Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

Aplicación de ADN ambiental en áreas protegidas: estimando la biodiversidad acuática en Pantanos de Villa

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en Hidrobiología y Pesquería

AUTOR

Daniela Lidia NUÑEZ RODRIGUEZ

ASESOR

Dra. Zoila Raquel SICCHA RAMIREZ

Lima, Perú

2022

Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Nuñez, D. (2022). *Aplicación de ADN ambiental en áreas protegidas: estimando la biodiversidad acuática en Pantanos de Villa*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Daniela Lidia Núñez Rodriguez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	43316021
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-3638-1752
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Zoila Raquel Siccha Ramirez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	42176293
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5597-3948
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Jorge Luis Ramirez Malaver
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43352480
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Liliana Del Rosario Tapia Ugaz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	33262515
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Max Henry Hidalgo Del Aguila
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	
Datos de investigación	

Línea de investigación	A.1.1.3. Diversidad Genética
Grupo de investigación	Evolución molecular de la biota en el *Perú*
Agencia de financiamiento	Perú. Programa Nacional de Investigación científica y estudios avanzados (Prociencia). Concurso "Incorporación de Investigadores" – Convenio Concytec – Banco Mundial. N° 022-2019-FONDECYT-BM-INC-INV.
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Chorrillos Latitud: -12.2137 Longitud: -76.989
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Marzo 2021 - octubre 2022
URL de disciplinas OCDE	Biología de agua dulce https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.12

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA CON MENCIÓN EN HIDROBIOLOGÍA Y PESQUERÍA (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)

Siendo las 8:20 horas del 13 de octubre de 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue https://meet.google.com/mmh-dppk-kev, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga con mención en Hidrobiología y Pesquería** de **DANIELA LIDIA NUÑEZ RODRIGUEZ.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente Nº **UNMSM-20220043334**, la titulando expuso su tesis: **APLICACIÓN DE ADN AMBIENTAL EN ÁREAS PROTEGIDAS: ESTIMANDO LA BIODIVERSIDAD ACUÁTICA EN PANTANOS DE VILLA,** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **19**, calificativo: **Aprobado con máximos honores**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga con mención en Hidrobiología y Pesquería** a **DANIELA LIDIA NUÑEZ RODRIGUEZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 10:05 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 13 de octubre de 2022.

Dr. JORGE RAMIREZ MALAVER
(PRESIDENTE)

Dra. ZOILA RAQUEL SICCHA RAMIREZ
(ASESORA)

Mg. LILIANA TAPIA UGAZ
(MIEMBRO)

Blgo. MAX HIDALGO DEL AGUILA
(MIEMBRO)

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INFORME DE EVALUACION DE ORIGINALIDAD

ESCUELA PROFESIONAL : CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL : Dr. Pablo Sergio Ramirez Roca

OPERADOR DEL PROGRAMA INFORMATICO DE SIMILITUDES: Feedback Studio

DOCUMENTO EVALUADO* : **APLICACIÓN DE ADN AMBIENTAL EN ÁREAS PROTEGIDAS: ESTIMANDO LA BIODIVERSIDAD ACUÁTICA EN PANTANOS DE VILLA**

AUTOR DEL DOCUMENTO** : NÚÑEZ RODRIGUEZ DANIELA LIDIA
FECHA DE RECEPCIÓN DEL DOCUMENTO : 14/setiembre/2022
FECHA DE APLICACIÓN DEL SISTEMA INFORMATICO : 14/setiembre/2022
SOFTWARE UTILIZADO :
TURNITIN (X)
ITHENTICATE ( )
OTRO

CONFIGURACION DEL PROGRAMA DE SIMILITUDES
Excluye textos entrecomillados (X)
Excluye bibliografía (X)
Excluye cadenas menores a 40 palabras(X)
Otro criterio ( ) (especificar)

PORCENTAJE DE SIMILITUDES *** : TRES (03%)

FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS **** :

APLICACIÓN DE ADN AMBIENTAL EN ÁREAS PROTEGIDAS: ESTIMANDO LA BIODIVERSIDAD ACUÁTICA EN PANTANOS DE VILLA

INFORME DE ORIGINALIDAD

3%	4%	2%	1%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

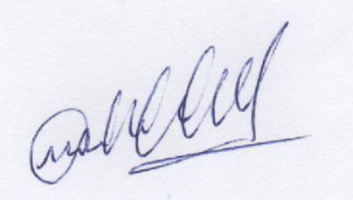
1	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
2	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1%
3	www.Informea.org Fuente de Internet	<1%

OBSERVACIONES: Ninguna

CALIFICACION DE ORIGINALIDAD:

Documento cumple criterios de originalidad sin observaciones (x)
Documento cumple criterios de originalidad con observaciones ( )
Documento no cumple criterios de originalidad ( )

FECHA DEL INFORME : 14/setiembre/2022



UNMSM

Firmado digitalmente por RAMIREZ ROCA Pablo Sergio FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 16.09.2022 11:30:50 -05:00

FIRMA DEL EVALUADOR

FIRMA DEL DIRECTOR EP

* Tesis para grado o título de pregrado
** Apellidos y nombres completos
*** En letras y números
**** Indicarlas en orden decreciente y su respectivo porcentaje

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Raquel Siccha por la asesoría de este trabajo y al profesor Hernán Ortega por haberme permitido iniciar profesionalmente en el departamento de Ictiología del Museo de Historia Natural de San Marcos.

Al laboratorio de Sistemática y Filogeografía, a la profesora Rina Ramírez, al profesor Jorge Ramírez y el profesor Ricardo Britzke por los continuos aportes a este trabajo.

A Ricardo Ricce por todas las colaboraciones y tiempo de discusión de los resultados.

A mis padres y hermanas por todo el aliento, cariño y ejemplo.

A mi compañero, a mi esposo, a mi mejor amigo, por sostener mi mano y prender la luz cuando todo oscurecía.

DEDICATORIA

A mi abuelito Tomás Núñez Bazalar y a mi abuelita Elena de la Torre Bueno.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN 1

II. MARCO TEÓRICO 3

2.1. LOS HUMEDALES COSTEROS Y LOS SERVICIOS ECOSISTÉMICOS 3

2.2. REFUGIO DE VIDA SILVESTRE PANTANOS DE VILLA 4

2.3. ADN AMBIENTAL Y METABARCODING 6

III. HIPÓTESIS 11

IV. OBJETIVOS 12

Objetivo General: 12

Objetivos Específicos: 12

V. MATERIAL Y MÉTODOS 13

5.1. Área muestreada 13

5.2. Colecta y almacenamiento de muestras de agua 13

5.3. Extracción de ADN. 15

5.4. Amplificación, preparación de la biblioteca genómica y secuenciación. 17

5.5. Visualización en gel de agarosa y Purificación de amplicones 18

5.6. Indexación por PCR 18

5.7. Secuenciación 18

5.8. Bioinformática 19

5.9. Análisis de datos 20

VI. RESULTADOS 21

6.1. Comunidad zooplanctónica 32

6.2. Comunidad fitoplanctónica 36

VII. DISCUSIÓN 40

VIII. CONCLUSIONES 47

IX. RECOMENDACIONES 48

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación de los Pantanos de Villa (SERNANP, IGN, MTC) 14

Figura 2. Mapa específico de ubicación de los puntos de colecta en la Laguna Mayor del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa. 15

Figura 3. Sistema de filtrado de muestras utilizando una bomba de vacío y filtros Sterivex. 15

Figura 4. Flujograma de la metodologia de ADN ambiental aplicada para la Laguna Mayor de Pantanos de Villa. 20

Figura 5. Puntos de colecta en la Laguna Mayor del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa. Puntos de muestreo: a) Pan 1, b) Pan 2, c) Pan 3, d) Pan 4 y d) Pan 5. 22

Figura 6. Número de asignaciones únicas obtenidas para cada categoría taxonómica por cada comunidad biológica. 25

Figura 7. Comparación del número de espécies para cada réplica en cada punto de colecta. Fueron consideradas solo asignaciones únicas, las cuales no fueron registradas en Pan 2A y Pan 2B. 26

Figura 8. Comparación del porcentaje de similaridad de las ESVs encontradas después de la alineación de secuencias con bases de datos de nucleótidos NCBI. 31

Figura 9. Abundancia de reads obtenidas para cada especie en la comunidad biológica del Zooplancton. Los números sobre las barras indican el número de secuencias obtenidas para asignaciones taxonómicas únicas. 33

Figura 10. Curva de acumulación de especies de zooplancton y estimación de curvas de diversidad Chao1 (naranja), Jackknife (plomo) y Bootstrap (amarillo) 34

Figura 11. Comparación de riqueza de especies de zooplancton por phylum obtenidas con ADN ambiental y por Iannacone y Alvariño. Azul: colecta de ADN ambiental realizada en marzo de 2021, Amarillo: Iannacone y Alvariño en abril del 2005. 36

Figura 12. Abundancia de reads obtenidas para cada especie en la comunidad biológica fitoplanctónica. Los números sobre las barras indican el número de secuencias obtenidas para asignaciones taxonómicas únicas. 37

Figura 13. Curva de acumulación de especies de fitoplancton y estimación de curvas de diversidad Chao1 (naranja), Jackknife (plomo) y Bootstrap (amarillo). 38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales de consumo para la obtención de ADN ambiental en la Laguna Mayor de los Pantanos de Villa. 21

Tabla 2. Parámetros físicos y químicos de la laguna Mayor en los Pantanos de Villa para los cinco puntos de muestreo (Pan 1, Pan 2, Pan 3, Pan 4 y Pan 5). 24

Tabla 3. Composición taxonómica de las asignaciones únicas encontradas para la biota acuática detectada en la Laguna Mayor. 27

Tabla 4. Composición taxonómica de las asignaciones no únicas encontradas para la biota acuática detectada en la Laguna Mayor. 29

Tabla 5. Índices de diversidad del zooplancton en Pantanos de Villa..... 35

Tabla 6. Índices de diversidad del fitoplancton en Pantanos de Villa..... 39

GLOSARIO

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
ADN barcoding	Código de barras de ADN
ASV	Variante de secuencia del amplicón
CE	Conductividad eléctrica
COI	Citocromo C oxidasa
eDNA	Environmental DNA, ADN ambiental
ESV	Variantes de secuencia exactas
Genbank	Base de datos de secuencias genéticas NIH
HCl	Ácido clorhídrico
HTS	High Troughput Sequence
mL	Mililitro
MOTU	Molecular Operational Taxonomic Unit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Oxígeno disuelto
OTU	Operational Taxonomic Unit
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
reads	Secuencia obtenida del secuenciador
RVSPV	Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa
ST	Sólidos totales
T°	Temperatura
µL	Microlitro
µM	Micromolar
12S rRNA	Subunidad 12S del ARN ribosomal
16S rRNA	Subunidad 16S del ARN ribosomal

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo realizar un estudio de diversidad de la biota que habita la Laguna Mayor en el Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa, siendo utilizada para ello una técnica de biología molecular innovadora llamada ADN ambiental (eDNA) y secuenciación *metabarcoding*. Los humedales como son los Pantanos de Villa, una región RAMSAR, son regiones altamente sensibles a impactos antropogénicos. La biodiversidad que alberga permite que estas regiones cumplan un rol enormemente importante brindando servicios ecosistémicos a la población humana como son la regulación del clima, fuente de alimento como la pesca, control de inundaciones, etc. Para detectar las especies acuáticas que habitan la Laguna Mayor empleamos el eDNA, el cual utiliza la información genética contenida en restos de tejido celular que son liberados naturalmente en el medio ambiente (escamas, mucosas, piel, etc.), y permite a través de secuenciación *metabarcoding* obtener variantes de secuencia exactas (ESVs). Posteriormente las ESVs se compararon con la base de datos el NCBI (National Center for Biotechnology Information) para determinar las asignaciones taxonómicas para cada secuencia. La metodología incluyó obtener 15 muestras de agua, las que fueron obtenidas a partir de cinco puntos de colecta en la Laguna Mayor. Fueron utilizados los marcadores moleculares MiniBar-Mod-F y MiniBar-Mod-R, que amplifica una región corta tamaño de 130 pb del gen citocromo oxidasa I (COI). Se obtuvieron 1 447 795 secuencias, representando 14 ESVs a nivel de Phylum, 21 a nivel de Clase, 27 a nivel de Orden, 31 a nivel de Familia, 36 a nivel de género y 38 ESVs identificadas a nivel de especie. El total de las asignaciones taxonómicas fueron divididas en cuatro grandes grupos: aves, peces, fitoplancton y zooplancton. Este estudio se distingue por ser pionero para humedales en Perú, siendo entre los resultados esperados el *primer* banco de datos moleculares para los Pantanos de Villa. De esta forma, este trabajo busca alcanzar con sus resultados servir de base científica

para la toma de decisiones que permitan diseñar medidas para la preservación y conservación de Pantanos de Villa y otras áreas similares.

Palabras clave: Pantanos de Villa, Laguna Mayor, diversidad acuática, ADN ambiental, *metabarcoding*.

ABSTRACT

The main goal of this work is to carry out diversity assessment of the biota that inhabits the Laguna Mayor in the Pantanos de Villa Wildlife Refuge, using an innovative molecular biology technique called environmental DNA (eDNA) and *metabarcoding* sequencing. Wetlands such as Pantanos de Villa, a RAMSAR region, are highly sensitive to anthropogenic impacts. The biodiversity it houses allows these regions to play an enormously important role in providing ecosystem services to the human population, such as climate regulation, a source of food such as fishing, flood control, etc. To detect the aquatic species that inhabit the Laguna Mayor, we use eDNA, which uses the genetic information contained in remains of cellular tissue that are naturally released into the environment (scales, mucous membranes, skin, etc.), and allows through *metabarcoding* sequencing to obtain exact sequence variants (ESVs). The ESVs were then compared with the NCBI database (National Center for Biotechnology Information) to determine the taxonomic assignments for each sequence. The methodology included obtaining 15 water samples, which were obtained from five collection points in the Laguna Mayor. Molecular markers MiniBar-Mod-F and MiniBar-Mod-R were used, which amplify a short region of 130 bp of the cytochrome oxidase I (COI) gene. A total of 1,447,795 sequences were obtained, representing 14 ESVs at the Phylum level, 21 at the Class level, 27 at the Order level, 31 at the Family level, 36 at the Genus level and 38 ESVs identified at the species level. The total taxonomic assignments were divided into four large groups: birds, fish, phytoplankton and zooplankton. This study stands out for being a pioneer for wetlands in Peru, being among the expected results the first molecular data bank for the Pantanos de Villa. In this way, this work seeks to achieve, with its results, to serve as a scientific basis for decision-making that allows the design of measures for the preservation and conservation of Pantanos de Villa and other similar areas.

Keywords: Pantanos de Villa, Laguna Mayor, diversidad acuática, ADN ambiental, *metabarcoding*.

I. INTRODUCCIÓN

Los humedales son ecosistemas muy sensibles a los cambios climáticos, y su degradación genera impactos en la extensión superficial, disminuyendo la capacidad de desempeñar funciones ecológicas y económicas (Bassi *et al.*, 2014). Asimismo, el crecimiento poblacional que genera un mayor desarrollo urbano e industrial, incrementa el impacto directo en la pérdida de ambientes acuáticos y terrestres. Los ecosistemas de la costa, comparados con los localizados en otras regiones, producen más servicios ecosistémicos para poblaciones humanas; sin embargo, su degradación es también más acelerada (Bobbink *et al.*, 2006).

