

DIVERSIDAD MICROBIANA PRESENTE EN AGUA RESIDUAL PROVENIENTE DE INDUSTRIA ATUNERA

REVISTA
ESPAMCIENCIA

MICROBIAL DIVERSITY PRESENT IN WASTEWATER FROM THE TUNA INDUSTRY

Pincay Cantos, María Fernanda

María Fernanda Pincay Cantos

maria.pincay@espam.edu.ec

Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí
Manuel Félix López, Ecuador

Revista ESPAMCIENCIA

Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ecuador

ISSN: 1390-8103

Periodicidad: Semestral

vol. 13, núm. 1, 2022

revista@espam.edu.ec

Recepción: 06 Enero 2022

Aprobación: 30 Junio 2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/527/5274203009/>

DOI: https://doi.org/10.51260/revista_espamciencia.v13i1.312



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.

Resumen: Se realizó un estudio para identificar la diversidad microbiana en aguas residuales proveniente de la industria atunera, las muestras se obtuvieron en diferentes puntos del proceso del atún, el análisis se lo realizó por medio de herramientas moleculares como es la metagenómica, la técnica de Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE) y de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la sensibilidad de estas técnicas permitió la amplificación de fragmentos del gen 16S rDNA por medio de cebadores específicos este producto de PCR amplificado se envió a secuenciar, siendo la secuenciación una alternativa valiosa para proporcionar información sobre la identidad de la población microbiana, logrando caracterizar la estructura de un ambiente, obteniendo 37 clones bacterianos con un 27,0 % perteneciente al grupo Firmicutes, 24,34% a las Proteobacterias, 16,21 % a las Actinobacterias.

Palabras clave: ambiente, β -galactosidasa, caracterización, contaminantes.

Abstract: A study was carried out to identify the microbial diversity in wastewater from the tuna industry, the samples were obtained at different points in the tuna process, the analysis was carried out using molecular tools such as metagenomics, the Electrophoresis technique in Denaturation Gradient Gel (DGGE) and Polymerase Chain Reaction (PCR). The sensitivity of these techniques allowed the amplification of 16S rDNA gene fragments by means of specific primers. This amplified PCR product was sent for sequencing, becoming a valuable alternative to provide information on the identity of the microbial population, characterizing the structure of an environment, obtaining 37 bacterial clones with 27.0% belonging to the Firmicutes group, 24.34% to Proteobacteria, 16, 21% to Actinobacteria.

Keywords: β -galactosidase, characterization, contaminants.

INTRODUCCIÓN

La FAO (2020) indica que más de 80 estados se dedican a la pesca de atún, donde miles de buques operan en todos los océanos desarrollando la capacidad de pesca del producto debido al gran crecimiento de la demanda

del mismo. La industria atunera se ha convertido en un punto clave para estos mercados ya que ha tenido un crecimiento sostenido durante los últimos años (García, 2018).

Más allá de la generación de empleo y el crecimiento económico relacionado con las industrias de conservas de pescado y marinas, este sector produce grandes cantidades de desechos que necesitan un mayor tratamiento. Estos efluentes se caracterizan principalmente por flujos abundantes con altas cargas orgánicas además de altas concentraciones salinas (Palmeiro-Sánchez & Campos, 2021), siendo difícil gestionar los efluentes de las conservas de pescado, ya que son estacionales con una alta fluctuación de materia orgánica.

Las metodologías más empleadas para remediar estas aguas residuales se clasifican en tecnologías biológicas aerobias y anaerobias; las cuales han demostrado reducir altos niveles de materia orgánica disuelta (López-Anchundia et al., 2019). Los tratamientos anaeróbicos presentan sustanciales ventajas para las plantas procesadoras de productos del mar. Los menores costos operativos, la producción de metano (biogás) y la baja generación de lodos son los puntos que resaltan la digestión anaerobia (Grando et al., 2017).

