

Caracterización del pool bacteriano asociado al aguijón de las rayas *Hypanus americanus*, *Hypanus guttatus* y *Urobatis jamaicensis* en Isla Palma (Caribe Colombiano)

Juan Sebastián Quintero González

Trabajo Investigativo para optar al título de Biólogo Marino

Director

Esteban Zarza González

Biólogo Marino, Maestro en Ciencias del Mar y Limnología

Asesor

Vicky Katusca Pomares García

Bacterióloga Magister en Microbiología

UNIVERSIDAD DEL SINU SECCIONAL CARTAGENA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

ESCUELA DE BIOLOGIA MARINA

CARTAGENA DE INDIAS

2023

Dedico con toda la fuerza de mi corazón esta investigación a mis padres, Cenide González y Dagoberto Quintero, por su dedicación y sacrificio, sin los cuales nada de esto hubiera sido posible. No alcanzan las palabras para describir cuanto los amo y agradezco todo lo que me han dado, este es un pequeño regalo para ustedes. Con amor, su hijo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a cada una de las personas involucradas a lo largo de este proyecto, cuyos aportes son invaluable y representan el éxito de esta investigación. Agradezco a mi director Esteban Zarza, gran amigo y mentor el cual me acompañó desde el inicio de la carrera y me brindó su apoyo desde el primer minuto, siendo la persona que creyó en mí y logro hacer que ame mi profesión y todo lo que hago, un gran ser humano y profesional con gran impacto en sus estudiantes y la persona a la que agradeceré eternamente; Mi codirectora Vicky Pomares, guía en las fase de laboratorio y apoyo incondicional durante las etapas del proyecto, siendo pilar importante para el diseño de este estudio.

Así mismo, agradezco a todo el personal del laboratorio de investigación y el Laboratorio de Histología y Microbiología de la universidad del Sinú, con mención especial a Liris González Caraballo, por sus enseñanzas y paciencia a lo largo de los años, siempre dispuesta a brindar el apoyo y el soporte en los momentos difíciles; Al profesor Andrés Echeverri por su entusiasmo y disposición a siempre extender su mano desde su motivación en el semillero de investigación SINBIOMA, así como también a su esposa Leidy González, por su gran aporte en la búsqueda de insumos en momentos críticos, A mis Mejores amigos Keyla Shadiel Gomez, Mateo Gómez Tovar y Rodrigo Espejo, soporte fundamental y pilares importantes en la formación de la idea y en especial también a mi pareja y compañera de viaje Skasquia Ucros, por brindarme su amor y confianza en que todo saldría adelante.

Por ultimo pero no menos importante, quiero agradecer a mis docentes, Adriana Bermúdez, Alejandro Henao, Camilo Platz, Carlos Henry López, Gina Díaz, Liliana Pabón, Luz Marina Mejía, Martha Torres, Patricia Romero y Sebastián Hernández; A mi hermano menor José David Lenis, mi consejera de vida Sandra Hernández y a mis grandes amigos, algunos de muchos años y que formaron parte de momentos inolvidables, los cuales cuentan con mi apoyo por el resto de los días: Angie Quemba, Astrid Castilla, Cesar Viloría, Felipe Almanza, Isabella Piedrahita, Javier Padilla, Jessica Gamboa, José Chaparro Rubiano, Melissa Díaz, Melissa Velilla, Miguel Ávila, Nathalia Sarmiento, Nathaly Bayona, Osmar Orozco, Pedro Beleño y Valentina Agudelo.

CONTENIDO

	Pag
1. INTRODUCCION.....	11
2. JUSTIFICACIÓN.....	12
3. REVISION LITERARIA.....	13
3.1. Marco teórico.....	13
3.2. Estado del arte	14
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
5. OBJETIVOS	19
5.1. Objetivo general	19
5.2. Objetivos específicos	19
6. METODOLOGIA	20
6.1. Tipo de investigación:	20
6.2. Población y muestra:	20
6.2.1. Criterios de inclusión:.....	20
6.2.2. Criterios de exclusión:	20
6.3. Variables con operacionalización:.....	20
6.4. Área de estudio:	21
6.5. Fase de campo:	22
6.6. Procesamiento de Muestras:.....	24
6.7. Cultivos en Agares	25
6.8. Caracterización de las colonias:	27
6.9. Plan de análisis para el procesamiento de los datos obtenidos:	30
7. RESULTADOS.....	34
7.1. Descripción general de las capturas de rayas	34
7.1.1. Sexos y estadios de desarrollo	34
7.1.2. Variables morfométricas	35
7.2. Definición de identidades bacterianas	37
7.2.1. Análisis morfocultural.....	37
7.2.2. Tinción de Gram	38
7.2.3. Pruebas bioquímicas preliminares	39

7.2.4.	Unidades taxonómicas operacionales (OTUs).....	39
7.2.5.	Potencial patógeno de las especies identificadas	47
7.3.	Modelo “Extreme Learning Machine” (ELM)	49
7.3.1.	Datos requeridos	49
7.3.2.	Análisis de regresión lineal	50
7.3.3.	Definición de las variables que más influyen en la composición bacteriana.....	51
8.	DISCUSION	56
8.1.	Apreciaciones generales sobre las especies de raya y los individuos capturados	56
8.2.	Descripción de las identidades bacterianas	57
8.2.1.	Identidades bacterianas del medio	58
8.2.2.	Definición del potencial patógeno de las especies de raya.....	58
8.3.	Modelo de ELM y su aporte a la investigación.....	61
9.	CONCLUSIONES	63
10.	RECOMENDACIONES	64
11.	BIBLIOGRAFIA.....	65
12.	ANEXOS	74

