencia (5'->3')	Longitud	Tm	GC%	Auto Complementariedad	Auto 3' complementariedad
JVAF	ATGACGGGTAACG GGGAAT	19	58.39	52.63	3.00	2.00
JVAR	CCAATTACAAAAC CAAAAAGTCC	23	55.15	34.78	4.00	0.00
cowpnest F	TGTGTTCAATCAG ACACAGC	20	56.29	45.00	7.00	3.00
cowpnest R	TCTGTATATCCTG GTGGGC	19	55.54	52.63	4.00	2.00

Productos en secuencias objetivo

>[XM_661099.1](#) *Cryptosporidium hominis* TU502 oocyst EB module wall protein (Chro.60244) partial mRNA

Longitud del producto = 314
 Cebador directo 1 = TGTGTTCAATCAGACACAGC 20
 AND molde = 502 521
 Cebador reverso |1 TCTGTATATCCTGGTGGGC 19
 AND molde 815 797

>[XM_627569.1](#) *Cryptosporidium parvum* Iowa II CpCOWP1, oocyst wall protein with type I and type II cysteine-rich repeats (cgd6_2090) mRNA, partial cds

Longitud del producto = 314
 Cebador directo 1 = TGTGTTCAATCAGACACAGC 20
 ADN molde = 520 539
 Cebador reverso 1 = TCTGTATATCCTGGTGGGC 19
 ADN molde = 833 815

Tabla 4. Análisis in-silico (Primer-BLAST) de los cebadores empleados en la detección de *Giardia intestinalis*.

Cebador	Secuencia (5'->3')	Longitud	Tm	GC%	Auto Complementariedad	Auto 3' Complementariedad
β-Giardin P241F	CATCCGCGAGG AGGTCAA	18	59.11	61.11	6.00	0.00
β-Giardin P241R	GCAGCCATGGT GTCGATCT	19	60.15	57.89	6.00	2.00

Productos en secuencias objetivo

>XM_001705374.1 Giardia lamblia ATCC 50803 Hypothetical protein (GL50803_32265) mRNA, complete cds

Longitud del producto = 75
 Cebador directo 1 CATCCGCGAGGAGGTCAA 18
 AND molde 297 280

Cebador reverso 1 GCAGCCATGGTGTCGATCT 19
 AND molde 223 241

>XM_001705373.1 Giardia lamblia ATCC 50803 Beta-giardin (GL50803_4812) mRNA, complete cds

Longitud del producto = 75
 Cebador directo 1 CATCCGCGAGGAGGTCAA 18
 AND molde 261 278

Reverse primer 1 GCAGCCATGGTGTCGATCT 19
 AND molde 335 317

Tabla 3. Cuantificación de *E. coli* (UFC/50 ml) en las fuentes de agua de los predios: Antisana, Mudadero y Cerro Puntas, de las cuencas: Guayllabamba y Napo, en Ecuador.

Predio	Código de Muestra	Tipo de Río	Concentración <i>E. coli</i> (UFC/50 ml)	
			Mayo-2014	Agosto-2015
Antisana	AN-V1-INT	Río Jatunhuaico	10	4
	AN-V2-INT		0	0
	AN-V3-INT		2	0
	AN-PU-1C	Ríos de control	5	32
	AN-AM-2C		2	2
	AN-AL-3C		26	3
	AN-AL2-4C		31	2
	AN-JA-1M	Ríos de manejo	5	5
	AN-PA-2M		4	2
	AN-MI-3M		2	2
	AN-SA-4M		3	1
Mudadero	MU-PI-1C	Ríos de control	10	NE
	MU-CN-2C		11	NE
	MU-CH-3C		6	NE
	MU-CI-4C		5	NE
	MU-MU-1M	Ríos de manejo	2	NE
	MU-GU-2M		8	NE
	MU-CA-3M		0	NE
	MU-MA-4M		5	NE
Cerro Puntas	CP-IG-1C	Ríos de control	5	4
	CP-AG-1C		8	9
	CP-IG-1M	Ríos de manejo	0	7
	CP-AG-1M		2	6

NE= No evaluado, debido a la prohibición de entrada al predio Mudadero (Parque Nacional Cotopaxi) por riesgo de erupción del volcán Cotopaxi.

Tabla 4. Concentración de *E. coli* (UFC/ 50 ml) y su correlación con parámetros ambientales de los ríos evaluados en los predios: Antisana, Mudadero y Cerro Puntas.

Fecha de recolección	Variables	Correlación de Pearson (r)	Valor (p)
Mayo 2014	Ancho del Río (m)	0,5374	0,0145*
Agosto 2015	Temperatura (°C)	0,6651	0,0183*
	Oxígeno Disuelto (mg/L)	-0,536	0,0725
	Amonio (µg/L)	0,6338	0,0915
	Solidos Suspendidos mg/L	0,5713	0,0523
	Coliformes (UFC/1ml)	0,9845	< 0,0001*

* Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

Tabla 5. Temperaturas de fusión del ADN en un sistema qPCR con cebadores específicos para la detección de *Giardia intestinalis* en fuentes de agua de predios: Antisana, Mudadero y Cerro Puntas.

Código	Tipo de Río	Temperatura de Fusión (Tm) (°C)	Presencia de <i>Giardia intestinalis</i>	Nº quistes/µl de ADN	Nº quistes/L de agua
E	-	81.0	positivo	45	-
E-1	-	81.0	positivo	4,5	-
E-2	-	81.0	positivo	0,45	-
E-3	-	81.0	positivo	0,045	-
CRC-SP	Río San Pedro	89.0	negativo	0	0
AN-V1-INT	Río Jatunhuaico	88.5	negativo	0	0
AN-V2-INT		89.0	negativo	0	0
AN-V3-INT		88.0	negativo	0	0
AN-PU-1C	Ríos control Antisana	90.5	negativo	0	0
AN-AM-2C		88.5	negativo	0	0
AN-AL-3C		89.0	negativo	0	0
AN-AL2-4C		89.0	negativo	0	0
AN-JA-1M	Ríos manejo Antisana	89.0	negativo	0	0
AN-PA-2M		89.0	negativo	0	0
AN-MI-3M		89.5	negativo	0	0
AN-SA-4M		89.0	negativo	0	0
MU-PI-1C	Ríos control Mudadero	N/A	negativo	0	0
MU-CN-2C		89.0	negativo	0	0
MU-CH-3C		N/A	negativo	0	0
MU-CI-4C		89.0	negativo	0	0
MU-MU-1M	Ríos manejo Mudadero	N/A	negativo	0	0
MU-GU-2M		N/A	negativo	0	0
MU-CA-3M		89.5	negativo	0	0
MU-MA-4M		89.0	negativo	0	0
CP-IG-1C	Ríos control Cerro Puntas	N/A	negativo	0	0
CP-AG-1C		N/A	negativo	0	0
CP-IG-1M	Ríos manejo Cerro Puntas	N/A	negativo	0	0
CP-AG-1M		88.0	negativo	0	0

AN: Antisana

MU: Mudadero

CP: Cerro Puntas

N/A: No amplifica

Tabla 6. Detección y cuantificación por qPCR (TaqMan) del número de copias del gen β -Giardin y el número de quistes de *Giardia intestinalis* en los controles positivos.