Estudiar los mecanismos que generan y subyacen a la biodiversidad microbiana es clave para predecir la respuesta de los ecosistemas a los cambios ambientales, los microorganismos en las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) son esenciales para la purificación del agua a fin de proteger la salud pública y ambiental (Wu et al., 2019).

Los nuevos métodos moleculares que utilizan técnicas metagenómicas permiten a los investigadores caracterizar los microorganismos que se encuentran en las aguas residuales mediante la extracción del ADN total que incluye el material genético de los microorganismos que no se pueden cultivar (Hendriksen et al., 2019).

La metagenómica se refiere a la secuenciación aleatoria "escopeta" del ADN microbiano, sin seleccionar ningún gen en particular (Scholz et al., 2016), pudiendo proporcionar información adicional sobre la presencia de especies bacterianas, patógenos y genes de virulencia, y los datos pueden volver a analizarse si se identifican nuevos genes de interés (Hendriksen et al., 2019).

El objetivo del presente estudio es identificar la diversidad microbiana en aguas residuales proveniente de la industria atunera, estableciendo una base de datos de bacterias presentes en este tipo de aguas por medio de técnicas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La industria en estudio está localizada en la vía Manta-Montecristi a la altura del km 8 ½, parroquia Colorado, cantón Montecristi, provincia de Manabí (Figura 1). La empresa está ubicada en un sector altamente industrial y en pleno desarrollo. Las coordenadas de ubicación en UTM del Proyecto son las siguientes:

CUADRO 1.
Ubicación geográfica general de las instalaciones

Punto	Este	Norte
1	535771	9886775
2	535679	9886679
3	535483	9886704
4	535330	9886448



FIGURA 1
Ubicación de la atunera en estudio (Montecristi, Ecuador)

Caracterización molecular

Para la caracterización molecular se tomaron muestras en varios puntos del proceso de la fábrica de conservas de pescado, agua de pozo (M1), agua de osmosis (M2), agua residual sin tratar (M3), tratamiento bacteriano (M4), agua residual tratada (M5).

Para la extracción de ADN se enriquecieron las muestras de aguas residuales en un medio de cultivo LB Caldo por 24 horas a 37°C. Los enfoques moleculares más ampliamente empleados para estudiar la estructura de la comunidad microbiana se empiezan con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la caracterización molecular se realizó por medio de electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE), para lo cual se extrajo el ADN bacteriano por medio del UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio laboratories Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente se efectuó una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de la región V3 de la secuencia del ADNr 16s (Bentacurt et al., 2018). La DGGE se ejecutó en un gradiente de desnaturalización del 10% al 80% para los análisis de los índices ecológicos y del 20% al 60% para la extracción de bandas, purificación, amplificación y posterior secuenciación e identificación de las cepas presentes en las muestras.

Amplificación del gen ADNr 16S

El 16S sigue siendo el objetivo estable más utilizado para la identificación bacteriana y los estudios de evolución genética, porque otros genes altamente conservados no se han estudiado tan a fondo (Deirdre et al., 2020). La amplificación del gen ADNr 16s se la realizó en dos fases mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Callahan et al., 2019), en la primera fase se utilizaron partidores universales para el dominio bacterias, 907r (926r) y P3(341f) (Cuadro 2).

El mix de PCR fue realizado en un volumen total de 50 µl, los cuales contenían 25 µl SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (TAHARA BIO INC.), 2 µl de los partidores 907r (926r a una concentración de 0,10µM) y 2 µl de P3 (341f a una concentración de 0,10µM), 4µl de DNA templado y 17 µl con agua DEPC (Dietilpirocarbonato).

La PCR consistió en una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos; luego 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 55,6°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 90 segundos y finalmente una extensión final a 72°C por 10 minutos (Callahan et al., 2019; Shin et al., 2020; Zhu et al., 2020). El segundo paso consistió en una PCR anidada de la región V3 del gen 16S del ADNr; para esto se usó los partidores P3 (341f) y P2 (534r) y el ADN templado de la PCR del 907. El partidador P3 contiene 40 bases de GC los cuales ayudan a la disgregación en el análisis de DGGE.