Uno de los humedales más emblemáticos de la costa peruana, el Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa (RVSPV) (Cano *et al.*, 1993; León *et al.*, 1995; Guillén *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2006; Iannacone y Alvariño, 2007; Ramírez y Cano, 2010; Paredes, 2012; Alarcón y Iannacone, 2014; Pacheco *et al.*, 2015), es considerado como un área de refugio y reproducción de aves residentes (Pulido y Myers, 1992; Castro *et al.*, 1998; Pulido, 1989), asimismo es catalogada como área protegida a nivel nacional (SERNANP, 2016). Sin embargo, a pesar de esta protección legal, el impacto antropogénico ocasionado por el crecimiento demográfico a los alrededores del RVSPV (Iannacone y Alvariño, 2007) ha provocado una disminución de la extensión de los cuerpos de agua (Pulido y Bermudez, 2018; Aponte y Cano, 2013). Estas acciones tienen consecuencias severas en la biota que habita el Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa, como fue ejemplificado por el estudio de Ramirez *et al.* (2018) sobre los impactos ocasionados por los incendios recurrentes en esa zona.

A pesar de la degradación ambiental constante a la que se enfrenta esta región, las evaluaciones biológicas efectuadas en este humedal, demuestran el enorme esfuerzo realizado por conocer su biodiversidad, siendo esta traducida en estudios

de diversidad de aves (Iannacone *et al.*, 2010; Tello y Castillo 2010; Torres *et al.*, 2016), peces (Castro *et al.*, 1998), composición zooplanctónica (Iannacone y Alvariño, 2007), diversidad de la flora (Cano *et al.*, 1993; León *et al.*, 1995; Young, 1998; Ramírez y Cano, 2010), algas (Montoya, 1998), protozoarios (Sarmiento y Morales 1998, Guillén *et al.* 2003), arañas (Paredes, 2012) y mamíferos (Pacheco *et al.*, 2015).

El escenario crítico en la conservación de la diversidad biológica que alberga los Pantanos de Villa, nos lleva a la necesidad de incrementar y validar métodos para obtener información sobre la biodiversidad. De esta manera el presente trabajo tiene como objetivo estandarizar la metodología de ADN ambiental (eDNA) para obtener datos de diversidad de biota acuática en los Pantanos de Villa. La innovación de esta investigación se sostiene en ser el primer estudio de diversidad de especies en humedales peruanos utilizando herramientas genéticas, y que busca ofrecer una metodología altamente sensible, costo-efectiva y complementaria a los monitoreos a partir de redes, mallas o trampas utilizados para la captura de especímenes posteriormente identificados por caracteres taxonómicos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. LOS HUMEDALES COSTEROS Y LOS SERVICIOS ECOSISTÉMICOS

En el Perú existen actualmente 14 humedales incluidos en la lista Ramsar entre los cuales se encuentran: Bofedales y Laguna de Salinas, Complejo de humedales del Abanico del río Pastaza, Estuario de Virrilá, Humedal Lucre – Huacarpay, Lago Titicaca, Laguna del Indio – Dique de los Españoles, Laguna de las Arreviatadas, Manglares de San Pedro de Vice, Reserva de Junín, Reserva Nacional de Paracas, Reserva Nacional Pacaya-Samiria, Santuario Nacional Lagunas de Mejía, Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes, Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa (RSVPV) (www.ramsar.org). Además, cabe mencionar que en la costa de Lima se encuentran también otros humedales de importancia como el Área de Conservación Regional Albúfera de Medio Mundo, Humedal de Carquin, Humedal Lagunas El Paraíso, Humedal Santa Rosa y Zona Reservada Humedales de Puerto Viejo (Aponte y Ramírez, 2011).

De acuerdo con la Convención Ramsar (Convención Relativa a los humedales de Importancia Internacional, especialmente como Hábitat de Aves Acuáticas), los humedales brindan a las poblaciones humanas una variedad importante de servicios ecosistémicos como recursos pesqueros, regulan el ciclo global del agua, tienen alta productividad, permiten controlar inundaciones, brindan oportunidades de recreación y ejercen un papel importante en el turismo local (Kumar *et al.*, 2020). Los servicios ecosistémicos son considerados como un beneficio que las poblaciones humanas pueden obtener de los recursos naturales, sea por su extracción o uso directo, por ejemplo, alimentos, agua dulce y madera; como servicio de regulación, por ejemplo, estabilización del clima; o como servicios culturales, por ejemplo inspiración intelectual, estética y/o espiritual (Brauman y Daily, 2014).

A pesar de estos beneficios, hasta el año 2018 la tercera parte del total de humedales del mundo había desaparecido (Janse *et al.*, 2019). Entre los humedales que aún permanecen existen presiones en su mayoría antropogénicas, que ejercen impactos los cuales aceleran la extinción de aves, mamíferos, anfibios y corales (Gardner *et al.*, 2015). La generación de información de calidad sobre el estado actual de la biodiversidad de los humedales es de fundamental importancia, permitiendo diseñar y adoptar medidas adecuadas de protección y conservación ambiental.

2.2. REFUGIO DE VIDA SILVESTRE PANTANOS DE VILLA

El Refugio de Vida Silvestre los Pantanos de Villa está ubicado en plena ciudad de Lima, específicamente en el distrito de Chorrillos. Se localiza en una depresión plana (coordenadas 12°10'- 12°13' S; 77° 01'-77°02' W) entre las cuencas de los ríos Rímac y Lurín. Los ambientes acuáticos de este ecosistema, incluyen cuatro tipos de zonas hidromórficas entre las cuales se encuentran lagunas fluctuantes, zona de juncales e inundación periódica, zona de inundación periódica y zona en proceso de sedimentación y aplanamiento (Pulido y Bermúdez, 2018).

El refugio alberga una gran cantidad de especies de flora y fauna, considerada como un humedal de importancia internacional RAMSAR, debido a que representa una región que diversas especies de aves utilizan como ruta migratoria, refugio y lugar para la reproducción (Pulido y Bermúdez, 2018). A pesar de ser la única área protegida en el casco urbano de la ciudad de Lima, y luego de que su extensión sufriera importantes reducciones (de 2000 hectáreas a principios del siglo pasado, a 263,27 hectáreas en el 2018), los Pantanos de Villa se encuentran en una situación de vulnerabilidad (Pulido y Bermúdez, 2018). De esta forma, se hace evidente la pérdida y el deterioro de sus hábitats, impactos que surgen principalmente por las presiones antropogénicas, evidenciándose una disminución

de ambientes hídricos, transformando lagunas en ambientes secos (Pulido y Bermúdez, 2018). La dimensión de la pérdida de diversidad generada por impacto de las actividades humanas es casi el doble en sistemas acuáticos en comparación a las poblaciones terrestres (WWF, 2016).

Los levantamientos de diversidad de fauna realizados en los Pantanos de Villa incluyen una amplia variedad de grupos biológicos entre flora, aves, moluscos, peces, protozoarios y plancton. Entre los vertebrados, estudios previos reportan una diversidad registran 226 especies (Pulido, 1989; Pulido y Myers, 1992; Castro *et al.*, 1998; Morales, 1998; Pulido, 2003; Pulido y Bermúdez, 2018). Entre las comunidades planctónicas, la comunidad zooplanctónica ha reportado 12 taxas distribuidas en 6 familias, 4 órdenes y 2 filos (artrópoda y rotífera) (Cepeda *et al.*, 2018); mientras que en la comunidad fitoplanctónica fueron registradas 29 taxas representando a 20 familias, 7 órdenes y 3 divisiones (Chlorophytas, Bacillariophytas y Cyanobacterias) (Cepeda *et al.*, 2018). La diversidad de moluscos registra *Physa venustula, Drepanotrema kermatoides* y *Ancylus concentricus* (Pulido y Bermúdez, 2018). Entre las especies de peces, han sido registradas tres especies nativas de peces, *Bryconamericus peruanus, Lebiasina bimaculata* y *Trichomycterus punctulatus* (Castro *et al.*, 1998) además de especies exóticas invasoras, comunes en los cuerpos acuáticos continentales del Perú y América Latina, como el “gupy” (*Poecilia reticulata*) y la “tilapia del Nilo” (*Oreochromis niloticus*). Es importante destacar que, en la mayoría de estos sistemas hídricos a nivel continental, no existen programas de control ambiental que regulen y detecten la presencia de esas especies exóticas, limitando la cuantificación de los efectos nocivos de estos organismos a la biodiversidad de estos ecosistemas (Kalesnik y Malvárez, 2004). Sin embargo, luego de los resultados obtenidos por Castro *et al.* (1998), los reportes de diversidad acuática de este ecosistema han sido divulgados en eventos científicos y otros medios de comunicación no científicos en los

humedales Pantanos de Villa. Esto resume un vacío de información sobre la diversidad de peces de 24 años, mostrando la urgencia de actualizar los datos de diversidad de peces y otras comunidades acuáticas.

Este escenario crítico en la conservación del agua y los recursos biológicos nos lleva a la necesidad urgente de ampliar las herramientas para obtener información sobre la biodiversidad. Desde un enfoque ecológico es necesario saber qué especies componen la biodiversidad del ecosistema, así como monitorear las especies sensibles, tolerantes y aquellas capaces de reproducirse en cuerpos de agua afectados por la contaminación, potenciar la detección de especies invasoras en estadios tempranos del desarrollo (huevos y larvas) que podrían estar presentes en los cuerpos de agua (Souza, 2013).

2.3. ADN AMBIENTAL Y METABARCODING

A partir de un estudio taxonómico usando caracteres morfológicos amplio que permita registrar la diversidad presente en un ecosistema particular, pueden ser luego aplicadas tecnologías de identificación molecular de las especies. En las últimas décadas, se ha empleado el código de barras del ADN para identificar especies de vertebrados utilizando fragmentos estandarizados del gen de citocromo oxidasa subunidad I a través de la secuenciación de Sanger o NGS y comparando la secuencia obtenida con bases de datos públicas como NCBI (Carvalho *et al.* , 2011; Hebert *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2011). Otras nuevas tecnologías como el eDNA y la secuenciación de alto rendimiento o paralela (High Throughput Sequencing, HTS), representan también herramientas altamente eficaces para el monitoreo de especies acuáticas (Pont *et al.*, 2018).

Definimos el ADN ambiental o eDNA, como todo material genético presente en la columna de agua, el sedimento o el aire (Collins *et al.*, 2018). Este material genético puede estar contenido en células de la piel, escamas, mucosidad, orina,

heces, gametos, individuos descompuestos, etc. que se depositan en el sedimento o se suspenden en la columna de agua (Ficetola *et al.*, 2008). La identificación de las especies a partir de muestras de eDNA permite la disminución del tiempo de colecta en campo en comparación con el método de captura por redes, mallas o trampas (Harper *et al.*, 2019; Thomsen y Willerslev, 2015). Esta técnica requiere un bajo esfuerzo de muestreo sin la necesidad de artes de pesca, siendo posible detectar la mayoría de las especies que habitan en el área de estudio. Como no son capturados ni manipulados individuos completos, la técnica del ADN ambiental se considera como un método de colecta no invasivo.

Las técnicas moleculares han permitido la detección e identificación rápida, precisa y automatizada de seres vivos, siendo herramientas útiles para la elaboración de planes de manejo y conservación de fauna y flora (Hebert y Gregory, 2005). Innovadoras técnicas de genética molecular como el ADN ambiental (eDNA, environmental DNA) son capaces de evaluar la diversidad de especies animales (anfibios, peces, mamíferos, insectos y crustáceos) a partir de ADN genómico obtenido a partir de pequeñas muestras de agua o sedimentos de los ambientes acuáticos evaluados.

La identificación por eDNA tiene una alta sensibilidad ya que la cantidad de ADN requerida es mínima, lo que permite la detección de especies que ocurren en muy bajas densidades. Recientemente, el desempeño ambiental del eDNA ha comenzado a compararse con otros métodos de detección de especies, como los mamíferos, donde el número de especies detectadas por eDNA fue mayor que el de las cámaras trampa (Leempoel *et al.*, 2019). En ambientes acuáticos, los estudios que incluyen ADN ambiental han demostrado su efectividad y eficiencia en diferentes tipos de ambientes como el marino (Stat *et al.*, 2017), ríos y lagos tropicales (Valdez-Moreno *et al.*, 2019); así como, para la detección de especies invasoras (Klymus *et al.*, 2017).

La sensibilidad de esta técnica la hace susceptible también a varios factores que pueden afectar el poder de detección de especies. En ambientes dulceacuícolas, la detectabilidad del ADN en el medio ambiente depende varios factores como: la producción, referido a la cantidad y tipo de material genético liberado en el medio acuático los cuales dependen de la especie, la época del año, densidad poblacional y dieta; la degradación, debido a factores físicos como radiación UV, pH, actividad microbiana, temperatura; el transporte y la tasa de difusión de las partículas de material genético en el medio acuático, las cuales varían entre ambientes lóticos y lénticos (Taberlet *et al.*, 2018). A pesar de que algunos autores señalan el pH ácido como un factor que podría influenciar la integridad de la muestra (Valdez-Moreno *et al.*, 2019), fueron conducidos experimentos como los de Tsuji *et al.* (2016), en los cuales se liberó ADN extraído a partir de carpa en un ambiente acuoso controlado (agua ultrapura) con valores diferentes de pH. Como resultado, valores de pH iguales a 5.0 no mostraron ninguna variación en el rendimiento del eDNA obtenido, por otro lado, un medio más alcalino disminuyó el rendimiento debido a hidrofobicidad de las moléculas de ADN.

Una vez que se han obtenido muestras de ADN ambiental, se pueden obtener MOTUs a partir de *metabarcoding* de ADN, una técnica que permite la identificación de especies de muestras con más de un organismo. Para lograr este objetivo, se utilizan la secuenciación masiva (HTS) y las mismas bases de datos utilizadas para el código de barras de ADN. Cuando se aplica a la fauna acuática, la técnica de *metabarcoding* de ADN en muestras de eDNA ha demostrado una alta eficiencia en la identificación de larvas de peces en ríos en la Amazonía peruana (Maggia *et al.*, 2017), en la evaluación cualitativa y cuantitativa de la riqueza de especies de peces en sistemas lóticos (Pont *et al.*, 2018) y en la comparación de eDNA con métodos de colecta con redes, mallas o trampas para evaluar la composición de especies (Fujii *et al.*, 2019). Su aplicación ha permitido la reconstrucción de comunidades

ancestrales (Jørgensen *et al.*, 2012), el seguimiento de la biodiversidad (Andersen *et al.*, 2012), el análisis de la dinámica reproductiva de peces (Maggia *et al.*, 2017) y la detección de un mayor número de unidades taxonómicas en una fracción del tiempo empleado en estudios basados en morfología y códigos de barras de ADN (Fonseca *et al.*, 2010).

Para la obtención de la información sobre la diversidad de especies en los Pantanos de Villa es esencial el diseño de medidas de conservación y preservación de estos ambientes, a través del uso de herramientas innovadoras de genética molecular como es el ADN ambiental, el cual provee un alcance más exhaustivo y no invasivo. Estudios de este tipo permiten extender el conocimiento que se tiene de nuestra fauna acuática local, el cual ha demostrado tener un rol importante inclusive en el control de amenazas epidemiológicas (Bobbink *et al.*, 2006).