Código	Tipo de muestra	Concentración ADN	<i>G. intestinalis</i>	Valor Ct	Copias del gen (SQ)	N° quistes/ μ l de ADN
E	Estándar	10 ng/ μ l	Positivo	28,32	1.000	45
E ⁻¹	Estándar	1 ng/ μ l	Positivo	30,77	0.100	4,5
E ⁻²	Estándar	0.1 ng/ μ l	Positivo	32,49	0.010	0,45
E ⁻³	Estándar	0.01 ng/ μ l	Positivo	36,24	0.001	0,045
E ⁻⁴	Estándar	1 pg/ μ l	Positivo	37,52	0,0001	0,0045
CPP	Control de prueba	10 ng/ μ l	Positivo	33,02	0.011	0,47
SP	Control río contaminado	10 ng/ μ l	Negativo	N/A	-	-

E - E⁻⁴: Estándares; diluciones en serie (1:10) del Control Positivo de *Giardia intestinalis*

CPP: Control de prueba; muestra positiva de *Giardia intestinalis*

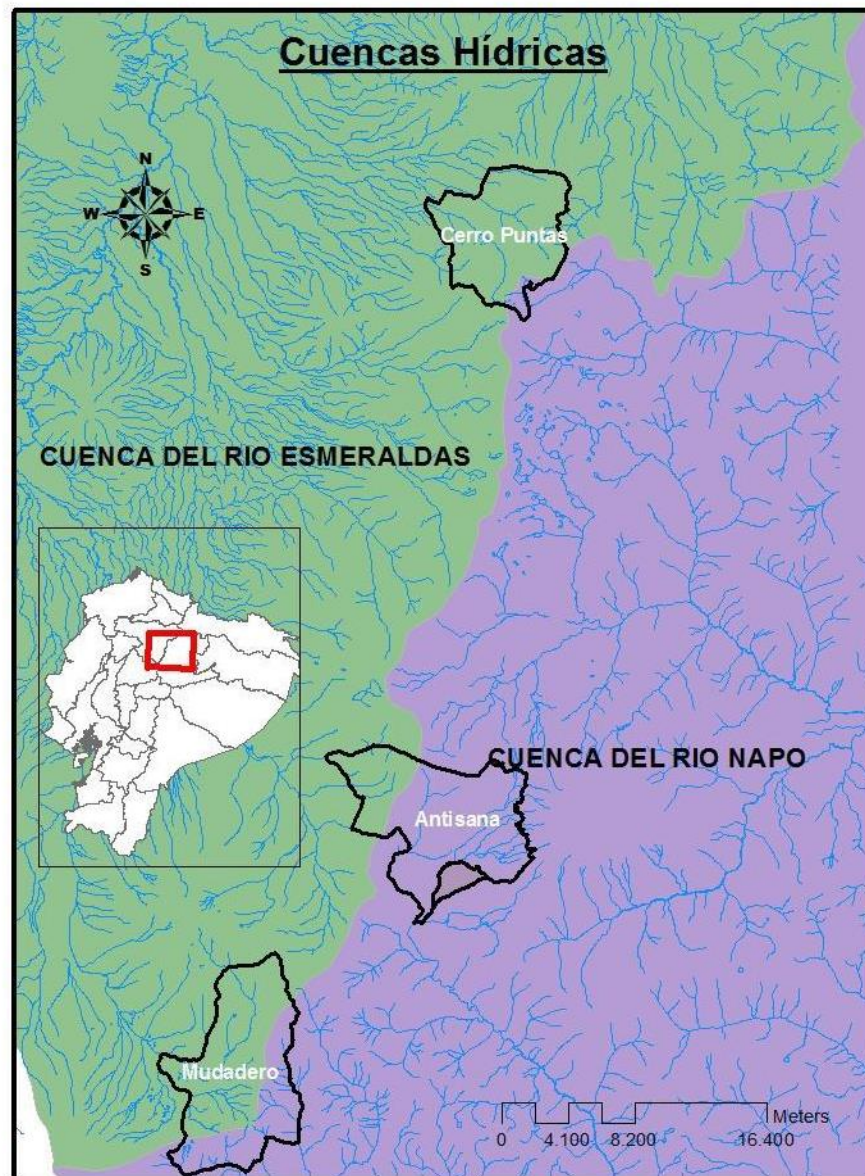
SP: Control de río contaminado; muestra de ADN de agua del río San Pedro

Ct: Valor umbral en que comienza la amplificación logarítmica del ADN de una muestra.

SQ: Cuantificación de la amplificación del ADN

NA: No amplifica

FIGURAS



SINAGAP. (2014). Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca. Recuperado el Junio de 2014, de <http://geoportal.magap.gob.ec/inventario.html>

Figura 1. Mapa general de todas las zonas de interés del FONAG/EPMAPS (Fuente: Encalada *et al.* 2014). Áreas delineadas en negro muestran, de norte a sur, las zonas de estudio en: Cerro Puntas, Antisana y Mudadero.

A.



B.



C.

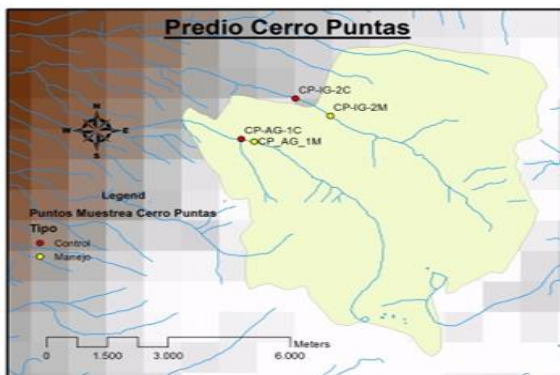


Figura 2. Mapas de las zonas de investigación: A. Antisana y Jatunhuaico. B. Mudadero; C. Cerro Puntas. Puntos rojos se refieren a los ríos control sin intervención; puntos amarillos se refieren a los ríos manejo donde el FONAG realiza acciones de manejo de ríos; y, puntos azules, se refieren a puntos de muestreo del río Jatunhuaico ubicados en un gradiente de elevación.