LISTA DE TABLAS:

	Pág
Tabla 1: Registro de tallas, longitud de aguijón, sexo y estadio de madurez para los ejemplares capturados.	34
Tabla 2: Descripción de las especies y su potencial patógeno en los accidentes con rayas y las heridas causadas por el aguijón.	48
Tabla 3: Estadística descriptiva para las identidades bacterianas pertenecientes a los diferentes OTUs registrados en las especies de Raya: Medidas de tendencia central (PROM) y medidas de dispersión de datos (Error std, Varianza, Desv. Std).	49
Tabla 4: Valores obtenidos en la prueba de regresión lineal.	50
Tabla 5: Resultados de los mejores valores para cada identidad bacteriana.	52
Tabla 6: Mejor y segundo mejor valor de promedios ponderados por variable destacando las más influyentes en los modelos elaborados (Próximo a 1).	53
Tabla 7: Probabilidad bayesiana por cada variable categórica.	55

LISTA DE FIGURAS:

	Pág
Figura 1: Efectos producidos por picaduras de rayas. Infecciones secundarias y Necrosis. Tomado de: Junior et al. (2013).	18
Figura 2: Distribución de rayas en Colombia. En zonas marinas, Océano Pacífico y Mar Caribe. En aguas continentales, A: Magdalena, B: Cauca, C: San Jorge, D: Atrato, E: Catatumbo, F: Orinoco y G: Amazonas. Tomado de: Mejía-Falla et al. (2019).	18
Figura 3: Mapa del sitio de muestreo de las especies de Raya.	21
Figura 4: Especificación de las medidas morfométricas registradas en una raya viva y en dos representaciones esquemáticas: Longitud total (A), Ancho de disco (B), Longitud de Aguijón (C) y Longitud de disco para el género <i>Hypanus</i> (D). Esquemas tomado y modificado de Last et al. (2016).	23
Figura 5: Fase de campo. Captura de los ejemplares (A), Corte de aguijón (B), Toma de datos Morfométricos (C) y liberación de los individuos (D).	24
Figura 6: Muestras almacenadas en el laboratorio: A) Aguijones inmersos en tioglicolato, y B) Aguijones en BHI, agua en diluciones seriadas y sedimento listos para ser incubados.	25
Figura 7: Diferentes agares utilizados en los cultivos.	26
Figura 8: Tinción de Gram completamente seca y lista para observación bajo microscopio (100X).	27
Figura 9: Pruebas bioquímicas preliminares de apoyo para la caracterización de las colonias: A. Catalasa, B. Coagulasa y C. Oxidasa.	28
Figura 10: Control positivo de las diferentes especies identificadas por agar cromogénico.	29
Figura 11: Morfotipos conservados en tubos viales, en caldo BHI + glicerol congeladas a -23°C.	29
Figura 12: Medidas morfométricas obtenidas de los 15 individuos de las 3 especies: LT =Longitud Total, AD =Ancho de disco, LA =Longitud de Aguijón, M =Macho, H =Hembra, U.j = <i>U. jamaicensis</i> , H.g = <i>H. guttatus</i> , H.a = <i>H. americanus</i>	36
Figura 13: Boxplot entre hembras (puntos negros) y machos (puntos azules) de <i>Urobatis jamaicensis</i> para las medidas morfométricas: LT =Longitud Total, AD =Ancho de disco, LA =Longitud de Aguijón.	37
Figura 14: Registros Gramnegativos y Grampositivos en los cultivos microbiológicos. A. Porcentaje de representatividad en tinción de Gram B. Bacilos Gramnegativos C. Cocos Grampositivos.	38

Figura 15: Numero de identidades bacterianas por OTU en las diferentes muestras del estudio.	39
Figura 16: Representación porcentual de identidades bacterianas registradas en las diferentes OTUs en <i>Urobatis jamaicensis</i>	40
Figura 17: Representación porcentual de identidades bacterianas registradas en las diferentes OTUs en <i>Hypanus guttatus</i>	41
Figura 18: Representación porcentual de identidades bacterianas registradas en las diferentes OTUs en <i>Hypanus americanus</i>	41
Figura 19: Composición bacteriana de los agujones en cada especie de raya. Imágenes representativas de las especies tomadas y modificadas de Last et al. (2016).	42
Figura 20: Diagrama ternario representando la relación entre las tres especies de raya mediante su similitud en composición bacteriana por OTUs.	43
Figura 21: Representación porcentual de identidades bacterianas registradas en las diferentes OTUs en muestras de sedimentos.	44
Figura 22: Representación porcentual de identidades bacterianas registradas en las diferentes OTUs en muestras de agua.	44
Figura 23: Composición bacteriana de las muestras de sedimento y de agua provenientes de la zona de captura.	45
Figura 24: Diagrama de Venn representando las relaciones de las identidades bacterianas entre las tres especies de raya y el medio.	46
Figura 25: Diagrama de Venn representando las relaciones de las identidades bacterianas entre las tres especies de raya y las muestras de agua.	46
Figura 26: Diagrama de Venn representando las relaciones de las identidades bacterianas entre las tres especies de raya y las muestras de sedimento.	47
Figura 27: Contribución o peso de las variables dentro del modelo.	54
Figura 28: Contribución de los segundos mejores valores al modelo.	54

LISTA DE ANEXOS:

	Pág
Anexo 1: Cultivos iniciales.	74
Anexo 2: Caracterización Morfocultural.	82
Anexo 3: Tinción de Gram (Objetivo x100).	85
Anexo 4: Pruebas Bioquímicas.	91
Anexo 5: Agar Cromogénico.	93
Anexo 6: Resultados de las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene para los medidas morfométricas de los ejemplares de <i>U. jamaicensis</i>	94
Anexo 7: Resultados las Shapiro-Wilk y de Levene para las OTUs definidas.	94

**Caracterización del pool bacteriano asociado al aguijón de las rayas
Hypanus americanus, *Hypanus guttatus* y *Urobatis jamaicensis* en Isla Palma
(Caribe Colombiano)**

Titulo corto: Caracterización bacteriana del aguijón de las rayas *Hypanus americanus*, *Hypanus guttatus* y *Urobatis jamaicensis* en Isla Palma

Resumen: En Colombia se registran aproximadamente 88 especies de rajiformes que se pueden encontrar en medios tanto marinos como dulceacuícolas, la mayoría de estas especies interactúan con pescadores y turistas, lo que causa múltiples afectaciones por heridas debidas a sus aguijones que pueden llevar hasta la muerte. Aunque esto sucede de manera accidental, en general se desconoce acerca de la composición del aguijón, hasta el momento se entiende que estos aguijones están compuestos por una capa externa similar al esmalte y en su interior se encuentran glándulas de veneno, cubiertas por un tegumento al que se le denomina "Pool Bacteriano" siendo este último el menos estudiado. En consecuencia, se definió como objetivo principal caracterizar el pool bacteriano presente en el aguijón de las rayas *Hypanus americanus*, *Hypanus guttatus* y *Urobatis jamaicensis*, relacionándola con la composición bacteriana de agua y sedimento, así como con la morfometría de los ejemplares capturados. Para esto, primero se realizó la recolección de muestras en el área marina circundante a Isla Palma. Segundo, cultivos en laboratorio en diferentes agares (Chromocult, Chocolate, Eosin Methylene Blue (EMB), Sangre y Tiosulfato-Citrato-Bili-Sacarosa (TCBS)) para garantizar el crecimiento de todo tipo de bacterias. Tercero se caracterizaron las bacterias cultivadas por medio tinción de Gram, pruebas bioquímicas y agares cromogénicos; Finalmente se realizó un análisis de regresión por medio de redes neuronales para determinar la variable de mayor influencia en la composición bacteriana. Se encontraron 43 identidades entre aguijones de raya y muestra del medio (Agua y Sedimento) resaltando *E. coli*, *P. mirabilis*, *V. cholerae* y *V. alginolyticus*. Se determinó que los machos de grandes tallas y los individuos de *U. jamaicensis* poseen mayor diversidad de bacterias.

Palabras clave: Bacterias, *Hypanus*, Mar caribe, Rayas, Pool Bacteriano, *Urobatis*

1. INTRODUCCION

En el reino animal se pueden observar numerosos casos donde diferentes organismos sostienen una relación directa con grupos de bacterias (Larsen et al., 2013; Aquino et al., 2016). Las bacterias a su vez pueden ser tomadas del medio y le aportan al hospedador beneficios como facilitar la absorción de nutrientes, regulación del metabolismo y defensas contra posibles patógenos y afectaciones (Gonçalves e silva et al., 2020). En el caso de los condricios, más específicamente en las rayas, se puede observar que en su piel presentan un recubrimiento en forma de mucus donde se encuentran bacterias que cumplen la función de prevenir infecciones y, como explica Ritchie et al. (2017), cuando se presentan heridas estas sanan rápidamente sin mostrar rastros de infección alguna, y mantienen el funcionamiento normal de la piel y su microbioma.

En Colombia se registran aproximadamente 88 especies de rajiformes que se pueden encontrar en medios tanto marinos como dulceacuícolas (Mejía-Falla et al., 2007), la mayoría de estas especies interactúan con pescadores y turistas, lo que causa múltiples afectaciones por heridas debidas a sus aguijones que causan Gangrena, trastornos neurotróficos, hipersensibilidad, úlceras, actividad miotóxica y dermonecrosis que pueden causar pérdida de extremidades e incluso hasta la muerte (Bárbaro et al., 2007; Junior et al., 2013). Cuando se habla de los aguijones, es sabido que estos se encuentran en algunas familias que como su nombre en inglés lo dice “stingrays” (Dasyatidae, Gymnuridae, Myliobatidae y Urolopidae) son las que portan dicho aguijón y que tienen la capacidad de mudarlos aproximadamente cada 4 meses o regenerarlos en menor tiempo si son removidos o los pierden en encuentros con depredadores, independientemente si se pierde por completo o se fragmenta, existiendo casos de algunos individuos que poseen la capacidad de portar hasta tres aguijones al tiempo (Johansson et al., 2004).

Aunque estas afectaciones mencionadas anteriormente suceden de manera accidental, en general se desconoce acerca de la composición del aguijón, se sabe que estos aguijones tienen un origen esquelético adherido a la columna de la raya en la base de su cola (Spieler et al., 2013), están compuestos de un núcleo interno de vasodentina y una fina capa exterior de material similar al esmalte, poseen bordes aserrados y una punta muy afilada (Emesbury & Snelson, 1997) que a su vez está cubierto por un tegumento al que se le denomina en este caso “Pool Bacteriano”.