Aunque el uso de ADN ambiental y ADN *Metabarcoding* acelera la obtención de los datos de diversidad de una comunidad biológica, el uso de eDNA como método de recolección requiere una estandarización apropiada de los métodos de biología molecular aplicados, así como bibliotecas de referencia robustas para identificar la mayor cantidad de especies ambientales como sea posible (Stoeckle et al., 2020). Por un lado, la colección de eDNA está influenciada por el tipo de entorno (Olds *et al.*, 2016), la época del año en la que se recolecta (Fischer y Quist, 2014), producción de eDNA (Maruyama *et al.*, 2014; Sassoubre *et al.*, 2016), degradación molecular y métodos de transporte (Strickler *et al.*, 2015). Por otro, la construcción de una biblioteca de referencia molecular para los análisis de ADN *metabarcoding* es esencial para evitar las incertidumbres taxonómicas y la propagación de falsos positivos o negativos.

Para estudios de diversidad molecular usualmente el procesamiento de las secuencias obtenidas por el método de agrupamiento de identidad da como resultado unidades taxonómicas operativas (OTUs). Este método comúnmente utiliza un límite de identidad de 97% para secuencias de la misma especie, es decir, grupos cuyas secuencias poseen un umbral de diferencia de por lo menos 3% (Westcott y Schloss, 2015; Kopylova *et al.*, 2016). Como alternativa a las OTUs ha sido propuesto un método de agrupación denominado Variantes de Secuencia de Amplicón (ASV) o Variación de Secuencia Exacta (ESV), en donde se utiliza la probabilidad y corrección de errores de secuenciación reales (ruido).

Los estudios y los monitoreos ambientales son esenciales para comprender el alcance de los impactos de todas las actividades humanas que incluyen cambios en los sistemas naturales. Esta información establece un punto de referencia para la biodiversidad que ocurre en el área de estudio, y permite evaluar el que las actividades antropogénicas ejercen sobre ella. El entendimiento de la riqueza y la diversidad de las especies permite determinar las regiones prioritarias para la conservación de la biodiversidad, así como el diseño de medidas apropiadas que pueden mitigar dichos impactos (Kumar *et al.*, 2020). Para evitar sesgos en la interpretación de las secuencias genéticas obtenidas, es fundamental contar con levantamientos biológicos basados en identificaciones taxonómicas usando caracteres morfológicos. La inclusión e integración de ambas metodologías para establecer los monitoreos biológicos ambientales, por lo tanto, son altamente deseables y necesarias.

III. HIPÓTESIS

H0: La técnica de ADN ambiental no coincide con lo previamente reportado para la diversidad de la biota acuática en los ambientes acuáticos de Pantanos de Villa.

H1: La técnica de ADN ambiental coincide con lo previamente reportado para la diversidad de la biota acuática en los ambientes acuáticos de Pantanos de Villa.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar la diversidad de organismos acuáticos y relacionados que habitan los ambientes lénticos de Pantanos de Villa a partir del análisis de ADN ambiental.

Objetivos Específicos:

1. Determinar los parámetros adecuados para emplear la técnica de ADN ambiental en ecosistemas acuáticos de Pantanos de Villa.
2. Verificar la eficacia y la diversidad obtenida a partir de la técnica de ADN ambiental y compararlas con la diversidad previamente registrada por métodos de monitoreo a partir de redes, mallas o trampas.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Área muestreada

Se analizó la comunidad acuática presente en la Laguna Mayor del Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa (Chorrillos, Lima, Perú) (Figura 1) a partir de muestras de agua y ADN ambiental. El muestreo fue por conveniencia, siendo establecidos cinco puntos de colecta: Pan 1, Pan 2, Pan 3, Pan4 y Pan 5 (Figura 2) de acuerdo con la accesibilidad a la orilla del cuerpo de agua, siendo la distancia entre puntos de muestreo de 311.42 metros en promedio (339.3 metros entre Pan 1 y Pan 2; 263.63 metros entre Pan 2 y Pan 3; 300.63 metros entre Pan 3 y Pan 4; 342.13 metros entre Pan 4 y Pan 5). Los puntos de colecta fueron seleccionados de acuerdo con el impacto por contaminación antropogénica en el área, siendo los primeros puntos Pan 1, Pan 2 y Pan 3 los más contaminados y Pan 4 y Pan 5 los menos contaminados. Fue realizada una única campaña de colecta debido al presupuesto destinado al estudio.

5.2. Colecta y almacenamiento de muestras de agua

Por cada punto de colecta fueron recolectadas tres réplicas de muestras de agua como sugerido en la literatura (Xing et al., 2022) y realizado un único evento de colecta. El sistema de filtrado consistió en una bomba peristáltica portátil marca Masterflex, a la cual se adaptó un sistema de tubos donde se encajaron tres filtros Sterivex-GP, además de un recipiente de descarte para el agua que ya había sido filtrada (Figura 3). Cada muestra de agua consistió en un volumen de 1 litro de agua. Las muestras se almacenaron en una botella estéril, y luego se transportaron en una caja térmica (Tecnopor) conteniendo hielo al Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía. Para minimizar la contaminación de las muestras, las botellas colectoras se esterilizaron previamente en una cámara UV y los equipos de muestreo se manipularán con guantes estériles. Es extremadamente necesario

usar guantes nuevos para manejar diferentes muestras y así evitar la contaminación cruzada. Para minimizar la degradación del ADN ambiental, las muestras de agua fueron filtradas antes de las 12 horas después de la recolección utilizando una bomba de vacío y filtros Sterivex-GP.

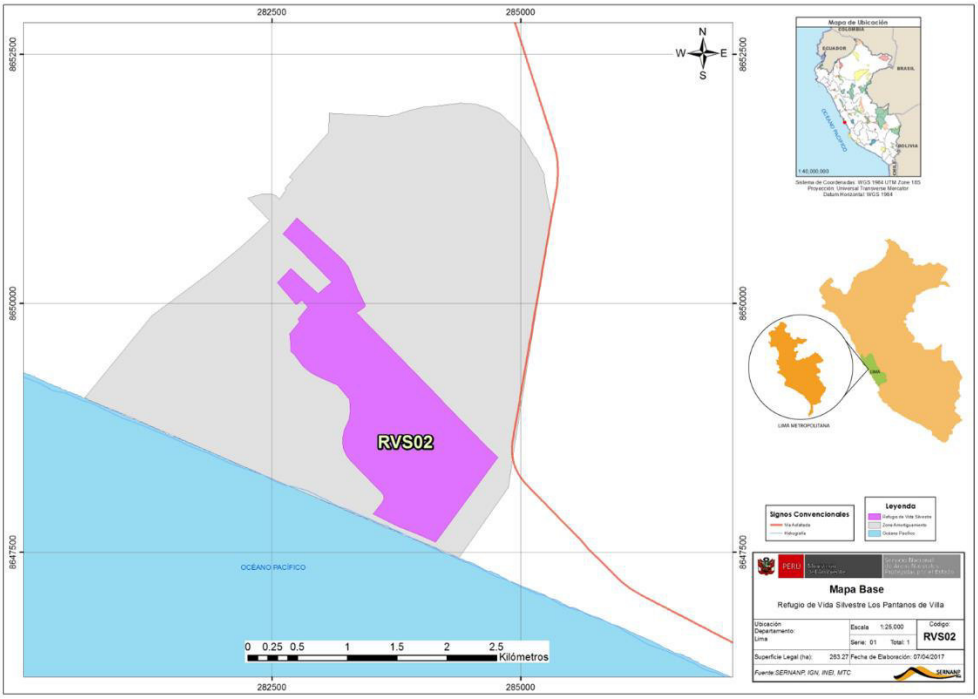


Figura 1. Mapa de ubicación de los Pantanos de Villa (SERNANP, IGN, MTC)

Figura 2. Mapa específico de ubicación de los puntos de colecta en la Laguna Mayor del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa.

Figura 3. Sistema de filtrado de muestras utilizando una bomba de vacío y filtros Sterivex.

5.3. Extracción de ADN.

Todas las superficies y materiales de laboratorio fueron esterilizados con lejía al 10%, seguido de etanol al 70%. Las pipetas se esterilizaron con hipoclorito de sodio

al 10%, seguido de etanol al 70% durante la extracción entre muestra y muestra. Fue utilizado el kit de extracción NucleoMagR DNA/RNA water (Macherey-Nagel). La secuenciación fue realizada en un secuenciador Illumina MiSeq en el Centro CU Boulder BioFrontiers Sequencing usando un kit v2 de 500 ciclos.

- **Etapa de lisis**

Fueron adicionados 900 uL de Buffer C1 insertando la punta de la pipeta a través de la entrada de la unidad del filtro. Los filtros fueron sellados en ambos extremos utilizando parafilm. Luego fueron homogenizados en el vórtex por cinco minutos a velocidad máxima para que se desprenda todo el ADN del papel, incubados a 70°C por cinco minutos y nuevamente homogenizados en el vórtex por cinco minutos a velocidad máxima. Para remover el volumen lisado, se insertó una jeringa estéril vacía por la abertura de entrada del filtro y siendo el volumen lisado colocado en un tubo nuevo y estéril.

- **Unión del ADN por beads magnéticas**

Un total de 450 uL fue transferido a un nuevo tubo estéril y luego adicionado 25 uL de NucleoMag B-*Beads* y 475 uL de Binding Buffer MWA2. El volumen total fue mezclado obtenido utilizando una pipeta, succionando y soltando el volumen seis veces. Luego fue homogenizado en shaker por cinco minutos a temperatura ambiente, evitando concentraciones de *beads* en el fondo del tubo. El tubo es colocado en el separador magnético por cinco minutos hasta que todas las *beads* se unan a los magnetos.

- **Lavado**

Luego de remover el tubo del separado magnético, fueron adicionados 850 uL de Buffer MWA3, siendo homogenizado el volumen durante dos minutos a temperatura ambiente para resuspender las *beads*. Nuevamentees colocado el tubo en el separador magnético por cinco minutos, removido el sobrenadante y

descartardo. Este paso de lavado fue repetido un total de dos veces con el Buffer MWA3 y una vez con el Buffer MWA4. Con el tubo dentro del separador magnético, abrir la tapa del tubo y taparlo con un pedazo de papel limpio (puede ser papel toalla) por 15 minutos.

- **Elución del ADN**

Los tubos son removidos del separador magnético, luego son adicionados 100 ml de agua de PCR al tubo, utilizada para resuspender las *beads* por cinco minutos en el termomixer a temperatura ambiente. Nuevamente fueron colocados los tubos en el separador magnético por dos minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, etiquetado y congelado.

A partir de este punto las muestras con el ADN extraído fueron enviadas al Centro CU Boulder BioFrontiers Sequencing vía servicio comercial a través de la empresa MASED (Medio ambiente, salud y educación representaciones S.A.C.).

5.4. Amplificación, preparación de la biblioteca genómica y secuenciación.

Se amplificó por PCR una región de tamaño de 130 pb del gen Citocromo c oxidasa (COI) de cada muestra de ADN genómico utilizando los *primers* MiniBar-Mod-F y MiniBar-Mod-R (Berry *et al.*, 2015). Tanto los *primers* forward como los reverse también contenían una secuencia adaptadora de 5' para permitir la indexación y secuenciación. Cada reacción de PCR tuvo un volumen final de 25 µL, en donde fueron incluidos de acuerdo con las especificaciones del kit Promega (n.o M5133, Madison, WI) 12,5 µl de solución maestra, 0,5 µM de cada *primer*, 1,0 µl de ADN genómico y 10,5 µl de ADNasa/RNasa H2O libre. El ADN se amplificó por PCR usando desnaturalización a 94ºC durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94ºC, 20 segundos a 45ºC y 30 segundos a 72ºC, seguido de un alargamiento final a 72ºC durante 1 minuto.

5.5. Visualización en gel de agarosa y Purificación de amplicones

Para determinar el tamaño del amplicón y la eficacia de la PCR, cada reacción fue visualizada usando un gel de agarosa al 2% con 5 µl de cada muestra como entrada. Luego los amplicones se limpiaron incubando con Exo1 / SAP durante 30 minutos a 37ºC seguido de inactivación a 95ºC durante cinco minutos y se almacenaron a -20ºC.

5.6. Indexación por PCR

Se realizó una segunda ronda de PCR para dar a cada muestra una secuencia de index de 12 nucleótidos única. La PCR de indexación incluyó Promega Master mix, 0,5 µM de cada cebador y 2 µl de ADN molde (amplicón limpiado de la *primer*a reacción de PCR) y consistió en una desnaturalización inicial de 95°C durante tres minutos, seguida de ocho ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos.

Los amplicones indexados finales de cada muestra se limpiaron y normalizaron usando placas de normalización SequalPrep (Life Technologies, Carlsbad, CA). Se purificaron y normalizan 25 µl de amplicon de PCR con el kit de normalización SequalPrep de Life Technologies (n.º de cat. A10510-01) de acuerdo con el protocolo del fabricante. A continuación, las muestras se agruparon añadiendo 5µl de cada muestra normalizada a la agrupación.

5.7. Secuenciación

Los grupos de bibliotecas de muestras se enviaron para secuenciar en un secuenciador Illumina MiSeq (San Diego, CA) en el Centro de secuenciación CU Boulder BioFrontiers usando el kit v2 de 500 ciclos.

5.8. Bioinformática

El resultado de la secuenciación y la calidad de *reads* se verificaron con FastQC v0.11.8, y las *reads* se demultiplexaron con Illumina-utils v2.6 (iu-demultiplex) con la configuración predeterminada. Las secuencias de cada muestra se fusionaron usando la opción -fastq_mergepairs en Usearch v11.0.667 (Edgar, 2010). Fueron eliminadas las secuencias del *primer* forward (5'-TCCACTAATCACAAAGAYATYGGYAC-3') y el *primer* reverse (5'-AGAAAATCATAATRAANGCRTGNGC-3'), de la misma manera fueron descartadas secuencias con una longitud por debajo de 115 pb y por encima de 145 pb utilizando Cutadapt v1.18 (Martin, 2011). El filtrado de errores de secuenciación esperados se implementó en Usearch descartando *reads* de baja calidad (max_ee = 0.5) (Edgar y Flyvbjerg, 2015). En lugar de agrupar OTUs, las *reads* analizadas por la calidad de la secuenciación y los errores de PCR se eliminaron utilizando el algoritmo unoise3 con un valor alfa de 5 (Edgar, 2016). Esta eliminación de ruido se aplica a cada muestra individual, y las variantes de secuencia exacta (ESV) se compilaron en una tabla de ESV que incluye secuencias y recuentos de lectura para cada muestra. La taxonomía se asignó a cada ESV comparándolas con los datos de referencia de GenBank (Benson *et al.*, 2015) utilizando usearch_global con –maxaccepts 0 y –maxrejects 0 para garantizar la precisión del mapeo. La taxonomía de consenso se genera a partir de las tablas de resultados, considerando primero las coincidencias del 100% y luego descendiendo en pasos del 1% hasta que sea posible obtener resultados para cada ESV. En el respectivo grupo para un intervalo de 1%, se considera la taxonomía presente en al menos el 90% de los resultados o se informa una NA si la misma ESV coincide con varios taxones.