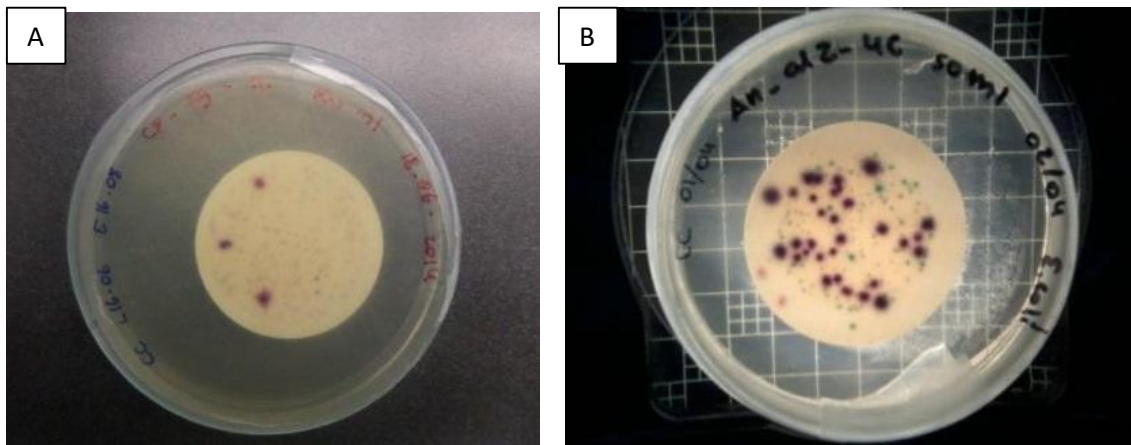


Figura 3. Cuantificación de *E. coli* (colonias moradas) con la técnica de filtración en membrana a partir de muestras de agua de riachuelos. Diferencias en la concentración de *E. coli* (UFC/50 ml). **A.** Quebrada Iguañaro (Sitio control de Cerro puntas) y **B.** Quebrada Alabrada Parte Alta (Sitio Control de Antisana).

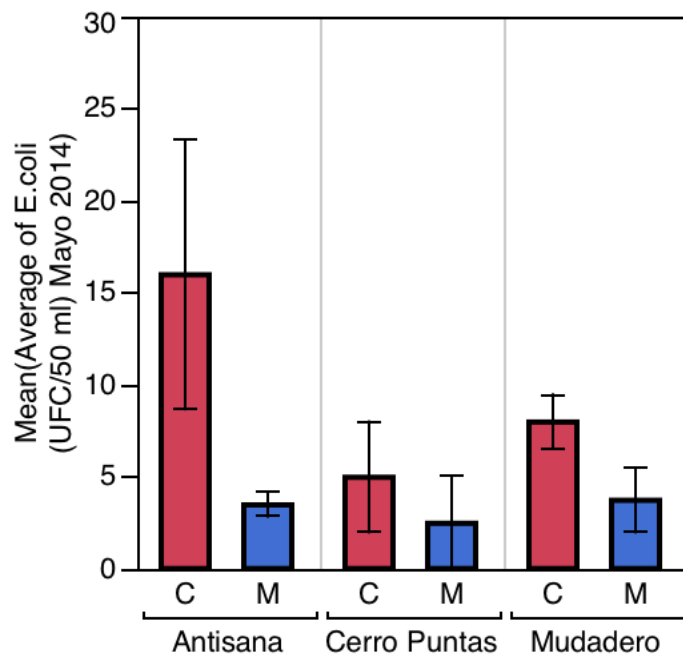


Figura 4. Variación en la concentración del indicador fecal (*E. coli*) por predio: Antisana, Cerro Puntas y Mudadero; y por tipo de río: C: Control, M: Manejo. Las barras indican error estándar.

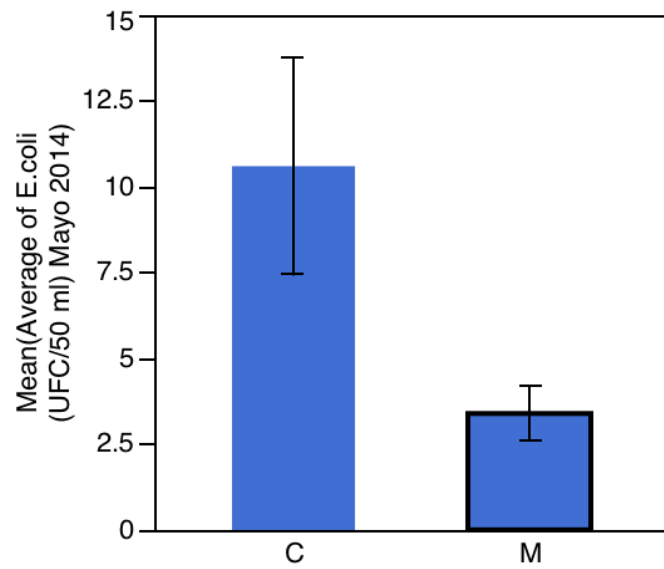


Figura 5. Concentración del Indicador fecal (*E. coli*) y su variación por tipo de ríos C: Control y M: Manejo. Las barras indican error estándar