CUADRO 2.
Secuencia de partidores y tamaño esperado de los productos de PCR de la amplificación del gen 16S rDNA y región V3 del mismo gen.

Partidores	Secuencia	Tamaño	Referencia
907r	5'-AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3'	926 pb	Muyzer et al., 1995
P3	5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'		
P3	5'-40 GC+TAG GGG AGG CAG CAG-3'	193 pb	Wang et al., 2008
P2	5'-ATT ACC GCG GCT GG-3'		

Electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE)

Los productos de amplificación de PCR del dominio bacteria con el partidor 907r se sometieron a una electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE), estos sirvieron para separar las diferentes bandas OTU's (Unidades Operacionales Taxonómicas) existentes en las muestras de los diferentes ensayos; el gel contenía un gradiente de denaturación del 10% al 60% preparado con las soluciones stock.

Para formar el gradiente se preparó un gel usando 15 ml de cada solución stock, para la polimerización de la acrilamida se usó 130 µl de per sulfato de amonio (BioRad®) al 10% y 13 µl de N'-Tetra-metil-etilendiamina [TEMED] (BioRad®), el gradiente vertical se obtuvo utilizando el formador de gradiente de proporcionado por el fabricante del equipo para DGGE (C.B.S Scientific Company®) siguiendo las indicaciones. Se cargó las muestras de la PCR de los partidores (907r-P3f) para lo cual se usó 15 µl de los productos de la amplificación, mezclado con 3 µl buffer de carga (Blue 6x Bio Labs Inc.) en una proporción 3:1, esta mezcla se cargó en el gel por medio de una jeringa Hamilton.

CUADRO 3.
Preparación de las soluciones stock de DGGE

	10%	20%	60%	80%
Acrilamida	18,8	18,8	18,8	18,8
Bis 30%	ml	ml	ml	ml
TAE 50x	2	2	2	2
	ml	ml	ml	ml
Formamida	4ml	8	24	32
	ml	ml	ml	ml
Urea	4,2	8,4	25,2	33,6
	g	g	g	ml

Para el análisis de la región v3 del ADNr 16s se prepararon geles con una concentración de agente denaturante del 20% al 80%. (Tabla 3). Para esto se usó 15 ml de cada solución stock para la formación del gradiente.

La polimerización de la poliacrilamida se logró agregando 130 µl de persulfato de amonio (BioRad®) 10% y 13 µl de N'-Tetra-metil-etilendiamina (TEMED) (BioRad®), el gradiente vertical se obtuvo utilizando el formador de gradiente proporcionado por el fabricante del equipo siguiendo sus indicaciones. Se usó 16 µl de los productos de la amplificación con los partidores P2-P3, mezclado con 3 µl de buffer de carga a una concentración 6x obteniendo una proporción 3:1, esta mezcla se cargó en los geles denaturantes por medio de una jeringa Hamilton. A diferencia del gel anterior; este gel sirvió para realizar los estudios de los índices ecológicos y de diversidad bacteriana.

La técnica de Electroforesis en gel con gradiente de denaturación se realizó en el equipo DGGE-1001 (C.B.S Scientific Company®), este equipo posee una cámara de electroforesis vertical cargada con buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato y 1mM EDTA, pH 8.3 a 25°C) el casete que contiene los geles, son embebidos en esta solución y la electroforesis fue corrida a 82V por 18 horas a 56°C. El gel fue teñido con una solución de SYBR Gold Nucleic acid gel stain (Molecular Probes Invitrogen®) al 0,05% durante 1 hora en oscuridad, posteriormente la visualización de las bandas se las realizó en UltraBright LED Transilluminator, 470nm (LB-16 MAESTROGEN) y se fotografió con una cámara Canon PowerShot G12 de 10.0MP en formato RAW, para así obtener un registro de los patrones de las bandas de cada muestra y su posterior análisis informático. Las imágenes del gel fueron reconstruidas con software Photoshop CS6.v13.0 (Adobe).