5.9. Análisis de datos

Las Variantes de Secuencia exactas (ESV) y las asignaciones taxonómicas fueron realizadas comparando con la base de datos del Genbank. Las ESVs que fueron obtenidas a partir de los filtros de control blanco fueron retiradas del análisis.

Se calculó para cada lugar de muestreo los estimadores de riqueza no paramétricos Chao1, Jackknife1 y Bootstrap mediante el programa Estimate S versión 7 (Cowell, 2004) con las mismas opciones preestablecidas del programa. Así mismo se calcularon comparativamente los índices de diversidad de Shannon-Wiener (H') (bits·ind), el índice de Simpson (C) y el índice de equidad de Pielou (J´).

La metodología empleada se resume en el flujograma de la Figura 4.

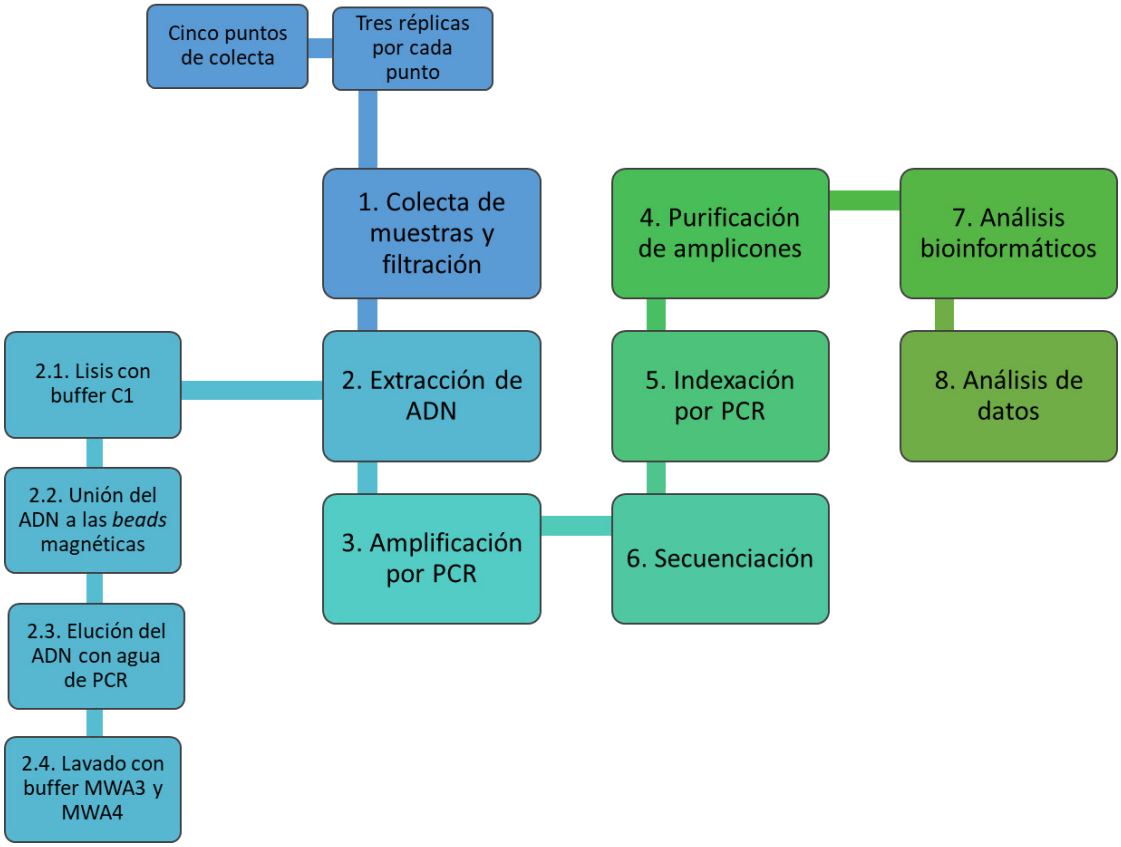


Figura 4. Flujograma de la metodologia de ADN ambiental aplicada para la Laguna Mayor de Pantanos de Villa.

VI. RESULTADOS

Los costos de los materiales consumibles fueron agrupados en cuatro grupos: muestreo (botellas estériles, caja de protección térmica, hielo y transporte de filtros al laboratorio), filtración (bomba de vacío y filtros Sterivex-GP de 0.22 µm de abertura de poro), extracción (Kit nucleomag ADN/RNA water x 96 prep. - Macherey Naagel) y secuenciación de las muestras (incluyendo en este último el análisis de los datos brutos o *raw data*). Se considera costo en soles por unidades, excepto para los filtros Sterivex-GP en donde se consideran 15 unidades. El tiempo empleado en la colecta de las muestras fue de un día, la filtración pudo realizarse en dos días, la extracción se realizó en un mismo día y la secuenciación un periodo de dos meses (incluyendo envío de muestras, montaje de biblioteca genómica y procesamiento de secuencias) (Tabla 1).

Tabla 1. Materiales de consumo para la obtención de ADN ambiental en la Laguna Mayor de los Pantanos de Villa.

Etapa	Material	Costo (Nuevos soles)	Tiempo (días)
Colecta de muestras	Botellas estériles	30	1
	Caja de protección térmica	30	
	Hielo	30	
	Transporte de muestras	30	
Filtración	Filtros Sterivex-GP 0.22 µm (15 unidades)	231	2
Extracción	Kit de extracción de ADN de muestras acuosas	2650	1
Secuenciación	Secuenciación	34076	60
	total	37569	64

Fueron caracterizados todos los puntos de colecta (figura 5). La Laguna Mayor está bordeada por vegetación, en su mayoría presencia de totora. En la *primer*a estación de muestreo (Pan1), se detectó la presencia de aves carroñeras con nidos y turbidez en el agua; en la segunda estación (Pan2) se detectó la presencia de residuos sanitarios, fue posible visualizar pequeños peces, islas de totora, grama de color ligeramente verde; en la tercera estación (Pan3) se observó presencia de residuos de totora y color del agua ligeramente negra; en la cuarta estación (Pan4) se observó también la presencia de totora y color del agua ligeramente verde; en la quinta estación de muestreo (Pan5) pudo observarse la presencia de totora, color del agua ligeramente verde.

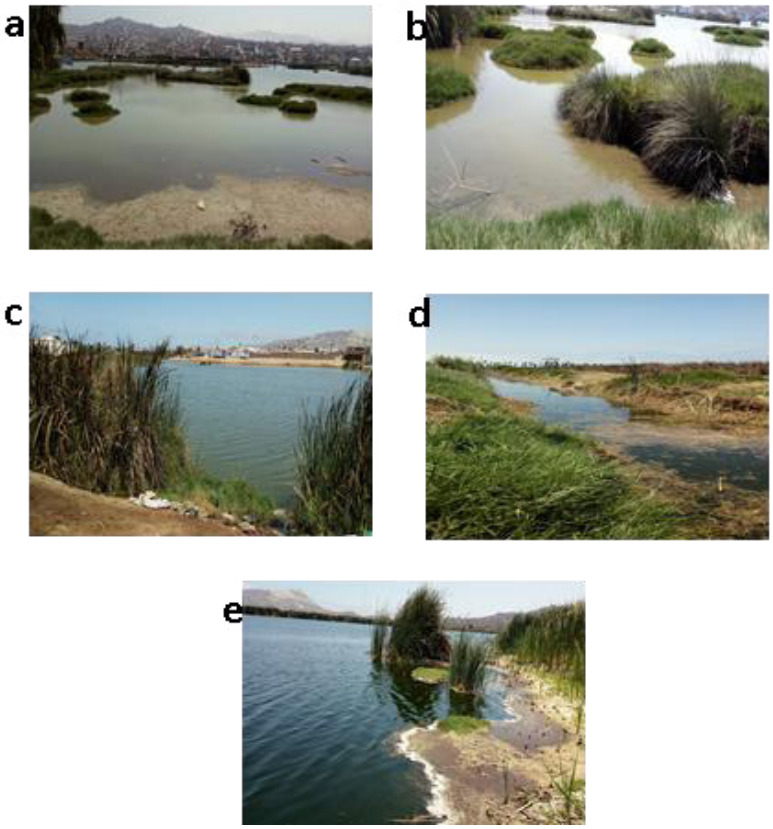


Figura 5. Puntos de colecta en la laguna Mayor del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa. Puntos de muestreo: a) Pan 1, b) Pan 2, c) Pan 3, d) Pan 4 y d) Pan 5.

Los puntos de muestreo de agua (Pan1, Pan2, Pan3, Pan4 y Pan5) tuvieron características fisicoquímicas similares con un promedio de pH de 5,92 y desviación estándar (SD) de 0,53, conductividad eléctrica (CE) de 7,858 y SD de 0,41, sólidos totales (ST) de 1 y SD de 0, temperatura (°C) de 32,525 y SD de 0,42, oxígeno disuelto de 52,75 y SD de 2,62, estando los puntos Pan1 y Pan2 notoriamente más impactados (Tabla 2). Cada muestra de agua contenía un volumen total de un litro, sin embargo, debido a la gran concentración de partículas disueltas (entre materia orgánica e inorgánica), únicamente fue posible filtrar un volumen máximo de 90 ml por cada muestra. Los volúmenes fueron filtrados con la bomba de vacío utilizando filtros Sterivex-GP hasta visualizar que ya no era filtrado ningún volumen en un periodo de una hora. En promedio, el tiempo de filtrado fue de cuatro horas por cada muestra.

Tabla 2. Parámetros físicos y químicos de la laguna Mayor en los Pantanos de Villa para los cinco puntos de muestreo (Pan 1, Pan 2, Pan 3, Pan 4 y Pan 5).

Parámetros	Pan 1	Pan 2	Pan 3	Pan 4	Pan 5
S	12°12'19.70"	12°12'11.31"	12°12'14.72"	12°12'22.80"	12°12'34.15"
O	76°59'50.31"	76°59'43.12"	76°59'35.58"	76°59'29.62"	76°59'27.82"
UTM	18L0282576	18L0282923	18L0283243	18L0283402	18L0282730
	8650074	8650231	8650007	8649523	8649678
pH	5.2	5.5	6.3	6.3	6.3
CE (µS/cm)	8.41	8.09	7.55	7.4	7.84
ST (ppm)	1	1	1	1	1
T° (°C)	32.6	32.1	32.1	32.3	33.1
OD (mg/L)	3.2	2.2	4.6	8.1	7.6
Descripción física	Aves carroñeras, nidos, turbidez del agua. Presencia de resíduos de alimentos, plásticos.	Residuos sanitários, pequenos peces, islas de totora, grama de color verde.	Residuos de totora, color del agua ligeiramente negra.	Presencia de totora, color del agua verde.	Presencia de totora, color del agua verde.

Los análisis de secuencias a través de la plataforma Illumina MiSeq generaron 1 447 795 *reads*, representando 14 ESVs a nivel de Phylum, 21 a nivel de Clase, 27 a nivel de Orden, 31 a nivel de Familia, 36 a nivel de género y 37 ESVs identificadas a nivel de especie (Figura 6; Tabla 3). Esta riqueza incluye únicamente aquellas asignaciones taxonómicas donde las secuencias hicieron match con únicamente una especie, a las que llamaremos "asignaciones únicas". El total de las asignaciones taxonómicas fueron divididas en cuatro grandes grupos: aves, peces, fitoplancton y zooplancton. En la tabla 4 están listados todos los taxones que fueron registrados como asignaciones no únicas. Se comparó el número de secuencias obtenidas por cada réplica como asignaciones únicas en cada punto de colecta (Figura 7).

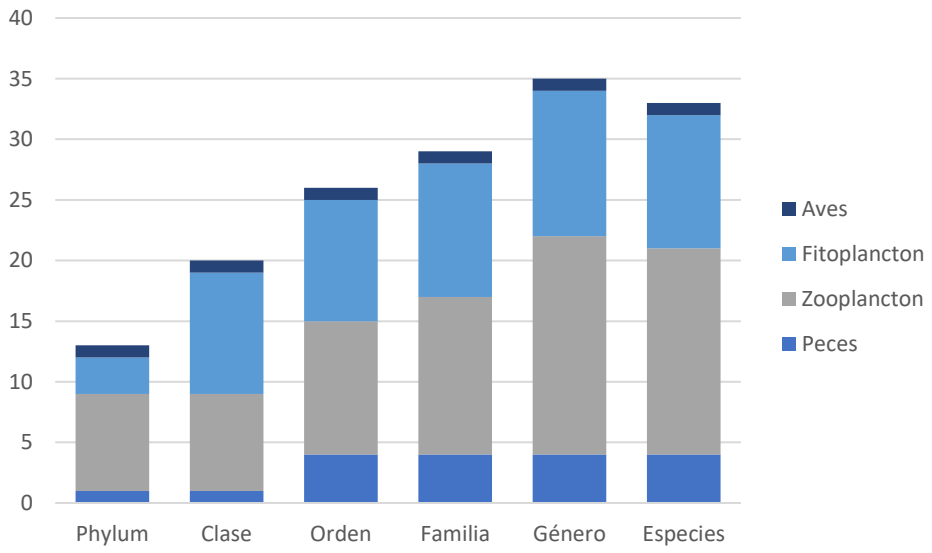


Figura 6. Número de asignaciones únicas obtenidas para cada categoría taxonómica por cada comunidad biológica.

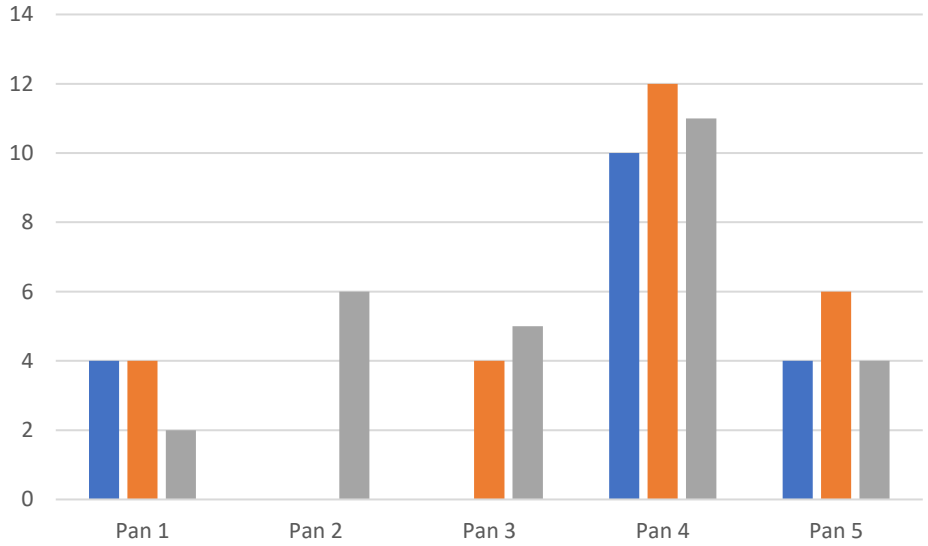


Figura 7. Comparación del número de espécies asignadas para cada réplica en cada punto de colecta. Fueron consideradas solo asignaciones únicas, las cuales no fueron registradas en Pan 2A y Pan 2B.

Tabla 3. Composición taxonómica de las asignaciones únicas encontradas para la biota acuática detectada en la Laguna Mayor.