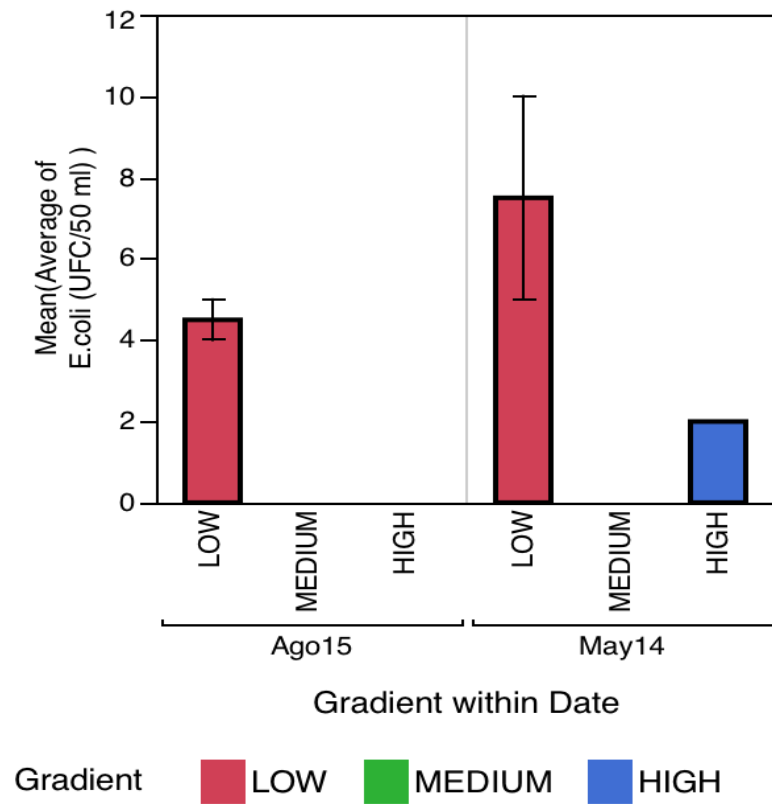


Figura 6. Variación en la concentración del indicador *E. coli* en el río Jatunhuaico de acuerdo al gradiente de elevación: HIGH: Mayor elevación, MEDIUM: elevación media, LOW: Menor elevación y por fecha de muestreo: Agosto de 2015 y Mayo de 2014.

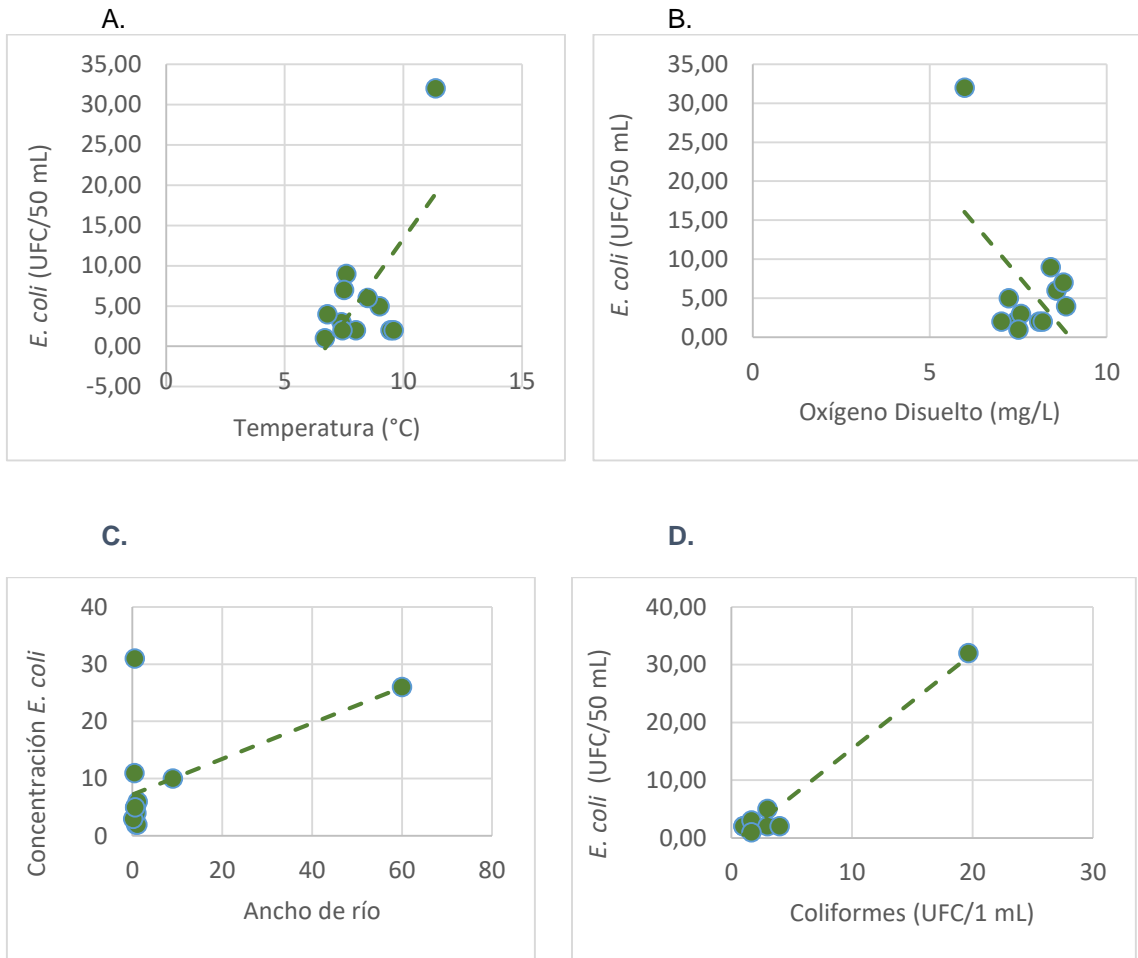


Figura 7. Correlaciones significativas entre la concentración de *E. coli* (UFC/ 50 ml) y parámetros ambientales de los ríos en las localidades de Antisana, Mudadero y Cerro Puntas. A= Correlación entre *E. coli* (UFC/50mL) y la temperatura del agua en los ríos de Antisana y Cerro Puntas. B= Correlación entre *E. coli* (UFC/50mL) y el Oxígeno disuelto (mg/L) en los ríos de Antisana y Cerro Puntas. C= Correlación entre *E. coli* (UFC/50mL) y el Índice de calidad de hábitat fluvial (IHF) en los ríos de Antisana y Cerro Puntas. D= Correlación entre *E. coli* (UFC/50mL) y la Concentración de coliformes totales (UFC/1 mL) en los ríos de Antisana.

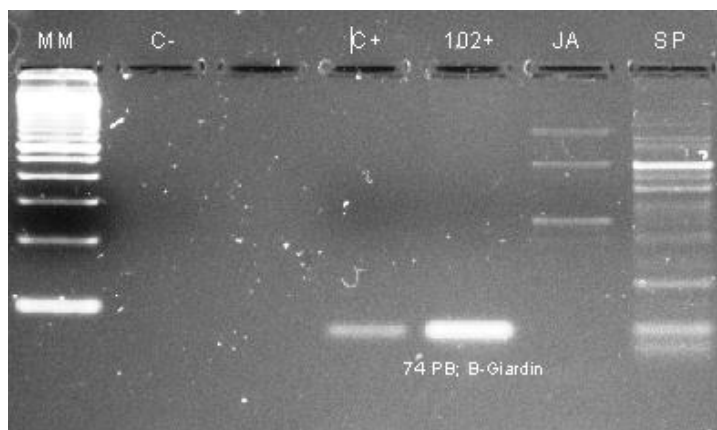


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. Amplificación del gen β Giardin (74 pb) de *Giardia intestinalis* por PCR punto final. Marcador de peso de 100 pb (MM); C- = Control Negativo; C+ = Control Positivo de Prueba; 102+ = Control Positivo; JA= Río Jatunhuaico; SP= San Pedro.