Este estudio brinda la oportunidad de generar información relacionada con la diversidad de comunidades bacterianas que componen el mecanismo de defensa asociado a un macroorganismo, en este caso, tres especies de raya: *Hypanus americanus*, *Hypanus guttatus* y *Urobatis jamaicensis*, que son especies que se encuentran presentes a lo largo del Caribe y son frecuentes en la actividad pesquera o en zonas turísticas. Adicionalmente, permite establecer si existe una relación entre el medio (agua y sedimento) y los aguijones, generar un catálogo de microorganismos con diversos potenciales para el ambiente y para la protección de

las rayas y a futuro, servir como una fuente de información que permita acercarse a posibles tratamientos en los accidentes producidos y determinar si existen usos potenciales en los grupos de bacterias encontrados.

2. JUSTIFICACIÓN

Los accidentes con rayas son muy comunes en las playas de muchos países donde bañistas, pescadores y personas en distintas actividades tienen interacción con ellas y sufren de picaduras causadas generalmente por que las pisan sin verlas; en Colombia no se cuenta con registros en literatura acerca de reportes de picaduras, sin embargo, en Brasil, las comunidades pesqueras suelen sufrir accidentes al recoger las redes de las aguas, tanto en áreas marinas como dulceacuícolas, donde se producen un alto número de picaduras entre los meses de mayo y agosto durante la época seca y la temporada de pesca (Junior et al., 2013); en Estados Unidos se estima que entre 750 y 1500 casos de accidentes con rayas se presentan anualmente, mientras que en México, el servicio médico municipal ha reportado casos como en la playa conocida como “El Maviri”, donde se produjeron más de 60 picaduras en 3 días (Rodríguez et al., 2022).

Estas picaduras causan afectaciones en la piel y a nivel muscular generando, infecciones, hinchazones, afectaciones al sistema nervioso y, sobre todo, un fuerte dolor en el área afectada que, si no se controla, puede generar otras complicaciones a largo plazo como gangrena, trastornos neurotróficos, vasos sanguíneos rotos por úlceras e hipersensibilidad que deriva en amputación de extremidades y, en algunos casos, dependiendo de la zona de afectación, la muerte (Junior et al., 2013).

Existen aproximadamente 88 especies de rayas registradas en Colombia (Mejía-Falla et al., 2007) que se pueden encontrar tanto en medios marinos como dulceacuícolas. En el presente proyecto se seleccionaron como especies de estudio *Hypanus americanus*, *Hypanus guttatus* y *Urobatis jamaicensis* por ser ejemplares que tienen una mayor interacción en las zonas costeras y ambientes someros donde se reúnen bañistas y donde existe una actividad pesquera.

Es muy escasa la información disponible acerca de los aguijones y sus características; existe un desconocimiento general acerca de la composición del tejido glandular o “pool bacteriano” que recubre el aguijón, actualmente se sabe que las rayas poseen glándula o glándulas de veneno en diferentes zonas del aguijón junto al tegumento que lo recubre, que estos aguijones tienen un origen esquelético en la base de la cola y que tienen la capacidad de mudarlos llegando a portar en algunos casos tres aguijones. Sin embargo, datos detallados acerca de las bacterias que componen dicho tegumento y que son responsables en gran parte de las afectaciones en los incidentes con rayas no se encuentran, lo que dificulta su

tratamiento, especialmente en las especies de mar, siendo estas de las que se tiene menos información (Gonçalves e silva et al., 2020).

Con este estudio se busca aportar precisamente esa información faltante, que consiste en la composición bacteriana del tejido en el aguijón, su toxicidad y potencial patógeno y si éste se relaciona con características morfológicas y las propiedades del medio (Agua y Sedimento) con el fin de elaborar un análisis detallado del llamado pool bacteriano con el que se espera contribuir a métodos de tratamiento más efectivos. Se espera que este proyecto haga un aporte importante a la comunidad científica y que permita mejorar la interacción de turistas, pescadores y demás personas que tengan contacto con las rayas.

3. REVISION LITERARIA

3.1. Marco teórico

En el reino animal se pueden observar numerosos casos donde diferentes organismos sostienen una relación directa con grupos de bacterias, algunos ejemplos como el pargo rojo (*Lutjanus campechanus*) que poseen bacterias en piel, y casos parecidos a las rayas como los bagres, que poseen espinas en aletas pectorales y dorsal causando heridas y afectaciones por veneno (Larsen et al., 2013; Aquino et al., 2016). Estas bacterias le aportan al hospedador beneficios como facilitar la absorción de nutrientes, regulación del metabolismo y defensas contra posibles patógenos y afectaciones (Gonçalves e silva et al., 2020). En el caso de los condriictios, más específicamente en las rayas, se puede observar que en su piel presentan un recubrimiento en forma de mucus donde se encuentran bacterias que cumplen la función de prevenir infecciones y, como explica Ritchie et al. (2017), cuando se presentan heridas estas sanan rápidamente sin mostrar rastros de infección alguna, y mantienen el funcionamiento normal de la piel y su microbioma.

Cuando se habla de lo aguijones, es sabido que estos se encuentran en algunas familias que como su nombre en inglés lo dice “stingrays” (Dasyatidae, Gymnuridae, Myliobatidae y Urolopididae) son las que portan dicho aguijón, que está compuesto de una estructura en forma acerrada que presenta glándulas de veneno y una envoltura tegumental que acá se hará referencia como “pool bacteriano”; este mismo pool bacteriano posee esta relación con bacterias que generan ese mecanismo de defensa contra cualquier amenaza, en algunos casos encuentros accidentales con personas de diferente origen, que puede causar entre otras cosas, edema y necrosis (Bárbaro et al., 2007).