Las bandas se analizaron usando el software Gel-ProAnalyzer 4.0 (Applied Math) definiendo las bandas como aquellas que poseían al menos 5% de intensidad, anotándose como presencia o ausencia de las bandas en cada posición del gel.

Para la comparación se construyó una matriz binaria basada en la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda individual por cada línea, los cuales son usados para la construcción de una matriz de distancia. La matriz de distancia fue usada para la construcción de un diagrama de escalamiento multidimensional (MDS) el cual es un mapa bidimensional con ejes artificiales X y el eje Y donde cada fingerprint de DGGE se coloca como un punto de forma que las muestras similares son representadas juntas.

Los patrones únicos de DGGE o unidades operacionales taxonómicas (OTU's) se examinaron usando dos índices que indican los aspectos de la diversidad microbiana. El índice de Shannon-Weaver, índice de diversidad H (Shannon y Weaver, 1963) y el índice de equidad E (Pielou, 1975) se calcularon para cada muestra de acuerdo a la fórmula:

$$H = -\sum \left(\frac{n_i}{N} \right) \log \left(\frac{n_i}{N} \right) \quad \text{Eq. (1).}$$

$$E = H / \log S \quad \text{Eq. (2).}$$

Donde C representa el número total de bandas en el patrón y Dg el gradiente de Denaturalización comprendido entre la primera y la última banda del patrón (Carballa et al., 2015).

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR contenían SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (TAHARA BIO INC.) la cual poseía en su mezcla el Buffer de carga. Para posteriormente el gel de agarosa al 2% ser observado en un transiluminador.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las bandas obtenidas por DGGE se analizaron mediante el software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Applied Math) definiendo las bandas como aquellas que poseían al menos 5% de intensidad de la banda más intensa, anotándose como presencia o ausencia de las bandas en cada posición del gel.

La presencia de las 40 bandas más representativas del gel de DGGE con un gradiente de desnaturalización del 20%-80% fueron extraídas, purificadas, amplificadas, enviadas a secuenciar (Bayle et al., 2020; Dimitrakopoulou et al., 2021) a Macrogen, Korea, obtenidas las secuencias de ADN se analizaron por medio de la herramienta bioinformática del NCBI (National Center for Biotechnology), BLAST (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool). Con esta herramienta se compara las secuencias de nucleótido (query) contra una base de datos de secuencias, hallando similitudes entre ellas.

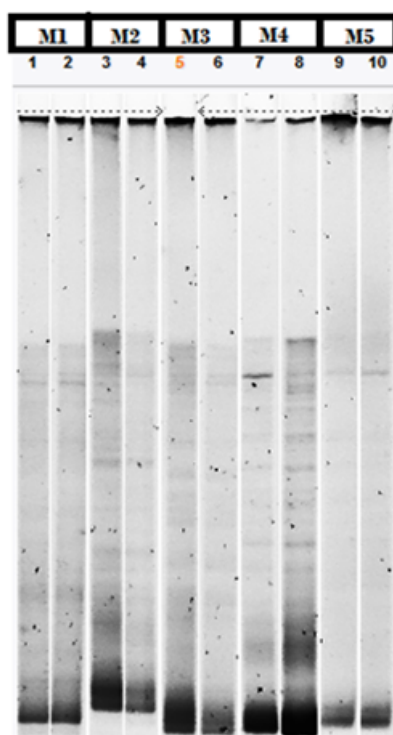


FIGURA 2.

Perfil de bandas de gradiente denaturante (DGGE) 20%-80% de las muestras M1 (Agua de pozo), M2 (agua osmosis), M3 (agua residual del proceso), M4 (tratamiento bacteriano), M5 (Agua residual + tratamiento).

Donde C representa el número total de bandas en el patrón y Dg el gradiente de Denaturalización comprendido entre la primera y la última banda del patrón (Carballa et al., 2015).