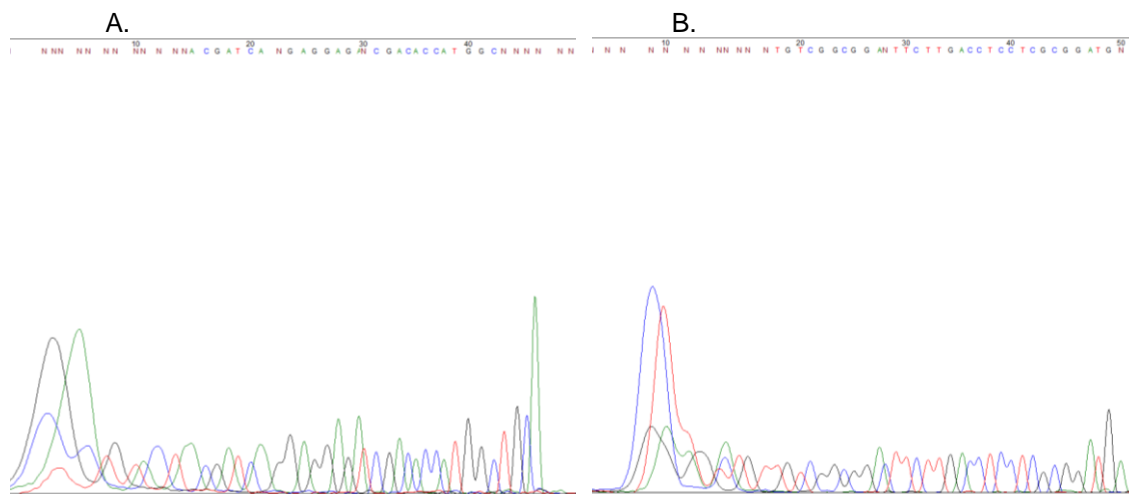


Figura 9. Cromatograma de las secuencias obtenidas por el método de Secuenciación Sanger de los productos de amplificación para el gen β -Gardin de *Giardia intestinalis* en una muestra del río San Pedro con los cebadores A= P241F y B= P241.

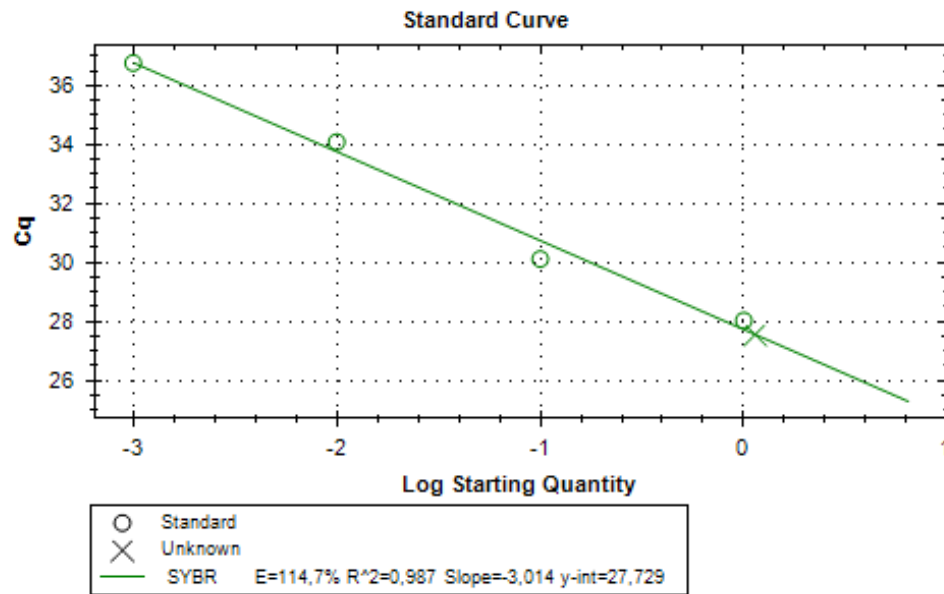


Figura 10. Curva estándar de los controles y muestras de ADN de fuentes de agua para la detección de *Giardia intestinalis* por qPCR.

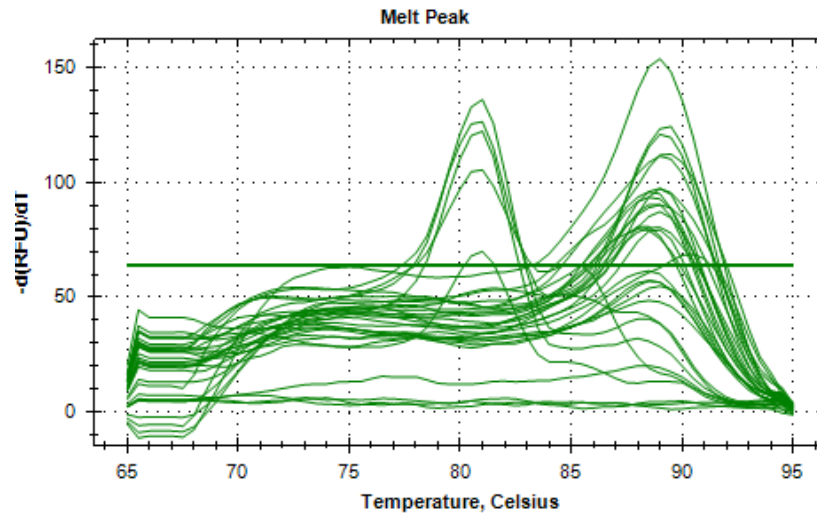


Figura 11. Curva de temperaturas de fusión (T_m) de controles y de ADN de fuentes de agua, para la detección de *Giardia intestinalis* por qPCR. Se muestran dos picos de T_m : el primero, a menor temperatura (81°C), del control positivo de *Giardia intestinalis*, y otro, a mayor temperatura (89°C), correspondiente a las muestras de ADN de fuentes de agua.