Estos aguijones tienen un origen esquelético adherido a la columna de la raya en la base de su cola (Spieler et al., 2013), están compuestos de un núcleo interno de vasodentina y una fina capa exterior de material similar al esmalte, poseen bordes aserrados y una punta muy afilada (Emesbury & Snelson, 1997). Johansson et al. (2004) Encontraron que las rayas poseen la capacidad de mudar aguijones, que suelen mudarlos cada 4 meses aproximadamente y en caso de perderlos en encuentros con amenazas o al ser removidos, el tiempo que pasa para poseer un aguijón de nuevo es corto, generando en algunos casos hasta dos o tres aguijones nuevos, que son considerados aguijones secundarios que tienen un origen posterior al primer aguijón mientras este aguijón primario es mudado en su totalidad en caso no haber caído del todo. De acuerdo con el estudio de Gonçalves e Silva et al. (2020), se puede entender que estos aguijones mantienen ciertas propiedades bacterianas, aun hablando de individuos recién nacidos, y que puede aumentar o descender la diversidad de especies bacterianas relacionado al medio donde se encuentren, por esto es muy importante tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas de su hábitat de origen para análisis bacterianos en el aguijón.

3.2. Estado del arte

Las investigaciones relacionadas con la composición del pool bacteriano en las rayas son realmente escasas en Colombia y a nivel mundial, para esta investigación son relevantes los trabajos realizados por Spieler et al. (2013) donde reúnen todos los estudios, tanto publicados como sin publicar, de la raya amarilla *Urobatis jamaicensis*, resaltando entre otros elementos datos morfológicos e histológicos donde se hacen referencia a los aguijones con su origen y composición; Bárbaro et al. (2007) que comparan dos especies, una de agua dulce (*P. falkneri*) y otra de agua salada (*H. guttatus*) para medir sus índices de toxicidad y sus afectaciones en ratones; el de Johansson et al. (2004) donde elaboraron un estudio muy completo para medir el tiempo de crecimiento de un aguijón aplicando diferentes técnicas de extracción (corte, extracción total y microcirugía) exponiendo datos precisos acerca de la muda de aguijones en la raya *Urobatis halleri*

El estudio de Gonçalves e Silva et al. (2020), donde analizan el contenido bacteriano de los aguijones, los relacionan con muestras de agua y sedimento junto con otros factores de lugar de origen representa el estudio más completo sobre la temática, indicando un variado compuesto bacteriano donde destacan entre otros filos de bacterias, *Sediminibacterium*, *Rhodobacteraceae* *Devosia* y *Mycobacterium*. Finalmente, como adición, se presentan los estudios de Junior et al. (2013) y Corcoran et al. (2013) los cuales permiten la comprensión de otros factores como son las heridas causadas, sus síntomas y estrategias de manejo y la distribución de las rayas, factor importante para la comparación entre zonas de captura.

La revisión realizada por Spieler et al. (2013) describe a profundidad todas las características de *Urobatis jamaicensis*, los diferentes sistemas del organismo, su distribución, alimentación y datos histológicos que permiten entender la composición y funcionamiento de los aguijones, se menciona que la estructura de los aguijones está compuesta de un núcleo interno de vasodentina y una capa exterior similar al esmalte donde se encuentran glándulas de veneno y un recubrimiento de proteínas. Se menciona que su origen tiene lugar en la base de la cola, adherido a la columna de la raya y que *U. jamaicensis* suele mudar aguijones periódicamente ya sea de manera natural o al perderlos en incidentes con depredadores o personas.

Por otro lado, Bárbaro et al. (2007) como se mencionó, compararon los efectos toxicológicos de dos rayas, *Potamotrygon falkneri* e *Hypanus guttatus*; aquí se encontró que *P. falkneri* posee características letales dermonecróticas y actividad miotóxica (producen hemorragias) mientras que *H. guttatus* no genera este impacto severo y ambas poseen actividad edematosa y nociceptiva (dolor agudo en músculo y tendones), se menciona a su vez que a partir de otros estudios, como el de Magalhaes (2001) y Johansson et al. (2004), encontraron que en especies de agua dulce hay presencia de enzimas como fosfodiesterasa, 5-nucleotidasa, fosfolidasas, hialuronidasa y péptidos con alto contenido proteico que forman parte del llamado tejido venenoso asociado al aguijón de las rayas de agua dulce, exponiendo que las especies dulceacuícolas producen un impacto mayor en las personas como en este estudio los ratones que se les fue suministrado el compuesto, pero concluye que ambos efectos tóxicos son dependientes de la dosis que sea suministrada.

Complementando la temática acerca de la muda de aguijones, Johansson et al. (2004) indican que esta muda se da en fines de primavera y principios de verano, las espinas primarias (originales) no eran mudadas hasta que las espinas secundarias (de reemplazo) alcanzaban un tamaño similar a la original, lo que sucedía cada otoño. En el experimento realizado por los investigadores se buscó medir el tiempo en el que crecía el segundo aguijón posterior a la pérdida del aguijón primario, para esto se usaron tres técnicas, corte del aguijón a 2 mm de la base, extracción completa mediante una microcirugía y el grupo control dejando el aguijón primario intacto, se encontró que *U. halleri* no solo muda el aguijón por temporada sino también por pérdida fuera de la temporada de muda; adicionalmente, no se presentaron diferencias en las tres técnicas, se explicó que al generarse el brote del nuevo aguijón, se evidencia un especie de masa gelatinosa de apariencia rosada y que la aparición total del aguijón secundario se da entre 2.5 y 4 meses, pudiendo dar, incluso, dos aguijones en cambio del primario perdido.