GRUPO	PHYLUM	GENERO	ESPECIE	PORCENTAJE DE SIMILARIDAD	N° DE ESPECIES	N° DE *READS*
Aves	Chordata	*Phleocryptes*	*Phleocryptes melanops*	100	1	22
Peces	Chordata	*Xiphophorus*	*Xiphophorus maculatus*	100	1	15
Zooplancton	Arthropoda	*Apocyclops*	*Apocyclops spartinus*	95,3	1	2913
	Cnidaria	*Hydra*	*Hydra vulgaris*	76,7	1	9
	Cnidaria	*Stylophora*	*Stylophora pistillata*	72,2	1	27
	Discosea	*Vexillifera*	*Vexillifera bacillipedes*	82	1	9
	Discosea	*Parvamoeba*	*Parvamoeba rugata*	75,9	1	973
	Evosea	*Squamamoeba*	*Squamamoeba japonica*	83,5	1	40
	Gastrotricha	*Chaetonotus*	*Chaetonotus aemilianus*	97,6	1	356
	Mollusca	*Kurtiella*	*Kurtiella aff. Bidentata*	75,9	1	1048
	Rotifera	*Macrochaetus*	*Macrochaetus collinsi*	92,9	1	40
	Rotifera	*Brachionus*	*Brachionus caudatus*	92,9	1	1161
	Rotifera	*Neomysis*	*Neomysis intermedia*	84,3	1	36
	Rotifera	*Filinia*	*Filinia sp.*	84,3	1	1172
	Rotifera	*Cephalodella*	*Cephalodella cf. gibba*	79,5	1	8
	Rotifera	*Keratella*	*Keratella cochlearis*	78,7	1	40

	Tubulinea	*No definido*	*No definido*	75,9	1	74
	No definido	*Diphylleia*	*Diphylleia rotans*	100	1	14
	No definido	*Thecamonas*	*Thecamonas trahens*	94,7	1	10
	No definido	*Botryochytrium*	*Botryochytrium radiatum*	78,9	1	208
	No definido	*Cyanophora*	*Cyanophora paradoxa*	78,2	1	141
	No definido	*Nebela*	*Nebela guttata*	75,2	1	16
Fitoplancton	Bacillariophyta	*Lithodesmium*	*Lithodesmium undulatum*	85,7	1	8
	Bacillariophyta	*Nephroselmis*	*Nephroselmis olivacea*	72,2	1	226
	Chlorophyta	*Dolichomastix*	*Dolichomastix tenuilepis*	77,4	1	13
	Chlorophyta	*Monomastix*	*Monomastix sp.*	75,9	1	73
	Chlorophyta	*Tinocladia*	*Tinocladia crassa*	70,7	1	9
	Chlorophyta	*Padina*	*Padina haitiensis*	66,9	1	1073
	No definido	*Guillardia*	*Guillardia theta*	91,7	1	8
	No definido	*Diacronema*	*Diacronema viridis*	89,5	1	1118
	No definido	*Nitzschia*	*Nitzschia palea*	86,5	1	134
	No definido	*Cyanophora*	*Cyanophora paradoxa*	78,2	1	6951
	No definido	*Tetraselmis*	*Tetraselmis subcordiformis*	75,2	1	8
	No definido	*Jaagichlorella*	*Jaagichlorella roystonensis*	72,2	1	59

Tabla 4. Composición taxonómica de las asignaciones no únicas encontradas para la biota acuática detectada en la Laguna Mayor.

GRUPO	PHYLUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	PORCENTAJE DE SIMILARIDAD	N° DE ASIGNACIONES	N° DE *READS*
Fitoplancton	Chlorophyta					80.5	2	10
Vertebrados	Chordata	Actinopterygii	Cichliformes	Cichlidae	*Oreochromis*	100	46	10
	Chordata	Actinopterygii	Cichliformes	Cichlidae		100	5	75
Zooplancton	Arthropoda	Arachnida	Araneae	Philodromidae	*Philodromus*	75.2	6	14509
	Bryozoa	Gymnolaemata				83.5	3	75
	Discosea					78.9	2	8
	Rotifera	Monogononta	Ploima	Brachionidae	*Brachionus*	100	23	1176
	Rotifera	Monogononta	Ploima	Brachionidae	*Brachionus*	99.2	31	1418
	Rotifera	Monogononta	Ploima	Brachionidae	*Brachionus*	95.3	2	772
	Rotifera	Monogononta	Ploima	Brachionidae	*Brachionus*	89	2	164
	Rotifera	Monogononta	Ploima	Brachionidae	*Brachionus*	80.3	6	45714
	Rotifera	Monogononta	Ploima	Brachionidae	*Brachionus*	80.3	24	3259
	Rotifera	Monogononta	Ploima	Brachionidae	*Brachionus*	79.5	24	11693
	Rotifera	Monogononta	Ploima	Brachionidae	*Brachionus*	78.7	24	16
	Rotifera	Monogononta	Ploima			86.6	5	18

Rotifera	Monogononta	Ploima			83.5	4	5636
Rotifera	Monogononta	Ploima			82.7	8	12822
Rotifera	Monogononta	Ploima			82.7	6	8739
Rotifera	Monogononta	Ploima			77.2	4	20
Rotifera	Monogononta				78.7	3	22
Tubulinea	Elardia	Arcellinida	Hyalospheniidae	*Nebela*	85	2	27
Tubulinea	Elardia	Arcellinida	Hyalospheniidae		79.7	4	10
unk_phylum	Bigyra	Thraustochytrida	Thraustochytriaceae	*Thraustochytrium*	95.5	2	15
unk_phylum	Bigyra	Thraustochytrida	Thraustochytriaceae	*Schizochytrium*	81.2	2	192
unk_phylum	Bigyra	Thraustochytrida	Thraustochytriaceae	*Aurantiochytrium*	75.9	3	73
unk_phylum	Bigyra	Thraustochytrida	Thraustochytriaceae		79.7	3	38
unk_phylum	Bigyra	Thraustochytrida	Thraustochytriaceae		78.2	2	25
unk_phylum	Bigyra	Thraustochytrida	Thraustochytriaceae		72.9	3	11

Se comparó el porcentaje de similaridad de las ESVs con asignación única obtenidas en comparación con la base de datos del NCBI (Figura 8). Para el grupo de peces, de un total de cuatro ESVs todas tuvieron un porcentaje mayor a 97%. Para la comunidad zooplanctónica, de un total de 102 ESVs, únicamente 19 tuvieron similaridad mayor a 97% y 73 secuencias tuvieron similaridad mayor a 80%. Para la comunidad fitoplanctónica de un total de 44 ESVs, 19 secuencias tuvieron similaridad mayor a 80% y 39 secuencias tuvieron similaridad mayor a 70%.

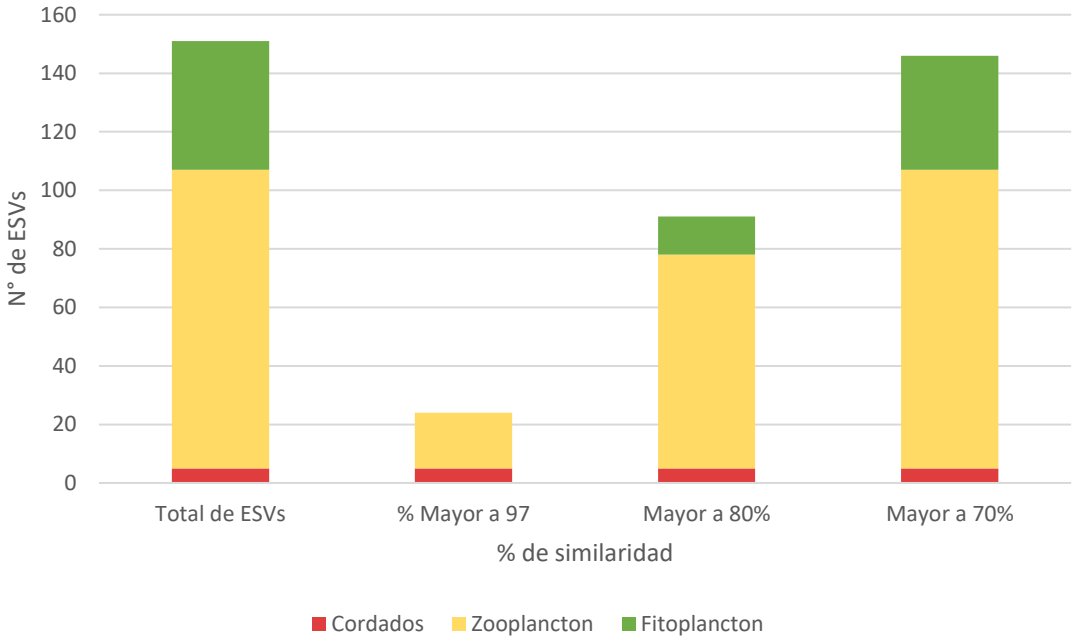


Figura 8. Comparación del porcentaje de similaridad de las ESVs encontradas después de la alineación de secuencias con bases de datos de nucleótidos NCBI.

Entre el Phylum Chordata fue posible detectar una especie de ave *Phleocryptes melanops* y una especie de pez de agua dulce *Xiphophorus maculatus* como asignaciones únicas. También se detectaron cinco ESVs representando a la Familia Cichlidae y 46 ESVs representando al género *Oreochromis* (tabla 4). Para los vertebrados, todas las asignaciones únicas pudieron llegar a nivel de especie con un match promedio en relación a la biblioteca de referencia del NCBI del 99.68%.

6.1. Comunidad zooplanctónica

En la comunidad biológica del zooplancton la abundancia de *reads* (Figura97) muestra que fueron incluidos los Phylum Arthropoda (*Apocyclops spartinus*), Cnidaria (*Hydra vulgaris, Stylophora pistillata*), Discosea (*Parvamoeba rugata*), Evosea (*Squamamoeba japonica*), Gastrotricha (*Chaetonotus aemilianus*), Mollusca (*Kurtiella* aff. *bidentata*), Rotifera (*Neomysis intermedia, Macrochaetus collinsi, Brachionus caudatus, Keratella cochlearis, Cephalodella* cf. *gibba, Filinia* sp.) y Tubulinea (*Nebela guttata*). Para la comunidad del zooplancton, las asignaciones únicas pudieron llegar a nivel de especie con una similaridad promedio de 85%, excepto una secuencia identificada como de la Clase Arachnida con una similaridad promedio de 79.7%. Entre las asignaciones no únicas, fueron incluidos ocho ESVs a nivel de género representando a *Brachionus, Nebela* y *Philodromus*, cinco ESVs a nivel de Familia a Ploima, una ESV a nivel de Clase a Monogonta y una ESV a nivel de Phylum representando a Discosea.

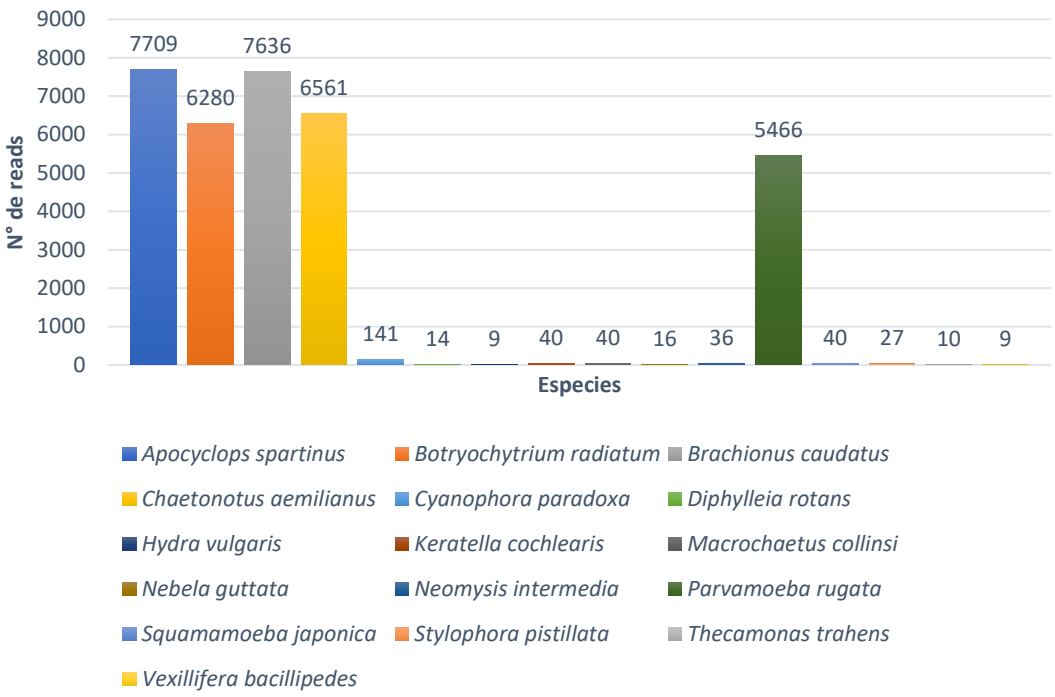


Figura 9. Abundancia de *reads* obtenidas para cada especie en la comunidad biológica del Zooplancton. Los números sobre las barras indican el número de secuencias obtenidas para asignaciones taxonómicas únicas.

La riqueza observada de 22 especies también coincide con el estimador no paramétrico Chao1. Por su lado el estimador Bootstrap estimó un valor de 26 especies (equivalente al 84.62% de las especies posibles), indicando que cuatro especies no estuvieron en el monitoreo. Sin embargo, Jackknife estimó un valor de 33 especies (equivalente al 66.66% de las especies posibles), indicando que faltaría monitorear 11 especies monitoreo (Figura 10).

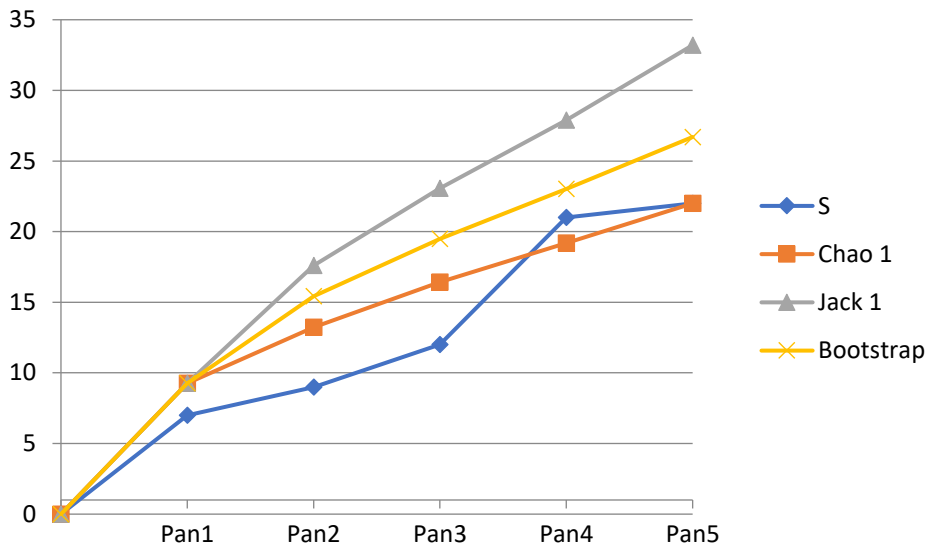


Figura 10. Curva de acumulación de especies de zooplancton y estimación de curvas de diversidad Chao1 (naranja), Jackknife (plomo) y Bootstrap (amarillo).