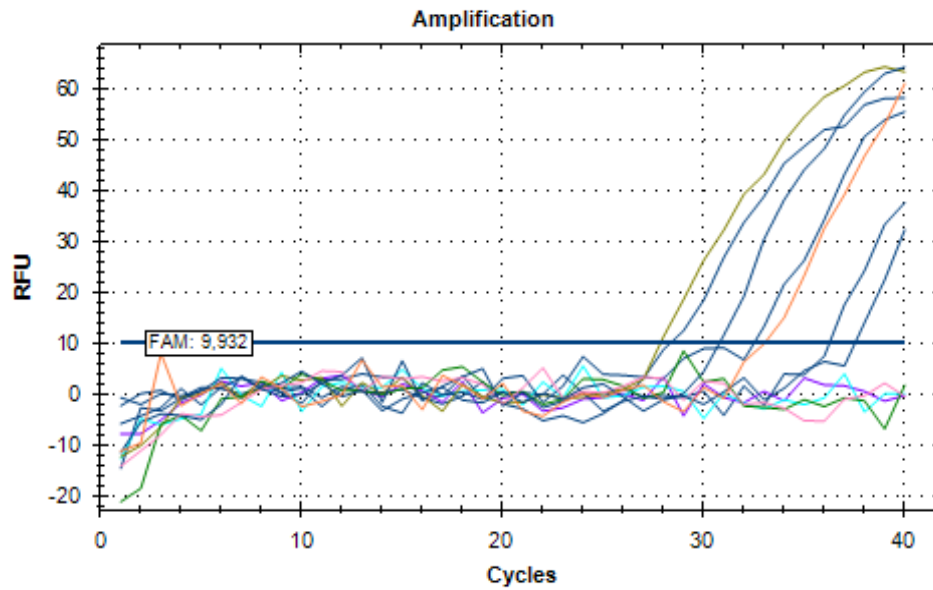


Figura 12. Curva de Amplificación en escala lineal de controles y de ADN de fuentes de agua, para la detección de *Giardia intestinalis* por qPCR con sonda TaqMan. En verde: Control Positivo de *Giardia intestinalis*. En azul de izquierda a derecha: Dilución 10⁰, dilución 10⁻¹, dilución 10⁻², dilución 10⁻³, dilución 10⁻⁴. En naranja: Control de prueba, positivo por ELISA para *Giardia intestinalis*.

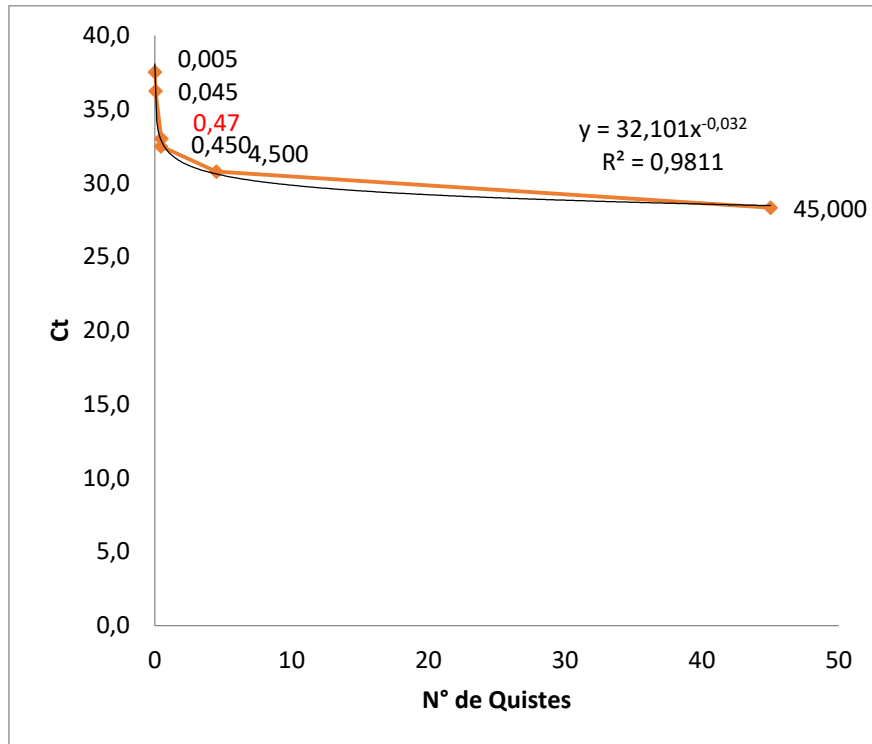


Figura 13. Cuantificación del número de quistes de *Giardia intestinalis* en los estándares del control positivo y en el control de prueba positivo, amplificados por qPCR con sonda TaqMan.

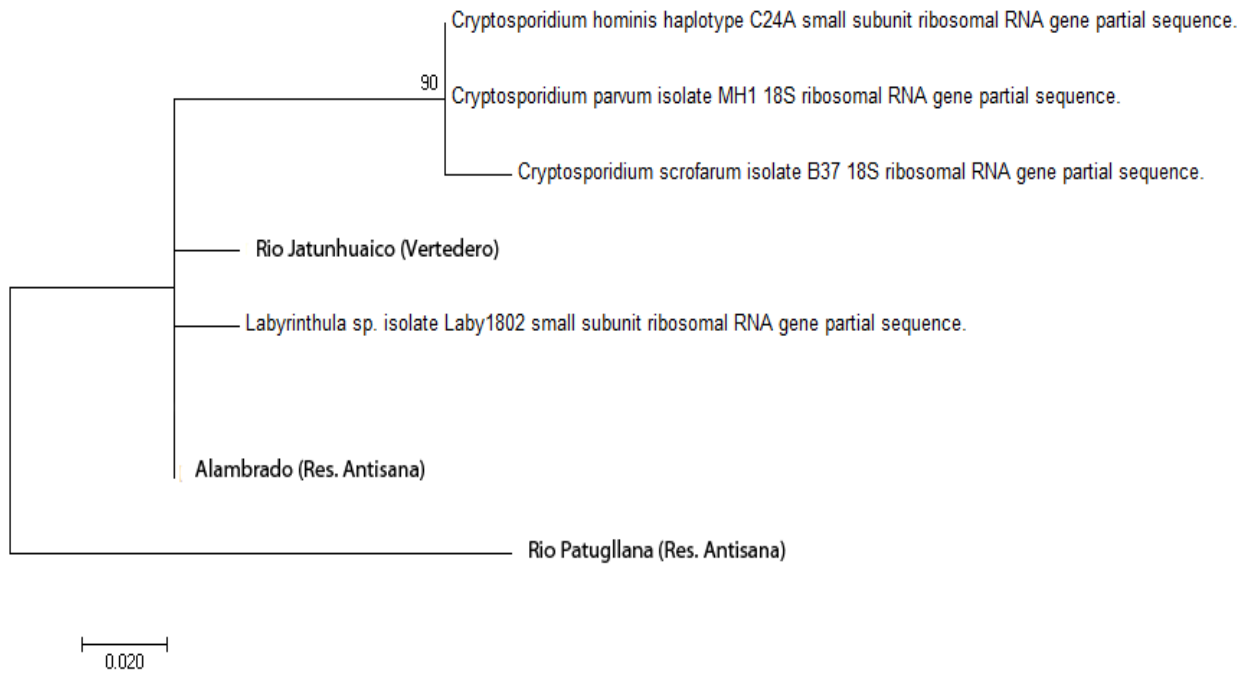


Figura 14. Árbol filogenético (Neighbor Joining, Mega 7) de las secuencias de ADN amplificadas por PCR de las fuentes de agua: Quebrada Alambrado, río Jatunhuaico y río Patugllana; y, secuencias obtenidas del GenBank.