Estos aguijones representan un mecanismo de defensa propio de las rayas (Marmi et al., 2010; Hughes et al., 2018), y su corte no genera ningún dolor o herida al ser lo que se puede llamar una “escama modificada” y no poseer conexión nerviosa alguna (Lowe et al., 2007).

Gonçalves e silva et al. (2020) comparan las comunidades bacterianas en aguijón y en la piel de dos especies: la raya mariposa (*Gymnura altavela*) y el llamado chucho liso (*Dasyatis hipostigma*) en el sur del atlántico Brasileño. Para esto se realizaron comparaciones entre organismos en el medio natural y en acuario, donde se midió la influencia del sedimento y el agua en la concentración bacteriana además de anexar el análisis de la concentración bacteriana en un neonato. Gonçalves e silva y colaboradores realizaron pruebas moleculares de PCR en el gen 16S RNAr y 18 RNAr donde encontraron que en los acuarios la concentración y diversidad de especies bajaba considerablemente. A su vez, en el medio natural el sedimento tenía una relación directa con varias de las OTUs (Operational Taxonomic units) encontradas, lo que reflejo un total 100 OTUs compartidas entre las especies de raya y el sedimento, mientras que en relación con agua solo se encontraron 42. Finalmente las especies de bacterias más comunes en los aguijones fueron aquellas del género *Sediminibacterium*, *Rhodobacteraceae*, *Devosia* y *Mycobacterium*.

Haciendo énfasis en las afectaciones por picaduras, Junior et al. (2013) presentan un estudio a gran detalle acerca de la problemática por picaduras de rayas tanto de agua dulce como marinas en Brasil. Mencionan que es muy común, en aguas de poca profundidad y en épocas secas, que se presenten numerosos reportes de picadas de rayas; suelen presentarse en los pies o la parte inferior de la pierna, causando, a unos pocos minutos del accidente, un dolor agudo que puede durar hasta 20 horas, necrosis, úlceras, hipersensibilidad, entre otras; generalmente, el tiempo de recuperación toma de 20 días hasta varios meses. Para su tratamiento, se recomienda sumergir el área afectada en agua caliente como primera instancia y una profunda limpieza de la herida más el uso de antibióticos y anestésicos, pero en definitiva, no hay una técnica clara de cómo tratar estas heridas.

Finalmente, Corcoran et al. (2013) presentaron un estudio donde se evidencia que especies como *Hypanus guttatus* no suelen recorrer grandes distancias y tienen nichos establecidos. En la investigación, se compararon dos grupos de *H. guttatus*, el primero estaba influenciado por la alimentación de turistas en una zona llamada Stingray City Sandbar (SCS) en las Islas Caimán, el segundo grupo llamado "salvaje" en dos zonas apartadas del área turística. Usando rastreadores con telemetría acústica, se confirmó que las hembras suelen recorrer mayores distancias, y que en general estas rayas suelen tener más actividad de noche cuando salen a buscar alimento, sin embargo, estos trayectos no son mayores a un par de kilómetros. Este estudio muestra que una comparación entre zonas puede ser viable, ya que, al no recorrer grandes distancias, es probable que las condiciones fisicoquímicas de su hábitat puedan afectar la composición bacteriológica de los aguijones.

Desafortunadamente, aún no se cuenta con información suficiente acerca de los factores que pueden afectar este contenido bacteriano del aguijón, ya que la información que se puede encontrar al respecto es realmente escasa, por lo que es necesario profundizar en este campo. Además, se modificó la terminología de las especies *Dasyatis americana* y *Dasyatis guttata*, en base a la actualización

taxonómica realizada por Last et al. (2016), donde fue cambiada a *Hypanus americanus* e *Hypanus guttatus* respectivamente, por lo que se modificaron todas las referencias a la clasificación anterior en el documento.

Por su parte, el estudio llevado a cabo por Gonçalves e Silva et al. (2020) presenta una metodología y unos resultados que se relacionan estrechamente con lo propuesto en esta investigación, por lo cual en este estudio se tomarán en cuenta las técnicas de extracción y procesamiento de aguijones y las variables seleccionadas como puntos de comparación, siendo estas lugar de origen y características fisicoquímicas del agua y de los sedimentos, con la diferencia de que en esta investigación no se realizarán pruebas moleculares.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Alrededor del mundo se observan constantemente reportes de “picaduras” de rayas que generan diferentes afectaciones como dolores intensos, edemas, necrosis y hasta la pérdida de extremidades, efectos que se observan en la figura 1 (Junior et al., 2013). Las heridas producidas por los aguijones de raya, que comúnmente se conocen como “picaduras”, son accidentes que ocurren a pescadores o bañistas que por error las pisan en mares o ríos, y la reacción de las rayas para su defensa es batir su cola e impactar con su aguijón en las extremidades de las personas. Junto con las heridas producidas por el aguijón, se generan con el pasar de los minutos entre 5 y 10 síntomas, acompañados con necrosis y úlceras en el área afectada y sus alrededores; estas afectaciones son referidas por el común de la sociedad como casos de envenenamiento. Sin embargo, las investigaciones indican que más allá de ser un problema por veneno, estos aguijones poseen un coctel de bacterias del cual es desconocida su composición y efectos en las víctimas.