Fueron analizados también los valores de diversidad utilizando los índices (Tabla 5). De acuerdo con Margalef (1972) el índice de Shannon-Wiener con valores menores de 2 se interpreta como diversidad baja, de 2 a 3.5 diversidad media, y valores superiores a 3.5 como diversidad alta. Los valores obtenidos en todos los puntos de muestreo para zooplancton estuvieron entre 1.8 a 1.5. Con el índice de equidad de Pielou, que mide la proporción de la diversidad observada en relación con la diversidad esperada, se obtuvo un valor de 0.77. Con el índice de Simpson (el cual varía entre 0 y 1, siendo el valor de 1 el de máxima diversidad), se obtuvo un valor de 0.26.

Los índices de equidad buscan medir cuan diferente es la abundancia de las especies entre sí (Maurer y McGill, 2011). La interpretación de este valor va de 0 a 1, donde cuanto más próximo a 1 la abundancia de las especies tiende a ser igualmente abundante, siendo que cuanto más próximo a cero, la abundancia de las especies tiende a ser distinta entre ellas. En la Tabla 5, podemos observar, el índice de equidad de Pielou es menor en Pan 4 (0,64) indicando una menor

similaridad entre las abundancias de especies, y alcanza un valor mayor para la Pan 2 (0,88) indicando que las abundancias entre especies son más similares.

Tabla 5. Índices de diversidad del zooplancton en Pantanos de Villa.

Punto de muestreo	Riqueza observada S	N° de reads N	Equidad de Pielou J'	Shannon H'(loge)	Simpson Lambda
Pan1	7	774	0,7911	1,539	0,291
Pan2	6	510	0,8757	1,569	0,2313
Pan3	7	598	0,682	1,327	0,378
Pan4	17	4799	0,6438	1,824	0,2245
Pan5	7	1596	0,8509	1,656	0,2121

Fueron encontradas un total de 19 ESVs representando a seis phylum, nueve clases, 11 órdenes, 14 familias y 19 géneros. Estos resultados se compararon con lo obtenido por Iannacone y Alvariño (2007) (Figura 11), donde la comunidad zooplanctónica fue muestreada utilizando una red manual de malla Nytal de 75mm de abertura de poro, siendo filtrado un volumen total entre 8 a 20 litros. Estos autores realizaron posteriormente una identificación taxonómica siguiendo literatura publicada para cada grupo.

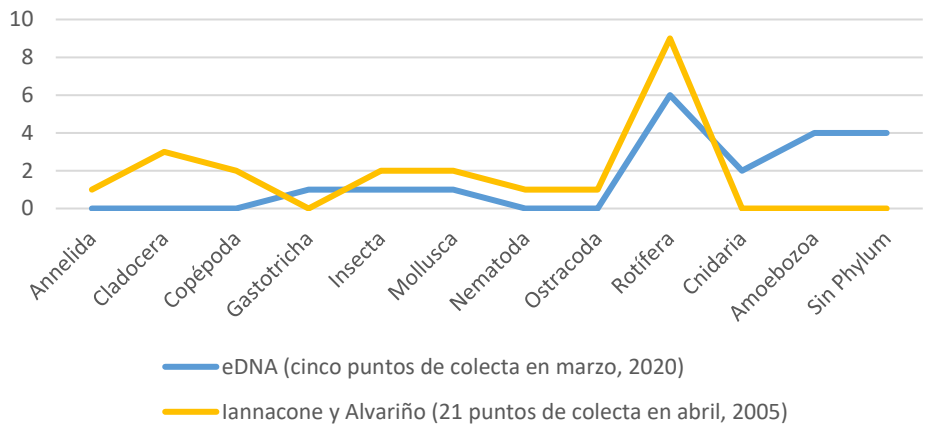


Figura 11. Comparación de riqueza de especies de zooplancton por phylum obtenidas con ADN ambiental y por Iannacone y Alvariño. Azul: colecta de ADN ambiental realizada en marzo de 2021, Amarillo: Iannacone y Alvariño en abril del 2005.

6.2. Comunidad fitoplanctónica

En la comunidad biológica de fitoplancton la abundancia de *reads* (Figura 12) muestra que fueron incluidos los Phylum Bacillariophyta (*Lithodesmium undulatum, Nitzschia palea*), Chlorophyta (*Nephroselmis olivacea, Dolichomastix tenuilepis, Jaagichlorella roystonensis, Tetraselmis subcordiformis*) y Haptista (*Diacronema viridis*). Las asignaciones únicas pudieron llegar a nivel de especie con una media del porcentaje de similaridad de 80.34%.

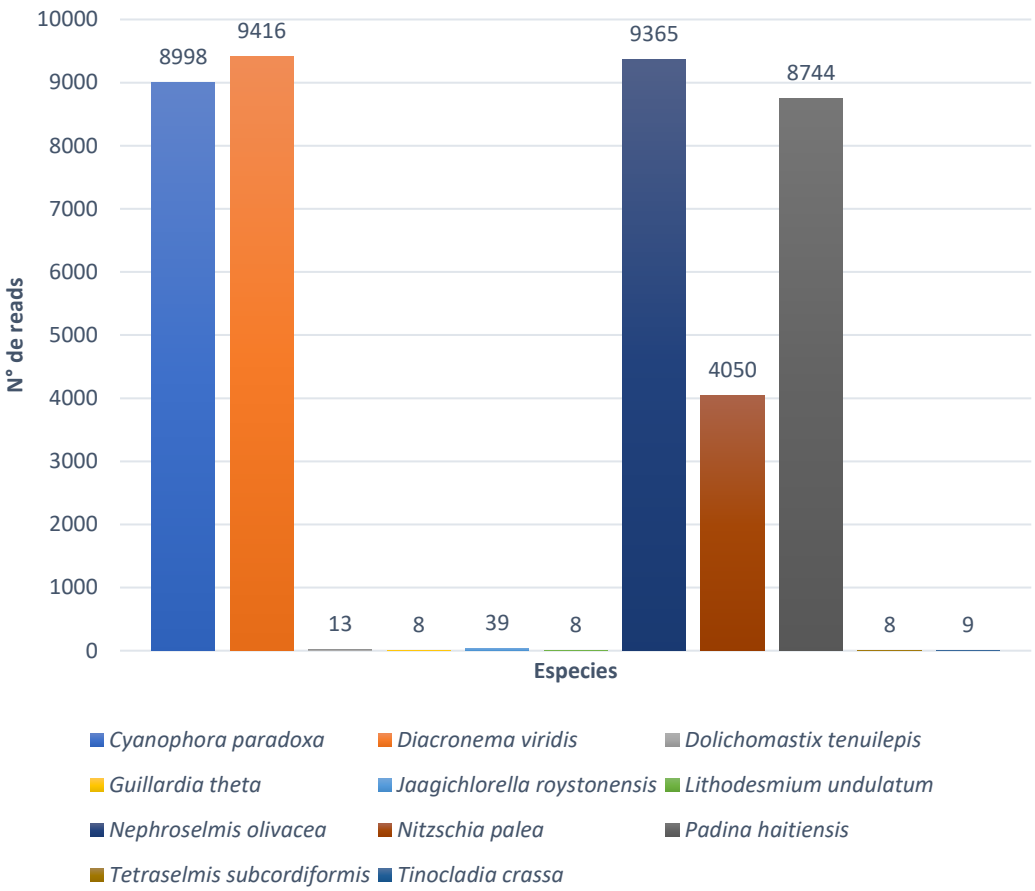


Figura 12. Abundancia de *reads* obtenidas para cada especie en la comunidad biológica fitoplanctónica. Los números sobre las barras indican el número de secuencias obtenidas para asignaciones taxonómicas únicas.

La riqueza observada en las cinco estaciones brinda un total de 12 especies. Las curvas de acumulación (Figura 13) no alcanzaron la asíntota en ninguno de los estimadores utilizados, sin embargo, el estimador Chao1 coincidió con la riqueza observada de 12 especies (equivalente al 100% de las especies posibles). Los otros dos estimadores mostraron valores mayores a lo observado: Jackknife estimó 18 especies (equivalente al 66.67% de las especies posibles). es decir que seis especies no habrían sido monitoreadas; Bootstrap estimó 15 especies (equivalente al 80% de las especies posibles), es decir tres especies de la comunidad fitoplanctónica no habrían sido monitoreadas en este estudio

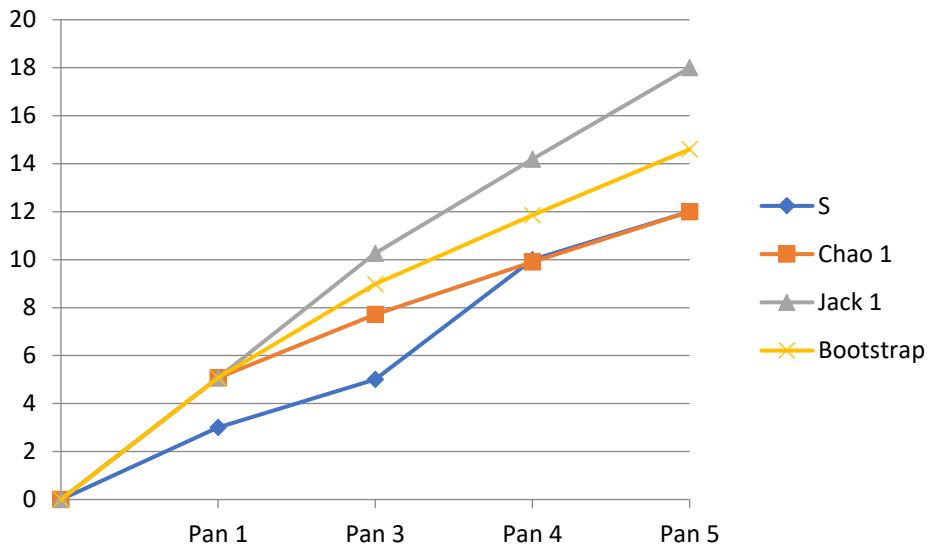


Figura 13. Curva de acumulación de especies de fitoplancton y estimación de curvas de diversidad Chao1 (naranja), Jackknife (plomo) y Bootstrap (amarillo).

Fueron analizados también los valores de diversidad de fitoplancton reflejados por los índices (Tabla 6). Los valores obtenidos en todos los puntos de muestreo varían para fitoplancton entre 1.3 y 0.8. Con el índice de equidad de Pielou, se obtuvo un valor promedio de 0.68. El índice de Simpson se obtuvo un valor promedio de 0.45. El índice de equidad de Pielou, muestra que para Pan 1 el valor de abundancia entre las especies es bastante similar (0,92) y en Pan 4 la abundancia entre especies (0,36) es menos similar entre todos los puntos de muestreo.

Tabla 6. Índices de diversidad del fitoplancton en Pantanos de Villa.

Punto de muestreo	Riqueza observada S	N° de *reads* N	Equidad de Pielou J'	Shannon H'(loge)	Simpson Lambda
Pan1	3	164	0,9254	1,017	0,3917
Pan3	5	498	0,7959	1,281	0,3365
Pan4	8	8346	0,3659	0,7608	0,632
Pan5	5	652	0,6564	1,056	0,4573

A partir de los resultados obtenidos, para la comunidad zooplanctónica, se dispone de evidencia suficiente para poder rechazar la hipótesis nula. Para la comunidad fitoplanctónica y la comunidad de vertebrados, no se dispone de evidencia suficiente para poder rechazar la hipótesis nula.

VII. DISCUSIÓN

Este trabajo constituye el primer paso para la aplicación de la técnica de ADN ambiental en la Laguna Mayor del Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa. El *metabarcoding* y el ADN ambiental, así como todas las metodologías de evaluación de la biodiversidad deben ser estandarizadas para que su implementación sea exitosa. Sin embargo, a diferencia del ADN *barcoding*, los análisis de metabarcoding son altamente complejos de estandarizar, dependiendo de la pregunta y del sistema a ser evaluado (Taberlet *et al.*, 2018). Los resultados de este trabajo han permitido obtener datos de riqueza de especies y al mismo tiempo estandarizar la técnica de ADN ambiental para el humedal costero Pantanos de Villa, pudiendo evaluar diversos aspectos cruciales como son: zona de colecta, el volumen de muestra que es posible filtrar, el rendimiento de la extracción de ADN ambiental a partir de los filtros Sterivex, los marcadores moleculares, la estrategia de secuenciación y el análisis bioinformático. La riqueza biológica obtenida ha corroborado parcialmente los registros previos para algunas comunidades biológicas acuáticas.

Se han evaluado varios de los aspectos de la ecología del eDNA, entre ellos la detectabilidad del eDNA, la cual depende del movimiento de las partículas debido a las corrientes, de los factores fisicoquímicos que puedan acelerar la degradación del ADN y la incorporación del material en las partículas del sustrato (Buxton *et al.*, 2017). En la Laguna Mayor, un cuerpo de agua léntico, de profundidad 1,5 m aproximadamente y sedimento areno-fangoso (Iannacone y Alvariño, 2007; Pulido *et al.*, 2018), el movimiento de partículas producto de corrientes no constituye un factor problemático (Buxton *et al.*, 2017). Asimismo, los valores de factores físicos como el pH ligeramente ácido de la Laguna Mayor de los Pantanos de Villa (pH promedio de 5.92), no constituye un valor que impacta significativamente el rendimiento del eDNA obtenido, como demostrado en ambientes controlados (Tsuji

et al., 2016; Strickler *et al.*, 2015). Más aún, con el objetivo de disminuir efectos negativos de la temperatura y actividad microbiana, fueron colectadas réplicas, se mantuvo la cadena de frío en el transporte de la muestra, las muestras se filtraron inmediatamente después de realizada la colecta y se realizó la extracción de ADN al día siguiente de filtrada la muestra.

La zona de colecta a nivel de orilla siguió lo previamente reportado por Hänfling *et al.* (2016) y Evans *et al.*, (2016), siendo las muestras de agua para ADN ambiental fueron todas colectadas en esta zona. Se obtuvieron tres réplicas por cada punto de colecta, consistiendo cada muestra de un volumen de 1 litro de agua. Se observó que de cada muestra fue posible filtrar 90 ml (noventa mililitros) en tres horas aproximadamente hasta que el filtro Sterivex se observaba completamente saturado. Estudios previos reportan haber obtenido volúmenes muy diferentes, dependientes estrictamente del ecosistema a ser evaluado siendo registrados volúmenes desde 300 ml a 100 L de agua (Taberlet *et al.*, 2018). Sin embargo, el rendimiento del filtrado se debe evaluar teniendo en cuenta las características del cuerpo de agua (cantidad de sólidos disueltos en la columna de agua, tipo de sustrato, etc.) y el mecanismo utilizado para realizar la filtración (Zinger *et al.*, 2016), siendo el filtrado en las muestras obtenidas de la Laguna Mayor dificultadas por el sedimento areno-fangoso y la gran producción de materia orgánica.