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR contenían SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (TAHARA BIO INC.) la cual poseía en su mezcla el Buffer de carga. Para posteriormente el gel de agarosa al 2% ser observado en un transiluminador.

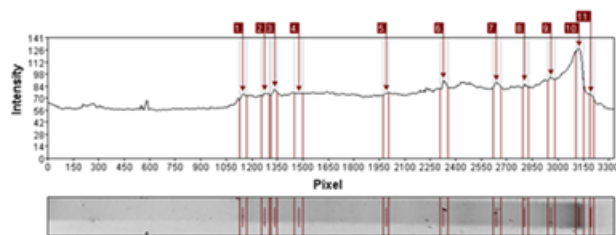


FIGURA 3.

Análisis de banda obtenida por DGGE por medio software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Applied Math) M1

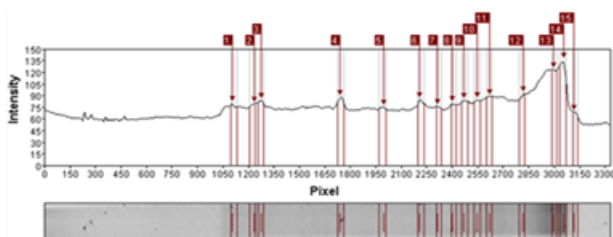


FIGURA 4.

Análisis de banda obtenida por DGGE por medio software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Applied Math) M2

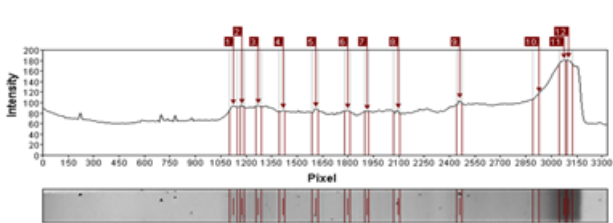


FIGURA 5.

Análisis de banda obtenida por DGGE por medio software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Applied Math) M3

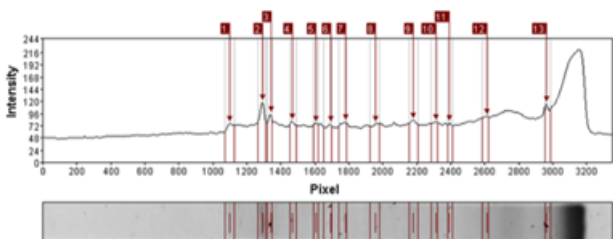


FIGURA 6.

Análisis de banda obtenida por DGGE por medio software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Applied Math) M4

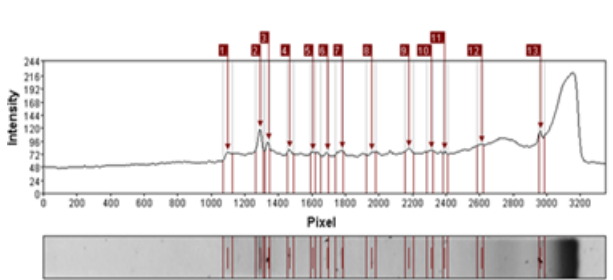


FIGURA 7.

Análisis de banda obtenida por DGGE por medio software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Applied Math) M5

Las secuencias relativas más cercanas fueron analizadas en el Gen Bank (Dimitrakopoulou et al., 2021) demostrando que los principales phyla bacterianos encontrados fueron: actinobacteria, proteobacteria, firmicutes, fungi.