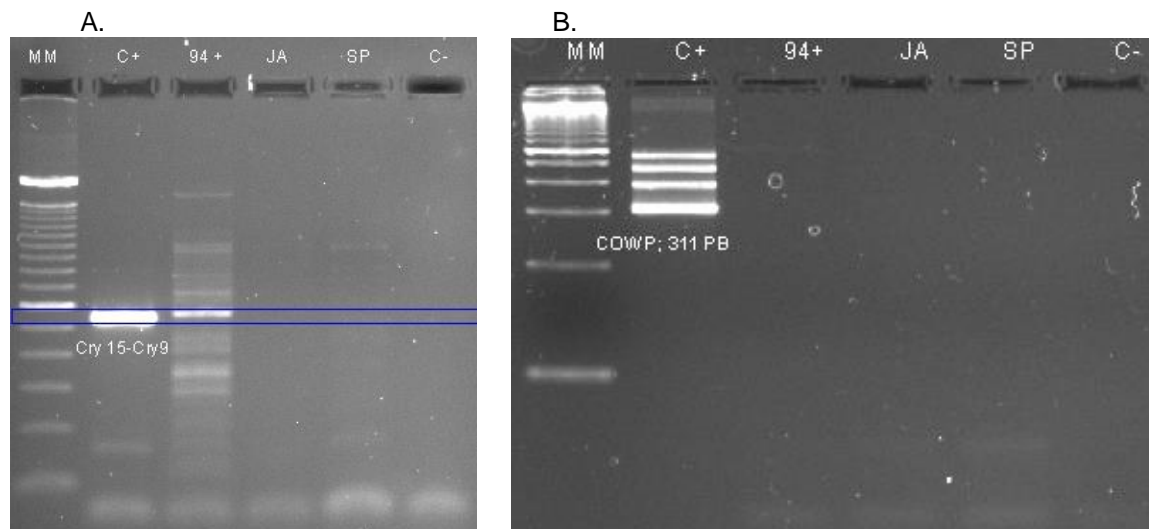


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. a) Ensayo de pre-anidación, para la amplificación de un segmento del gen COWP (550 pb) y b) Ensayo de anidación, para la amplificación de un segmento del gen COWP (311 pb) de *Cryptosporidium* spp, por PCR anidada. Marcador de peso de 100 pb (MM); Control Negativo (C-); Control Positivo (C+); Control de prueba (94+); Río Jatunhuaico (JA); Río San Pedro (SP).

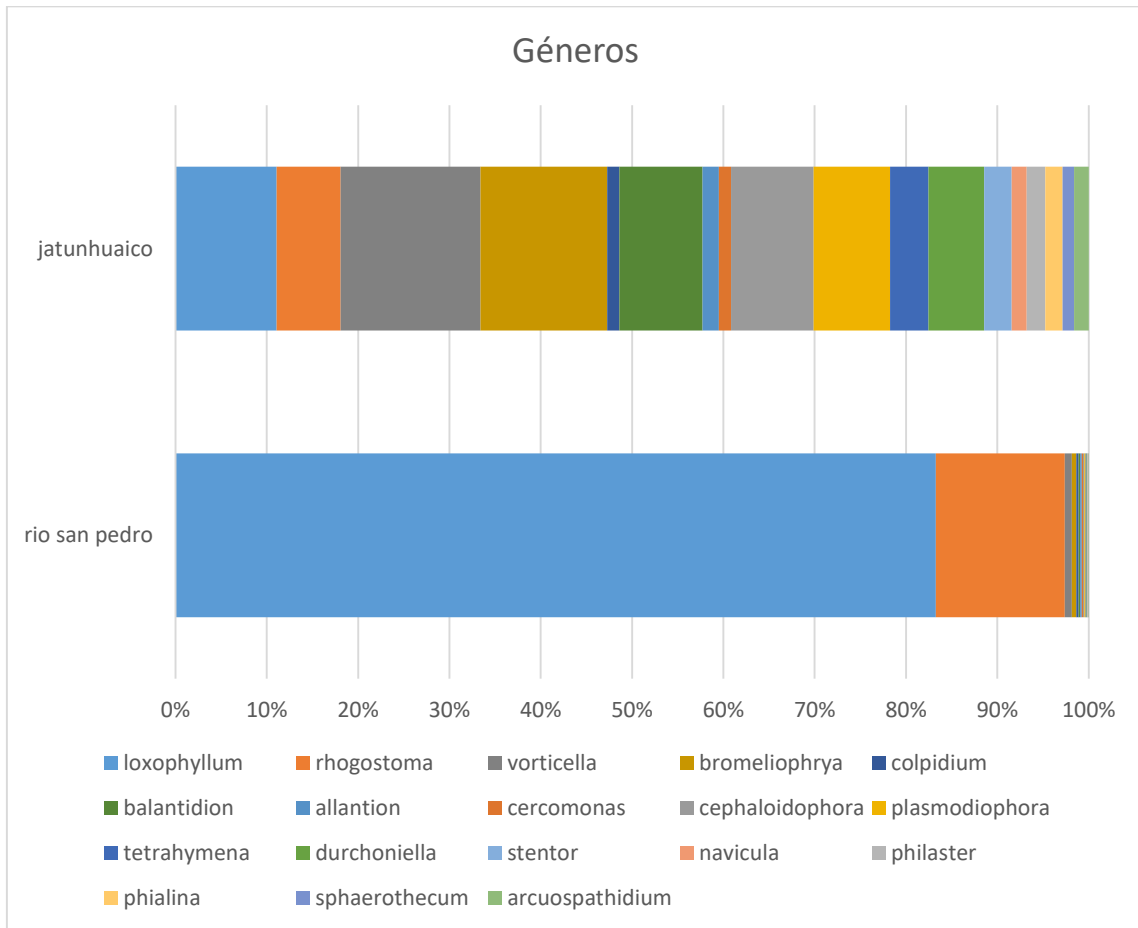


Figura 16. Diversidad y frecuencia de OTUs de los ríos Jatunhuaico y San Pedro agrupados por taxón Género, basado en el porcentaje de identidad (97%) a secuencias de referencia de NCBI.