Entre los parámetros de control de calidad de las secuencias obtenidas, fue utilizado un umbral de similaridad de 97% de identidad para asignar al nivel de especie y 95 % de identidad al nivel de género, siendo las asignaciones a nivel de Familia, Orden, Clase y Phylum permitidas por encima de un umbral de identidad del 85 % de acuerdo con estudios recientes (Lamy et al., 2021). De esta forma, las comunidades planctónicas no fueron admitidas dentro del umbral aceptable para identificaciones a nivel de especie. Sin embargo, es importante indicar que descartar las secuencias obtenidas significaría subestimar la diversidad existente,

por otro lado, hacer el umbral de similaridad menos conservador podría llevarnos a hiper estimar la riqueza de especies. Este análisis debe llevarnos a enriquecer las bibliotecas de referencia ya existentes para las comunidades planctónicas como Genbank y BOLD databases para *COI* o SILVA databases para las subunidades 18S y 28S rRNA (Bucklin et al., 2016).

Los resultados de diversidad de la comunidad zooplanctónica obtenidos con la técnica de ADN ambiental fueron comparados con la evaluación previa realizada utilizando la malla Nytal y literatura especializada en la taxonomía de este grupo (Iannacone y Alvariño, 2006), siendo realizadas las colectas de eDNA en marzo (2021) y la colecta de Iannacone y Alvariño (2006) en abril. La riqueza de especies de zooplancton obtenida por la técnica de eDNA registró 19 especies, resultado comparable con lo obtenido en la tercera campaña del estudio reportado por Iannacone y Alvariño (2006) donde fueron registradas 21 especies. Estos resultados corresponden a todos los puntos de colecta evaluados y reflejan que con un menor esfuerzo de colecta se pudieron obtener resultados similares, siendo para el ADN ambiental evaluados cinco puntos de colecta únicamente en la Laguna Mayor, en comparación con la colecta de Iannacone y Alvariño (2006) que registra valores de riqueza correspondientes a 21 puntos de muestreo que incluyen la Laguna Mayor (seis puntos), Laguna Génesis (cuatro puntos), Laguna Marvilla (siete puntos) y otros cuatro puntos en el canal y pequeñas pozas de agua.

Por otro lado, en el grupo vertebrados, no fue posible detectar la mayoría de las especies previamente reportadas para el área en estudio, siendo los cordados el grupo con menor número de ESVs detectadas. Fue posible la detección de dos géneros de especies invasoras previamente reportadas por Castro *et al.* (1990) como *Xiphophorus* y *Oreochromis*, sin embargo, únicamente fue posible obtener secuencias únicas para *Xiphophorus maculatus*. La distribución nativa de *Xiphophorus maculatus* incluye Mexico, Belize, Guatemala y Honduras, y de

Oreochromis, África tropical y subtropical (Reis et al., 2003). Ambos géneros son altamente invasores debido a su tolerancia a disturbios ambientales, altamente oportunistas a nivel trófico, altas tasas de crecimiento y reproducción (Lagos et al., 2017).

Los índices de riqueza obtenidos en los puntos de muestreo varían para fitoplancton entre 1.3 y 0.8, y para zooplancton entre 1.8 a 1.5 indicando una diversidad baja. Sin embargo, estos resultados coinciden con estudios previos realizados para la comunidad zooplanctónica en RVSPV, donde se obtuvo el índice de Shannon-Wiener 1,7±0,7 para el mes de abril y de 1,85±0,6 como promedio de todas las campañas de colecta (Iannacone y Alvariño, 2007). De manera similar, el índice de equidad de Pielou, que mide la proporción de la diversidad observada, en relación con la diversidad esperada, nos da un valor de 0.68, próximo al valor obtenido de 0.74 en el mes de abril por Iannacone y Alvariño (2007). Es posible atribuir esta gran diversidad de ESVs en primer lugar al tamaño de poro de los filtros de ADN ambiental y a la menor pérdida de información de organismos frágiles por manipulación de las muestras (Djurhuus *et al.* 2018). Se resalta la importancia de obtener datos de la evaluación de las comunidades planctónicas (fitoplancton y zooplancton) en conjunto con parámetros fisicoquímicos, ya que son bioindicadores importantes de la metodología utilizada para evaluar la calidad de aguas continentales en Perú.

Para interpretar este rendimiento esta variación en el número de secuencias obtenidas para vertebrados y comunidades planctónicas, según Taberlet *et al.* (2018), se debe tener en consideración también las características de las comunidades biológicas a ser evaluadas, ya que la detectabilidad de especies depende también de la producción de ADN ambiental (cantidad de tejido o células liberadas en el medio ambiente). El contenido genético de peces y aves en una muestra ambiental está constituido por células o restos de células (mucosas,

escamas y ADN extracelular) producto del desprendimiento natural del tejido, cuya exposición a los factores fisicoquímicos hace que su persistencia en el medio ambiente sea menor. Lo contrario sucede para la comunidad planctónica, la cual está compuesta por organismos muy pequeños e incluso unicelulares, aumentando así la calidad y obtención de secuencias. Es así esperado que para el grupo de vertebrados exista una menor cantidad de moléculas de ADN en las muestras de agua obtenidas (Turner *et al.*, 2015).

La gran cantidad asignaciones únicas a nivel de especie del zooplancton en comparación con el fitoplancton se correlaciona con la elección del marcador, y la cantidad mínima de secuencias para vertebrados se correlaciona también con el bajo rendimiento de la filtración, dos aspectos cruciales para obtener resultados de buena calidad. La elección del marcador depende de tres condiciones: el grupo taxonómico objetivo, el nivel de degradación esperado de la muestra a ser amplificada y la cantidad de secuencias disponibles para esa región genómica en los bancos de datos (Taberlet *et al.*, 2018). Sin embargo, a pesar de que el marcador de la región variable del citocromo oxidasa subunidad I tiene una amplia base de datos a nivel mundial y han sido validados marcadores de tamaño de fragmento muy corto, no se han registrado un gran número de especies de vertebrados e invertebrados. Para futuras aplicaciones de eDNA metabarcoding en Pantanos de Villa se sugiere la incorporación de otros marcadores moleculares: para comunidades autótofras como el fitoplancton, regiones del gen ribosomal 16S rRNA y 18S rRNA han sido utilizadas con éxito (Zimmermann, Jahn y Gemeinholzer, 2011; Decelle et al., 2015). Asimismo, para vertebrados e invertebrados, se sugiere marcadores 12S (Neofish, tamaño de amplicon de 193 pb), con el objetivo de reducir la amplificación de bacterias y otros microeucariotos (Milan et al., 2021), consecuentemente, se hace necesario enriquecer las bibliotecas de referencia para estos fragmentos.

Es importante señalar algunas ventajas importantes de una evaluación a partir de ADN ambiental, resaltando que los inventarios biológicos a partir de métodos de colecta de ejemplares enteros, su posterior identificación taxonómica y construcción de la biblioteca de referencia como base de conocimiento es imprescindible para la aplicación exitosa de tecnologías de biología molecular. Entre ellas está que, en localidades de acceso remoto donde es posible realizar la filtración en campo, la cantidad de material y equipos necesarios para realizar las colectas incluye la bomba de filtrado, los filtros, equipo multiparámetro, guantes, rotuladores y cajas aislantes frías donde transportar los filtros, permitiendo disminuir los costos y esfuerzo de transporte de las muestras si lo comparamos con los métodos de captura por redes, mallas y trampas. Asimismo, el procedimiento de colecta de muestras de agua no utiliza sustancias nocivas para preservar las muestras, ya que las temperaturas frías son el medio más eficaz para minimizar la degradación del ADN (Sales et al., 2019).

Al hacer una comparación entre los costos que requieren la técnica de ADN ambiental y secuenciación masiva con los monitoreos a partir de redes, mallas o trampas e identificación taxonómica, y asumiendo el mismo número de puntos de colecta para ambos métodos, fue construida la Tabla 1. Aquí se especifican los precios basados en los gastos realizados por los consumibles empleados (excluyendo tubos de 1.5 µL, puntas y jeringas estériles que fueron material ya existente en el laboratorio). Si consideramos únicamente los valores monetarios empleados, los monitoreos realizados con redes, mallas o trampas se muestran ventajosos sobre la técnica de ADN ambiental. Sin embargo, entre las principales características que diferencian en términos de costo-beneficio a la técnica de eDNA y métodos de captura a partir de redes, mallas o trampas, se encuentra el esfuerzo y tiempo empleados, factores que usualmente no son considerados cuando se evalúan las ventajas que ofrecen las herramientas de biología molecular para

monitoreo de diversidad biológica. La aplicación de ADN ambiental requiere en promedio de dos personas independientemente del tamaño del cuerpo de agua a ser analizado, ya los métodos de colecta utilizando instrumentos para la captura de individuos enteros, implican un mayor número de personas para el manejo de las artes de pesca.

VIII. CONCLUSIONES

Se alcanzó con éxito el primer objetivo de este trabajo, que busca determinar los parámetros óptimos para la aplicación de ADN ambiental. La evaluación de los parámetros mostró que el volumen total filtrado, a pesar de ser menor a lo obtenido por otros autores, permitió recuperar un número importante de secuencias que coincidieron con los datos previamente reportados para las comunidades planctónicas. Asimismo, el método de extracción de ADN y la estrategia de secuenciación y los análisis bioinformáticos resultaron en un rendimiento alto, siendo obtenidas un importante número de ESVs, las cuales fueron identificadas a partir de los datos disponibles en bases de datos públicas.

Se demostró parcialmente el segundo objetivo que plantea verificar la eficacia de la técnica de eDNA para evaluar la diversidad de comunidades acuáticas de la Laguna Mayor. Los resultados de este trabajo pudieron corroborar la diversidad obtenida con eDNA de la comunidad del zooplancton. Asimismo, las secuencias obtenidas permitieron realizar la comparación obtenida a partir de eDNA y metabarcoding con la previamente registrada por Iannacone y Alvariño (2007) para la comunidad zooplanctónica. Sin embargo, para otras comunidades acuáticas de la Laguna Mayor, como los vertebrados, no fue posible obtener los mismos datos de diversidad de peces nativos previamente registrados, siendo posible detectar únicamente secuencias únicas correspondientes a *Xiphophorus maculatus* y género *Oreochromis*.

IX. RECOMENDACIONES

Este trabajo permite dar el primer paso a la estandarización de la técnica de ADN ambiental y debe ser seguido por la implementación de esta técnica como monitoreo de biodiversidad. Para ello, es fundamental la obtención de una línea base completa que permita la actualización de la biodiversidad de los ambientes acuáticos de RVSPV, de forma tal que se tenga una biblioteca genética de referencia altamente confiable y taxonómicamente corroborada.

Así, en ambientes altamente eutrofizados como la Laguna Mayor de Pantanos de Villa, se sugiere a partir de los resultados obtenidos que la colecta de muestras de agua se realice a mínimo dos metros de distancia de la orilla (hacia el centro de cuerpo de agua), para evitar la acumulación de materia orgánica que podría dificultar el proceso de filtración.

Para la aplicación del ADN metabarcoding en las comunidades fitoplanctónicas se recomienda el uso de marcadores que amplifiquen la región 16S rRNA, y para vertebrados se sugiere realizar ensayos con el marcador Neofish de la región 12S rRNA. Asimismo, este trabajo busca fortalecer la importancia de los estudios multidisciplinares, que sustenten a la taxonomía clásica como base fundamental para el desarrollo exitoso de las nuevas herramientas emergentes de la genética molecular. Dichas herramientas podrían ser aplicadas o extendidas en la evaluación y monitoreo de otras áreas protegidas en el país.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcón, G., & Iannacone, J. (2014). Artropofauna terrestre asociada a formaciones vegetales en El Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa, Lima, Perú. *The Biologist*, 12(2), 253–274.

Andersen, K., Bird, K.L., Rasmussen, M., Haile, J., Breuning-Madsen, H., Kjaer, K.H., Orlando, L., Gilbert, M.T.P. & Willerslev, E. (2012). Meta-*barcoding* of "dirt" DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. Mol. Ecol. 21, 1966–1979. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05261.x.

Aponte, H. & D. Ramírez. (2011). Humedales de la costa central del Perú: estructura y amenazas de sus comunidades vegetales. Ecol. apl. V.10 N.1 Lima ene./agos. 2011

Aponte, H. & A. Cano. (2013). Estudio florístico comparativo de seis humedales de la costa de Lima (Perú): actualización y nuevos retos para su conservación. Revista Latinoamericana de Conservación. Vol. 3(2): 15 – 27

Bassi, N., Kumar, M. D., Sharma, A., & Pardha-Saradhi, P. (2014). Status of wetlands in India: A review of extent, ecosystem benefits, threats and management strategies. Journal of Hydrology: Regional Studies, 2, 1–19. https://doi.org/10.1016/j.ejrh.2014.07.001

Berry, O., Bulman, C., Bunce, M., Coghlan, M., Murray, D. C., & Ward, R. D. (2015). Comparison of morphological and DNA *metabarcoding* analyses of diets in exploited marine fishes. Marine Ecology Progress Series, 540, 167-181.

Bobbink, R., Whigham, D. F., Beltman, B., & Verhoeven, J. T. A. (2006). Wetland Functioning in Relation to Biodiversity Conservation and Restoration. https://doi.org/10.1007/978-3-540-33189-6_1

Brauman, K.A., G.C. Daily & D.L. Freyberg. (2015). Impacts of Land-Use Change on Groundwater Supply: An ecosystem services assessment in Kona, Hawai'i. Journal of Water Resources Planning and Management (ASCE) 141(12): A4014001. DOI:10.1061/(ASCE)WR.1943-5452.0000495

Bucklin, A., Lindeque, P. K., Rodriguez-Ezpeleta, N., Albaina, A., & Lehtiniemi, M. (2016). Metabarcoding of marine zooplankton: prospects, progress and pitfalls. Journal of Plankton Research, 38(3), 393–400. doi:10.1093/plankt/fbw023

Buxton, A. S., J. J. Groombridge & R. A. Griffiths. (2017a). Is the detection of aquatic environmental DNA influenced by substrate type? PLoS ONE 12: e0183371.

Cano, A.; B. Leon & K. Young. (1993). Plantas vasculares de los Pantanos de Villa., Lima. En: Kahn, F., B. León y K. Young (comp). Las plantas acuáticas en las aguas continentales del Perú. Instituto Francés de Estudios Andinos (IFEA), Lima, Tomo 75, 177- 207 pp.

Carvalho, D. C., Neto, D. A. P., Brasil, B. S. A. F., & Oliveira, D. A. A. (2011). DNA *barcoding* unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. Mitochondrial DNA, 22(SUPPL. 1), 97–105. https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588219

Castro, E.; O. Huamán & H. Ortega. (1998). Ictiofauna de los Pantanos de Villa.: composición, abundancia y aspectos ecológicos. En: Cano, A. y K. Young (eds.). Los Pantanos de Villa, Biología y Conservación. Museo de Historia Natural - UNMSM. Serie de Divulgación N° 11: 74-83.

Cepeda, C.; Iannacone, J. & Alvariño, L. (2018). Conexión trófica entre las comunidades planctónicas y la avifauna silvestre en Pantanos de Villa, Lima, Perú. Biotempo, 15: 173-194.

Chirichigno F. & N. J. Vélez D. (1998).Clave para identificar los peces marinos del Peru (Seguenda edición, revidada y actualizada). Instituto del Mar del Peru, Publicación especial. 1-496, 4 pls.