CUADRO 4.
Secuencia relativamente cercana analizadas a partir del ensayo DGGE

Banda	Secuencia Relativa más cercana	Grupo Bacteriano
A1	Bacillus cecembensis strain PN5	Firmicutes
A2	Bacillus cecembensis	Firmicutes
A3	Pseudosporangium ferrugineum	Actinobacteria
A4	Mycobacterium insubricum	Actinobacteria
A5	Desulfotomaculum intricatum	Firmicutes
B1	Desulfotomaculum nigrificans	Firmicutes
B3	Mycobacterium insubricum	Actinobacteria
B4	Mycobacterium rhodesiae	Firmicutes
B5	Escherichia coli PCN033	Proteobacteria
C1	Oceanobacillus limi strain H9B	Firmicutes
C2	Escherichia coli PCN033	Proteobacteria
C3	Escherichia coli genome assembly FHI27	Proteobacteria
C5	Clostridium acetobutylicum	Firmicutes
D1	Sporisorium scitamineum strain Ssc18 genome assembly	Basidiomycota
D2	Pseudo kineococcus lusitanus	Actinobacteria
D3	Candidatus Azobacteroides pseudotrichonymphae genomovar.	Bacteroidetes
D4	Desulfotomaculum nigrificans	Firmicutes
D5	Shigella flexneri	Proteobacteria
D5	Plasmodium yoelii	Protista
E1	Streptomyces pharmamarensis	Actinobacteria
E2	Plasmodium cynomolgi	Alveolata
E3	Comamonas terrae strain	Actinobacteria
E4	Thermodesulfobacterium geofontis	Thermodesulfobacteria
E5	Acetobacter peroxydans	Proteobacteria
F1	Obesumbacterium proteus	Proteobacteria
F2	Bacillus cecembensis strain	Firmicutes
F3	Vitellibacter echinoideorum strain	Bacteroidetes
F4	Escherichia coli PCN033	Proteobacteria
F5	Escherichia coli HS	Proteobacteria
G1	Parabacteroides faecis	Bacteroidetes
G4	Desulfobacula toluolica	Proteobacteria
G5	Debaryomyces hansenii 18S ribosomal RNA gene	Fungi
H1	Microbacterium pseudoresistens	Actinobacteria
H2	Dekkera bruxellensis strain	Fungi
H3	Methanocaldococcus jannaschii	Euryarchaeota
H4	Oceanobacillus chironomi	Firmicutes
H5	Maribacter vacoletii	Bacteroidetes

La diversidad microbiana dentro del dominio fue casi cuatro veces mayor en el dominio Firmicutes con un (25,0%) aunque ausente en la M4 y M5, el segundo grupo mayoritario fue el de proteobacteria con un (22,50%) ausente solo en la muestra 1 (agua de pozo) y el tercer grupo formado por actinobacteria (14,00%) otros grupos reconocidos en el agua son las proteobacteria, estos genes se han descrito en bacterias como *Escherichia coli* (Deirdre et al., 2020; Mondal et al., 2021).

Las bandas del perfil de DGGE u OTU's presentes en cada una de las muestras se pudieron analizar la correlación de Bray-Curtis basado en la presencia o ausencia de bandas o OTU's (Figura 8); además de esto se realizó el estudio de su similitud por medio del método de escalamiento multidimensional (MDS) el cual utiliza una matriz de distancia que posee la correlación de Bray-Curtis (Figura 9).

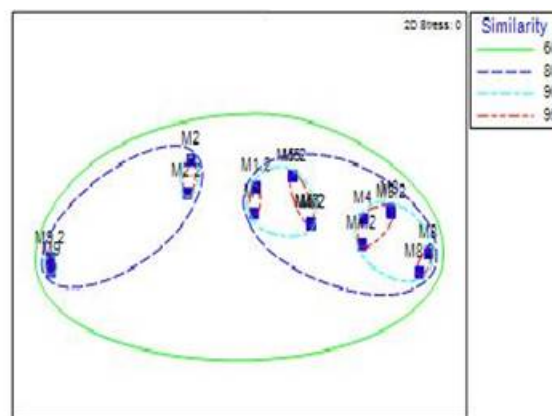


FIGURA 8.

Escalamiento multidimensional del patrón de bandeo obtenidos mediante DGGE.

Este análisis mostro que al 95% de similitud en la estructura de las comunidades bacterianas existen 2 grupos definidos, siendo el primer grupo formado por las muestras (M5, M5.2); el segundo grupo fue formado por las muestras (M6, M7, M6.2, M7.2); que además poseen un 80% de similitud, incluyendo otros dos grupos (M2, M2.2) Y (M9, M9.2).