En Colombia la presencia de rayas es muy común en la mayoría de cuerpos de agua, tanto continentales como marinas (Mejía-Falla et al., 2009) (Fig. 2) y se presentan constantes reportes de accidentes causados por rayas. Como consecuencia de esto, la principal problemática es entender la composición bacteriana de estos aguijones y cómo ésta puede variar, ya que, aunque se desconoce mucho sobre las bacterias asociadas al aguijón, los pocos estudios que hacen referencia a éstas las mencionan como responsables de infecciones secundarias post picadura, por lo que es importante continuar profundizando en esta temática.



Figura 1: Efectos producidos por picaduras de rayas. Infecciones secundarias y Necrosis. Tomado de: Junior et al. (2013).

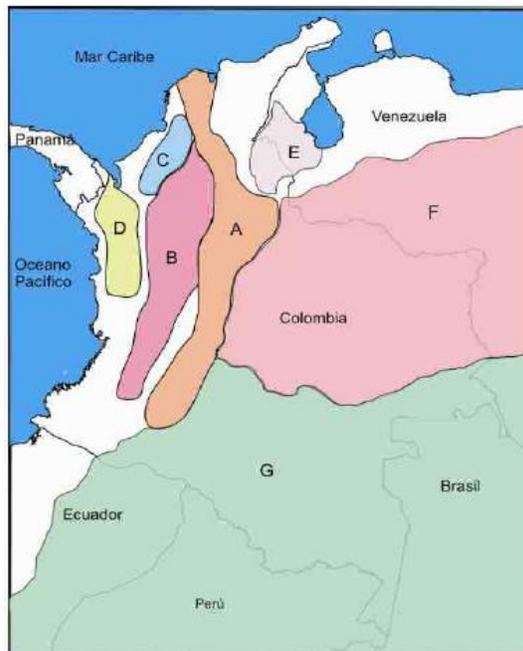


Figura 2: Distribución de rayas en Colombia. En zonas marinas, Océano Pacífico y Mar Caribe. En aguas continentales, A: Magdalena, B: Cauca, C: San Jorge, D: Atrato, E: Catatumbo, F: Orinoco y G: Amazonas. Tomado de: Mejía-Falla et al. (2019).

PREGUNTA PROBLEMA

¿Cuáles son los componentes del pool bacteriano asociado al agujón de las especies *Hypanus americanus*, *Hypanus guttatus* y *Urobatis jamaicensis*, en función del sexo y tamaño de los ejemplares, y cómo se relacionan con la composición microbiológica del agua y sedimento en que habitan?

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar el pool bacteriano presente en el agujón de las rayas *Hypanus americanus*, *Hypanus guttatus* y *Urobatis jamaicensis*, relacionándolo con la morfometría de los ejemplares capturados, así como con la composición bacteriana del agua y sedimento en que habitan.

5.2. Objetivos específicos

- Identificar, al menor nivel taxonómico posible, las bacterias registradas en el agujón de las tres especies de raya, así como en muestras de agua y sedimento en la zona de captura, a través de análisis morfoculturales y por medio de pruebas bioquímicas.
- Establecer el potencial patógeno teórico en las principales especies bacterianas registradas en las distintas especies de rayas incluidas en el estudio.
- Determinar la relación entre composición del pool bacteriano en los agujones con la composición bacteriana del medio, y las variables morfométricas como talla y sexo de los organismos en cada especie de raya.

6. METODOLOGIA

6.1. **Tipo de investigación:** La presente investigación es de carácter cuantitativo, con datos variables de tipo prospectivo, descriptivo y con un enfoque mixto. A su vez, al centrarse en un grupo de muestras colectadas y analizadas en un momento específico, la investigación es de corte transversal.

6.2. **Población y muestra:** Se trabajó con tres especies de rayas, *H. americanus*, *H. guttatus* y *U. jamaicensis*. Teniendo en cuenta que no se tenía una población cuantificada, se recolectaron las muestras mediante una fase de campo, por lo tanto, el tipo de muestreo que se realizó fue no probabilístico y por conveniencia.

6.2.1. Criterios de inclusión:

- Rayas de las especies *H. americanus*, *H. guttatus* o *U. jamaicensis*.
- Rayas presentes en el área marina circundante a Isla Palma (Archipiélago de San Bernardo, Caribe colombiano).
- Rayas de cualquier tamaño y sexo.

6.2.2. Criterios de exclusión:

- Rayas que no posean aguijón.
- Rayas de río.

6.3. Variables con operacionalización:

Variables Biológicas y morfométricas				
Variable	Descripción	Valor posible	Tipo de variable	Unidad de medida
Ancho de disco	Medida tomada de punta a punta en las aletas pectorales	5-200	continua	cm
Longitud total	Medida tomada desde la punta del disco de raya hasta el extremo final de la cola	10-480	continua	cm
Tamaño de aguijón	Longitud tomada del aguijón desde su punto de origen en la base de la cola hasta el extremo final	1-	continua	cm
Tamaño de cola	Longitud desde la base del disco hasta el extremo final	1-100	continua	cm
Sexo	Condición orgánica que distingue a los machos de las hembras	Macho-hembra	Categorica	N/A
Cantidad de aguijones	Numero de aguijones recolectados	N/A	Discreta	Cantidad
Variables Microbiológicas				
Variable	Descripción	Valor posible	Tipo de variable	Unidad de medida
Morfotipos	Especies o posible numero de especies unicas que puede encontrarse en las diferentes muestras	N/A	Discreta	Numero de registros

6.4. Área de estudio:

La actividad de campo fue realizada en el área marina circundante a Isla Palma en el archipiélago de San Bernardo, ubicada a aproximadamente 30 minutos en lancha desde la playa de Rincón del Mar (municipio de San Onofre, Sucre). En esta zona fueron seleccionados dos puntos de muestreo: el primero ubicado en las coordenadas $9^{\circ}44'25.4''N$ $75^{\circ}44'40.3''W$, y el segundo en las coordenadas $9^{\circ}44'47.3''N$ $75^{\circ}45'08.9''W$ (Fig. 3).