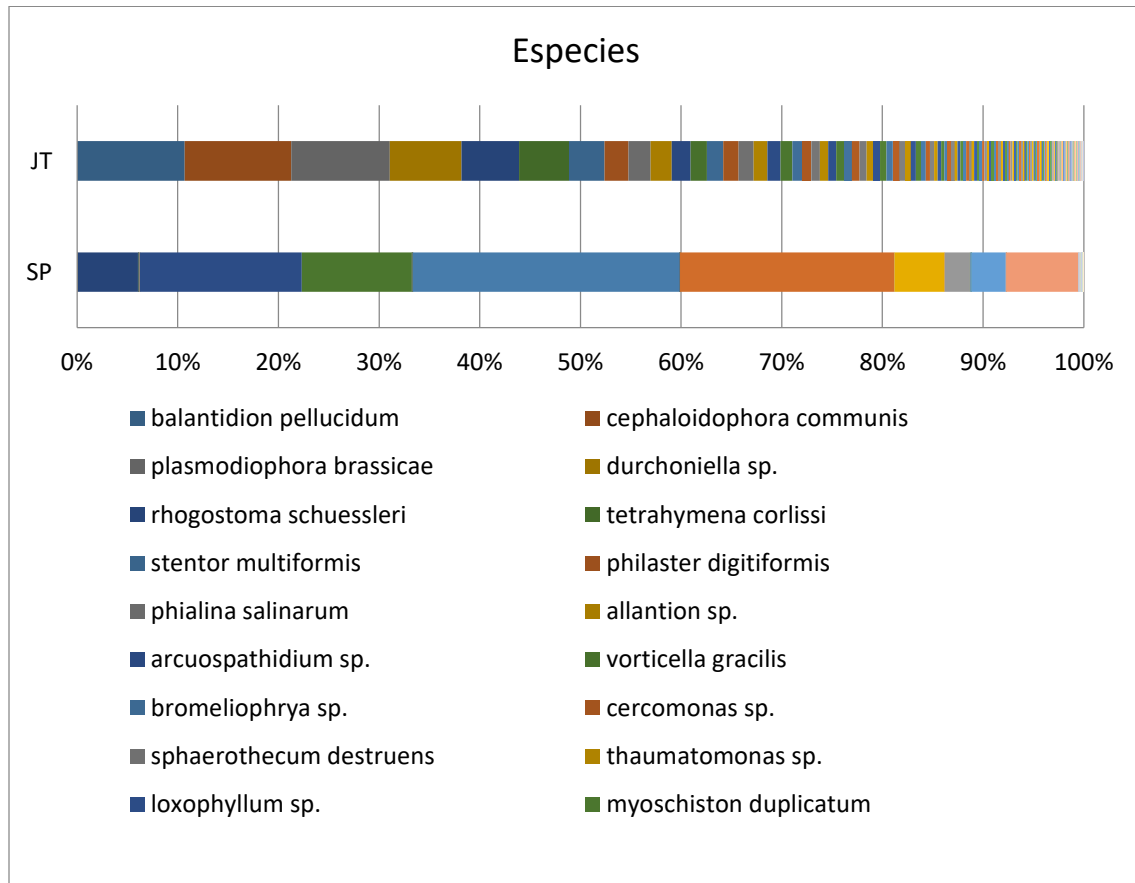


Figura 17. Diversidad y frecuencia de OTUs de los ríos Jatunhuaico y San Pedro agrupados por taxón Especies, basado en el porcentaje de identidad (97%) a secuencias de referencia de NCBI.

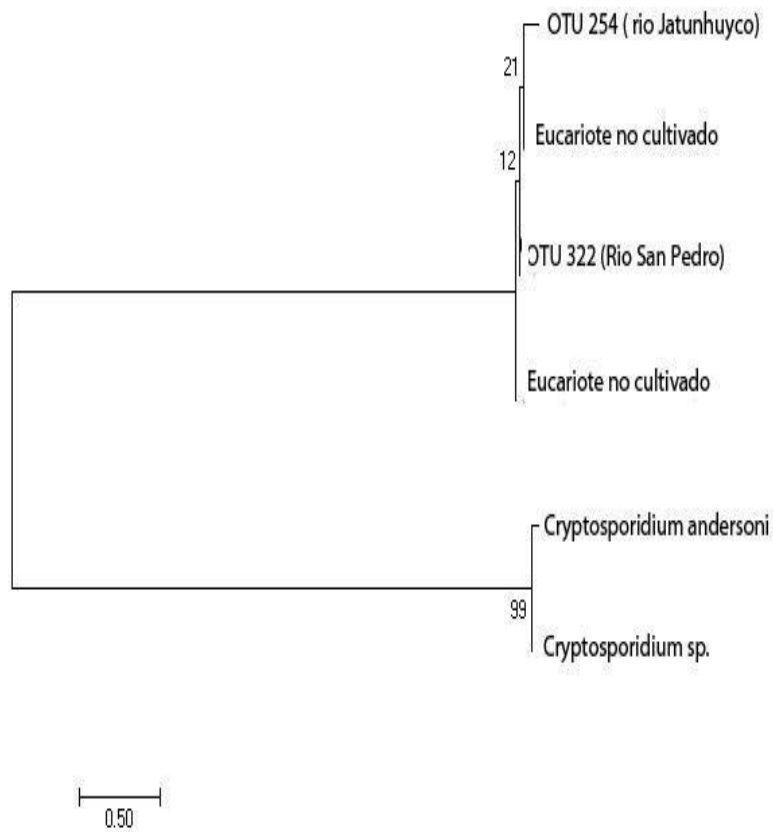


Figura 18. Árbol filogenético (Neighbor Joining, Mega 7) de las secuencias de ADN de las fuentes de agua: río Jatunhuaico y río San Pedro obtenidas por secuenciación masiva del gen 18S rRNA en la plataforma de secuenciación MiSeq (ILLUMINA), y secuencias de *Cryptosporidium* spp obtenidas del GenBank. El número en el nodo indica el valor de bootstrap.