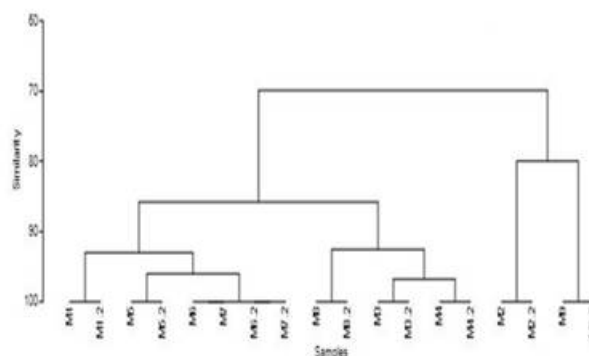


FIGURA 9.

Dendrograma del análisis de similitud (Bray-Curtis) del patrón de bandeo obtenido mediante análisis del gen ARNr 16s por DGGE.

Se realizó el análisis de índice de diversidad de Shannon (H) y la riqueza (S) después de 120 horas de incubación, los cuales ayudaron a comparar la diversidad catabólica entre los diferentes ensayos. El índice de riqueza (S) demostró que existe mayor diversidad microbiana en las muestras M3 (agua de proceso) y M4 (tratamiento bacteriano) (Cuadro 5).

El índice H' obtenido por el análisis de OTU's, demuestra que existe una mayor diversidad de especies en las muestras M2 (agua de osmosis), M3 (agua de residual de proceso), M4 (tratamiento bacteriano) si la comparamos con la M5 (agua residual + tratamiento). El índice J' indica que las abundancias están más uniformemente distribuidas en todas las muestras. Además, el índice de dominancia de Simpson fue igual en todas las muestras teniendo como valor $1-\text{Lambda}'=1$, lo que indica que posee un alto grado de similitud en su diversidad entre las diferentes muestras.

CUADRO 5.

Índices de riqueza (S), índice de diversidad de Shannon-Weaver (H'), índice de equidad de Pielou (J') e índice de dominancia de Simpson ($1-\text{Lambda}'$) del patrón de bandas (OTU's), obtenido mediante el análisis del gen ARNr 16S por DGGE.

Muestras	S	$H'(\log e)$	J'	$1-\text{Lambda}'$
M1	11	2,398	1	1
M2	9	2,197	1	1
M3	16	2,773	1	1
M4	15	2,708	1	1
M5	12	2,485	1	1
M6	13	2,565	1	1
M7	13	2,565	1	1
M8	18	2,89	1	1
M9	6	1,792	1	1
M10	6	1,792	1	1
M1.2	11	2,398	1	1
M2.2	9	2,197	1	1
M3.2	16	2,773	1	1
M4.2	15	2,708	1	1
M5.2	12	2,485	1	1
M6.2	13	2,565	1	1
M7.2	13	2,565	1	1
M8.2	18	2,89	1	1
M9.2	6	1,792	1	1
M10.2	6	1,792	1	1

CONCLUSIONES

Con la metagenómica se ha logrado conocer y estudiar en más detalle todo ese material genómico desconocido. Se han descubierto nuevas moléculas con aplicaciones biotecnológicas y se ha profundizado en el conocimiento de las diferentes interacciones microbiológicas en diversos ambientes. Es así que, la diversidad microbiana dentro del dominio fue mayor en el dominio Firmicutes aunque ausente en la M4 y M5, el segundo grupo mayoritario fue el de proteobacteria con un ausente solo en la muestra 1 (agua de pozo) y el tercer grupo formado por actinobacteria.

La base de datos, permite conocer genomas de baja población que serán de gran utilidad en el desarrollo de herramientas para el diagnóstico y biorremediación de las aguas residuales provenientes de este tipo de industria, ya que dentro de esta lista encontraremos bacterias especializadas que se han adaptado a condiciones ambientales extremas.