Collins, R. A., Wangensteen, O. S., O'Gorman, E. J., Mariani, S., Sims, D. W., & Genner, M. J. (2018). Persistence of environmental DNA in marine systems. Communications Biology, 1(1), 185. https://doi.org/10.1038/s42003-018-0192-6

Colwell, R.K. (2004). ESTIMATES: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples, Version 7.5. Available at http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates. Persistent URL http://purl.oclc.org/estimates.

Decelle, J., S. Romac, R. F. Stern, E.M. Bendif, A. Zingone, S. Audic, M. D. Guiry, L. Guillou, D. Tessier, F. Le Gall, P. Gourvil, A.L. Dos Santos, I. Probert, D. Vaulot, C. de Vargas & R. Christen. (2015). PhytoREF: a reference database of the plastidial 16S rRNA gene of photosynthetic eukaryotes with curated taxonomy. Molecular Ecology Resources. 15:1435–1445. doi: 10.1111/1755-0998.12401.

Djurhuus, A., J. Port, C. J. Closek, K. M. Yamahara, O. Romero-Maraccini, K. R. Walz , D. B. Goldsmith, R. Michisaki, M. Breitbart, A. B. Boehm. (2017). Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels. Frontiers in Marine Science 4: 314. https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00314

Edgar R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26, 2460.

Edgar, R. C., & Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing *reads*. Bioinformatics, 31(21), 3476–3482. http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv401

Edgar, R. C. (2016). UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. bioRxiv. http://doi.org/10.1101/081257

Evans NT, B. P. Olds, M. A. Renshaw, C. R. Turner, Y. Li, C. L. Jerde & D. M. Lodge. (2016). Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA *metabarcoding*. Molecular Ecology Resources 16(1): 29–41. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12433

Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. Biology Letters, 4(4), 423–425. https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118

Fonseca, V.G., G.R.Carvalho, W. Sung, H.F. Johnson, D.M. Power, S.P. Neill, M. Packer, M.L. Blaxter, P.J.D. Lambshead, W.K. Thomas & S. Creer. (2010). Secondgeneration environmental sequencing unmasks marine metazoan biodiversity. Nat. Commun. 1, 98. http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1095.

Fujii, K., H. Doi, S. Matsuoka, M. Nagano, H. Sato & H. Yamanaka. (2019). Environmental DNA *metabarcoding* for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods. PLoS ONE, 14(1), 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210357

Gardner, R.C., S. Barchiesi, C. Beltrame, C.M. Finlayson, T. Galewski, I. Harrison, M. Paganini, C. Perennou, D.E. Pritchard, A. Rosenqvist & M. Walpole. (2015). State of the World's Wetlands and their Services to People: A compilation of recent analyses. Ramsar Briefing Note no. 7. Gland, Switzerland: Ramsar Convention Secretariat.

Guillén, G., E. Morales & R. Severino. (2003). Adiciones a la fauna de protozoarios de los Pantanos de Villa, Lima, Perú. Revista Peruana de Biología, 10(2), 175-182.

Hänfling B, L. Lawson Handley, D.S. Read, C. Hahn, J. Li, P. Nichols & I.J. Winfield. (2016) Environmental DNA *metabarcoding* of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. Molecular Ecology 25(13): 3101–3119. https://doi.org/10.1111/mec.13660

Harper, L. R., A. S. Buxton, H. C. Rees, K. Bruce, R.Brys, D. Halfmaerten & B. Hänfling, (2019). Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. Hydrobiologia, 826(1), 25–41. https://doi.org/10.1007/s10750-018-3750-5

Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L.Ball & R. de W. Jeremy. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of Royal Society of London, (270), 313–321. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218

Hebert, P. D. N. & T. R. Gregory. (2005). The promise of DNA *barcoding* for taxonomy. Systematic Biology, 54(5), 852–859. https://doi.org/10.1080/10635150500354886

Iannacone, J. & L. Alvariño. (2007). Diversidad y abundancia de comunidades zooplanctonicas litorales del humedal Pantanos de Villa, Lima, Peru. Gayana, 71(1), 49–65. https://doi.org/10.4067/s0717-65382007000100006

Iannacone, J., M. Atasi, T. Bocanegra, M. Camacho, A. Montes, S. Santos, H. Zuñiga & M. Alayo. (2010). Diversidad de aves en el humedal Pantanos de Villa, Lima, Perú: 2004-2007. Biota Neotropical, 10(2), 295–304. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032010000200031

Janse, J. H., A. A. van Dam, E. M. A. Hes, J. J. M.de Klein, C. M. Finlayson, A. B. G. Janssen & J. T. A. Verhoeven. (2019). Towards a global model for wetlands ecosystem services. Current Opinion in Environmental Sustainability, 36(September 2018), 11–19. https://doi.org/10.1016/j.cosust.2018.09.002

Jørgensen, T., K.H. Kjaer, J. Haile, M. Rasmussen, S. Boessenkool, K. Andersen, E. Coissac, P. Taberlet, C. Brochmann, L. Orlando, M.T.P. Gilbert & E. Willerslev. (2012b). Islands in the ice: detecting past vegetation on Greenlandic nunataks using

historical records and sedimentary ancient DNA Meta-*barcoding*: islands in the ice. Mol. Ecol. 21, 1980–1988. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365- 294X.2011.05278.x.

Kalesnik, F. a, & A. I. Malvárez. (2004). Las especies exóticas invasoras en los sistemas de humedales. El caso del Delta inferior del Río Paraná. INSUGEO, Miscelánea (Vol. 12).

Klymus, K. E., N. T. Marshall & C. A. Stepien. (2017). Environmental DNA (eDNA) *metabarcoding* assays to detect invasive invertebrate species in the Great Lakes. PLoS ONE, 12(5), 1–24. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177643

Kopylova E, J. A. Navas-Molina, C. Mercier, Z. Z. Xu, F. Mahé, Y. He, H-W. Zhou, T. Rognes, J. G. Caporaso, R. (2016). Knight Open-source sequence clustering methods improve the state of the art. mSystems. 1:e00003–15.

Kumar, R., R. McInnes, C.M. Finlayson, N. Davidson, D. Rissik & S. Paul. (2020). Wetland ecological character and wise use: Towards a new framing. Marine and Freshwater Research A–E. doi.org/10.1071/MF20244.

Lagos, M. E., C. R. White & D. J. Marshall. (2017). Do invasive species live faster? Mass-specific metabolic rate depends on growth form and invasion status. Funct Ecol. 31: 2080– 2086. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12913

Lamy T., K. Pitz, F. Chavez, C. E. Yorke, R. J. Miller. (2021). Environmental DNA reveals the fine-grained and hierarchical spatial structure of kelp forest fish communities. Scientific Reports 11: 14439. https://doi.org/10.1038/s41598-021-93859-5

Leempoel, K., T. Hebert & E. A. Hadly. (2019). A comparison of eDNA to camera trapping for assessment of terrestrial mammal diversity. Molecular Ecology, 1–24.

León, B.; A. Cano & K. Young. (1995). La flora vascular de los Pantanos de Villa, Lima, Perú: Adiciones y guía para las especies comunes. Publ. Mus. Hist. nat. UNMSM (B) 38:1-39.

Maggia, M. E., Y. Vigouroux, J. F.Renno, F. Duponchelle, E. Desmarais, J. Nunez & C. Mariac. (2017). DNA *metabarcoding* of amazonian ichthyoplankton swarms. PLoS ONE, 12(1), 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170009

Martin M.. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing *reads*. EMBnet. journal 17, pp. 10.

Maruyama, A., K. Nakamura, H. Yamanaka, M. Kondoh & T. Minamoto. (2014). The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. PLoS One, 9 (12), e114639.

Milan, D.T., Mendes, I.S., Damasceno, J.S. et al. New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment. Sci Rep 10, 17966 (2020). https://doi.org/10.1038/s41598-020-74902-3

Montoya, H. (1998). La diversidad de las algas y sus roles en el ecosistema. En: Cano, A. y K. Young (eds.). Los Pantanos de Villa, Biología y Conservación. Museo de Historia Natural - UNMSM. Serie de Divulgación N° 11: 21-40.

Morales, V. (1998). Observaciones sobre la historia natural del Colostethus littoralis

(Amphibia, Anura, Dendrobatidae). En: Cano, A. y K. Young (eds.). Los Pantanos de Villa, Biología y Conservación. Museo de Historia Natural - UNMSM. Serie de Divulgación N° 11: 211-216.

Olds B. P., C. L. Jerde, M. A. Renshaw, Y. Li, N.T. Evans & C. R. Turner. Estimating species richness using environmental DNA. Ecol Evol. 2016;6: 4214–4226.

Pacheco, V., A. Zevallos, K. Cervantes, J. Pacheco & J. Salvador. (2015). Mamíferos del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa, Lima-Perú. Científica, 12(1), 26–41.

Paredes, W. (2012). Spiders from Pantanos de Villa Reserved Zone (Lima, Perú). Lap Lambert Academic Publishing. 118pp.

Pereira, L. H. G., M. F. Pazian, R. Hanner, F. Foresti & C. Oliveira. (2011). RESEARCH PAPER DNA *barcoding* reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish Piabina argentea (Characiformes : Characidae) from the Upper ´ Basin of Brazil Parana, 22(October), 87–96. https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588213

Pont, D., M. Rocle, A. Valentini, R. Civade, P. Jean, A. Maire & T. Dejean. (2018). Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. Scientific Reports, 8(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8

Pulido, V. (1989). Ambientes y aves acuáticas del Perú. El Volante Migratorio, Lima. 7 (13): 24-31.

Pulido Capurro, V. M., & Bermudez. (2018). Estado actual de la conservación de los hábitats de los Pantanos de Villa, Lima, Perú. Arnaldoa, 25(2), 679–702. https://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25219

Pulido, V. & J. Myers. (1992). Las poblaciones de aves de orilla arenosa marina de Mejía: una propuesta para su conservación. III Congreso Ornitología Neotropical. Cali, 1987.

Pulido, V. (2003). Influencia en la pèrdida de habitas en la conservación de las aves de los Pantanos de Villa. Tesis para optar el Grado Academico de Doctor en Ciencias Biologicas. UNMSM.

Fischer J.R. & M. C. Quist. (2014). Characterizing Lentic freshwater fish as¬semblages using multiple sampling methods. Environmental Mon¬itoring and Assessment 186(7): 4461–74.

Ramírez, D. & A. Cano. 2010. Estado de la diversidad de la flora vascular de los Pantanos de Villa (Lima - Perú) Revista Peruana de Biología, 17(1): 111- 114.

Ramirez, D., H. Aponte, G. Lertora & F. Gil. (2018). Incendios en el humedal Ramsar Los Pantanos de Villa (Lima-Perú): Avances en su conocimiento y perspectivas futuras. Revista de Investigaciones Altoandinas, 20(3), 347-360. https://dx.doi.org/10.18271/ria.2018.398

Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris, Jr. (Org.). (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil, 742 pp. ISBN 85-7430-361-5.

Sales, N.G., O.S. Wangensteen, D.C. Carvalho, S. Mariani. (2019). Influence of preservation methods, sample medium and sampling time on eDNA recovery in a neotropical river**.** Environ. DNA, 1, pp. 119-130

Sarmiento, L. & M. Morales. 1998. Protozoarios, turbelarios y nemátodes de los Pantanos de Villa, Lima, Perú.: su importancia en el ecosistema. En: Cano, A. y K. Young (eds.). Los Pantanos de Villa, Biología y Conservación. Museo de Historia Natural - UNMSM. Serie de Divulgación N° 11: 41-54.

Sassoubre, L. M., K. M. Yamahara, L. D. Gardner, B. A. Block & A. B. Boehm. (2016). Quantification of Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates for Three Marine Fish. Environmental Science & Technology, 50, 10456–10464.

Souza, H. A. V. (2013). List Assessment of fish assemblage in an urban system , Itapecerica River , upper São Francisco River basin , Divinópolis , Minas Gerais , Brazil, 9(3), 482–486.

Stat, M., M. J. Huggett, R. Bernasconi, J.D. DiBattista, T.E. Berry, S.E. Newman, E.S. Harvey & M. Bunce. (2017). Ecosystem biomonitoring with eDNA: *metabarcoding* across the tree of life in a tropical marine environment. Scientific Reports 7: 12240.

Stoeckle, M.Y., M. Das Mishu & Z. Charlop-Powers. (2020). Improved Environmental DNA Reference Library Detects Overlooked Marine Fishes in New Jersey, United States. Front. Mar. Sci. 7:226. doi: 10.3389/fmars.2020.00226

Strickler, K.M., A.K. Fremier & C.S. Goldberg. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. Biological Conservation, 183, 85–92.

Taberlet, P., A. Bonin, L. Zinger & E. Coissac. (2018). Environmental DNA for biodiversity research and monitoring. Oxford University Press.

Tello, A. & L. Castillo. (Eds.). (2010). Humedales de la Región Lima: Guía de su flora y fauna silvestre. 1a. edición. Lima, Perú: Gobierno Regional de Lima.

Thomsen, P. F., & E. Willerslev. (2015). Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. Biological Conservation, 183, 4–18. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019

Torres, M.; Z. Quinteros & F. Takano. (2006). Variación temporal de la abundancia y diversidad de aves limícolas en el refugio de vida silvestre Pantanos de Villa, Perú. Ecología Aplicada. 5 (1-2): 119-125.

Tsuji, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2016). Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples. Limnology, 18(1), 1–7. doi:10.1007/s10201-016-0483-x

Turner, C.R., K. L. Uy & R. C. Everhart. (2015) Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. Biological Conservation 183: 93–102. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.017

Valdez-Moreno, M., N. V. Ivanova, M. Elías-Gutiérrez, S. L. Pedersen, K. Bessonov & P. D. N. Hebert. (2019). Using eDNA to biomonitor the fish community in a tropical oligotrophic lake. PLoS ONE, 14(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215505

WWF. (2016). Living Planet Report. (2016). Risk and resilience in a new era. WWW International, Gland, Switzerland.

Westcott, S. L. & P. D. Schloss. (2015). De novo clustering methods outperform reference-based methods for assigning 16S rRNA gene sequences to operational taxonomic units. PeerJ. 3:e2341. doi: 10.7717/peerj.1487.

Xing Y, Gao W, Shen Z, Zhang Y, Bai J, Cai X, Ouyang J and Zhao Y (2022) A Review of Environmental DNA Field and Laboratory Protocols Applied in Fish Ecology and Environmental Health. Front. Environ. Sci. 10:725360. doi: 10.3389/fenvs.2022.725360

Young, K. (1998). El Ecosistema. En: Cano, A. y K. Young (eds.). Los Pantanos de Villa, Biología y Conservación. Museo de Historia Natural - UNMSM. Serie de Divulgación N° 11: 3-20. Young, K. 1998. El Ecosistema. En: Cano, A. y K. Young (eds.). Los Pantanos de Villa, Biología y Conservación. Museo de Historia Natural - UNMSM. Serie de Divulgación N° 11: 3-20.

Zimmermann, J., G. Glöckner, R. Jahn, N. Enke & B. Gemeinholzer. (2015) Metabarcoding vs morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. Mol Ecol Resour 15(3):526–554

Zinger, L., J. Chave, E. Coissac, A. Iribar, E. Louisanna, S. Manzi, V. Schilling, H. Schimann, G. Sommeria-Klein & P. Taberlet. (2016). Extracellular DNA extraction is a fast, cheap and reliable alternative for multi-taxa surveys based on soil DNA. Soil Biol. Biochem. 96, 16–19.