LITERATURA CITADA

Bayle, S., Martinez-arribas, B., Jarraud, S., Giannoni, P., Garrelly, L., Roig, B., & Cadi, A. 2020. Heliyon Development of a DGGE method to explore Legionella communities. Journal Heliyon. 6(1): 1-7

- Betancurt-Olvera, Marcela, Perez-Lainez, María Dolores, Nieto-Angel, Raúl, Barrientos-Priego, Alejandro F., García-Mateos, María Del Rosario, & Corona-Torres, Tarsicio. 2018. Comparación de seis métodos de extracción de ADN en tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé). *Revista fitotecnica mexicana*, 41(1): 75-79
- Callahan, B., Wong, J., Heiner, Ch., HO, S., Theriot, C., Gulati, A., McGill, S. y Dougherty, M. 2019. High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Research*, 47(18):1–12.
- Carballa, M., Regueiro, L., & Lema, J. 2015. Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current Opinion in Biotechnology*. *Curr Opin Biotechnol*, 33:103–111.
- Deirdre, C., Lorenzo, C., Antoine, G., Thomas, G., Adrian, Z., & Stefan, E. 2020. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev*. 33(4):1–74.
- Dimitrakopoulou, M., Panteleli, E., & Vantarakis, A. 2021. Improved PCR-DGGE analysis by emulsion-PCR for the determination of food geographical origin: A case study on Greek PDO “avgotaracho Mesolonghiou”. *Current Research in Food Science*, 4:746–751.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2020. Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura.
- García, K. 2018. Evaluación de la Competitividad de la Industria Atunera en la Economía de la Ciudad de Manta-Ecuador periodo 2012-2016. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/28832/1/TRABAJO%20FINAL%20MUEENTES%20HERNANDEZ.pdf>
- Hendriksen, R. S., Munk, P., Njage, P., Bunnik, B. Van, McNally, L., Lukjancenko, O., Röder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S. K., Kjeldgaard, J., Kaas, R. S., Thomas, P., Conradsen, L., Vogt, J. K., Leekitcharoenphon, P., Schans, M. G. M. Van De, Zuidema, T., Maria, A., Husman, D. R., ... Aarestrup, F. M. 2019. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun*, 10 (1124): 1-12
- López-Anchundia, E., Morales-Paredes, E., & Alvarado-Zambrano, S. 2019. Aspectos Biológicos en la Digestión Anaerobia de las Aguas Residuales de la Industria Pesquera. *Revista de Ciencias del Mar y Acuicultura YAKU*, 2(4):20-27.
- Mondal, S., Pramanik, K., Kumar, S., & Pal, P. 2021. Unraveling the role of plant growth-promoting rhizobacteria in the alleviation of arsenic phytotoxicity: A review. *Microbiological Research*, 25:126809.
- Palmeiro-Sánchez, T., & Campos, L. 2021. Bioconversion of Organic Pollutants in Fish-Canning Wastewater into Volatile Fatty Acids and Polyhydroxyalkanoate. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18(19):10176
- Scholz, M., Ward, D. V, Pasolli, E., Tolio, T., Zolfo, M., Asnicar, F., Truong, D. T., Tett, A., Morrow, A. L., & Segata, N. 2016) Strain-level microbial epidemiology and population genomics from shotgun metagenomics. *Nature Methods* 13:435–438
- Shin, J., Ha, J., Lee, D., Choi, J., Kim, K., Lee, W. K., Kang, H., Shin, M., & Yoo, J. 2020. Comparative Evaluation of Band-Based Genotyping Methods for *Mycobacterium intracellulare* and Its Application for Epidemiological Analysis. *Microorganisms*. 8(9): 1315.
- Wu, L., Ning, D., Zhang, B., Li, Y., Zhang, P., & Shan, X. 2019. Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nat Microbiol*, 4(7):1183-1195
- Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. 2020. PCR past, present and future. *Biotechniques*. 69(4):317-325.