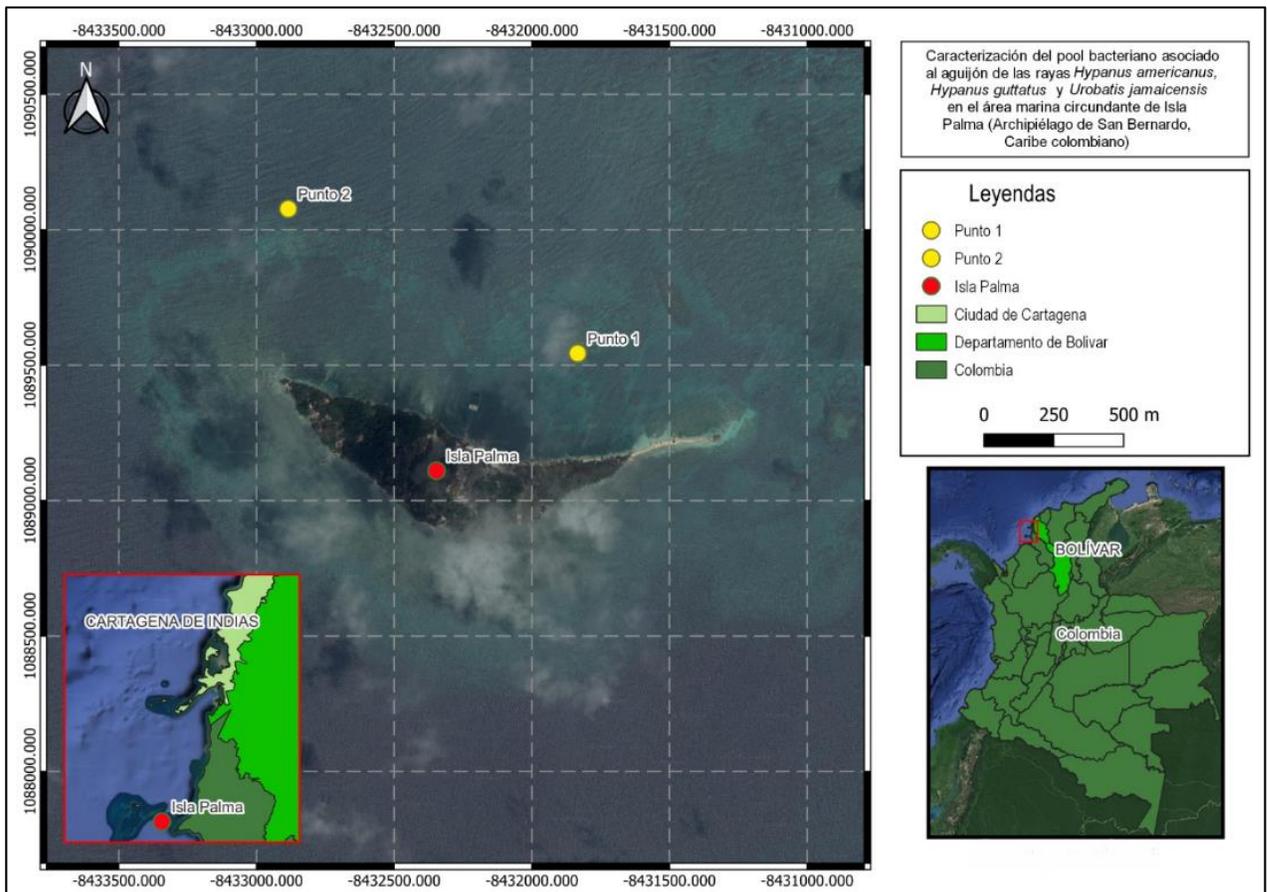


Figura 3: Mapa del sitio de muestreo de las especies de Raya.

6.5. Fase de campo:

Las capturas de los ejemplares se realizaron por medio de buceo autónomo con snorkel y el apoyo de redes mano. Los individuos fueron manipulados con guantes de seguridad y se ubicaron en una toalla húmeda; el aguijón fue extraído con el apoyo de un cortafrío, luego fue depositado en un tubo de ensayo con tapa rosca, previamente esterilizados en autoclave, y se puso en refrigeración (4°C), hasta su análisis en el laboratorio (Gonçalves e Silva et al., 2020).

Posteriormente, a cada ejemplar capturado se le registró el sexo (ausencia o presencia de mixopterigios o clasper), así como las medidas morfométricas de longitud total, ancho de disco y longitud de aguijón, cabe mencionar que la medida de longitud de disco (LD) fue utilizada para las especies del género *Hypanus* en lugar de la longitud total; ésta es una modificación común, debido a las dificultades de medir su cola, que puede ser tres veces del tamaño del disco, y que en algunos casos puede ser encontrada lacerada o incluso removida por completo en algunos individuos en el medio natural (Last et al. 2016). A continuación se menciona el procedimiento para la toma de las medidas morfométricas:

- Longitud total (LT), desde la punta del disco hasta la punta de la cola (Fig. 4A).
- Ancho de disco (AD), medida de izquierda a derecha entre los extremos del disco, en la zona media del organismo (Fig. 4B).
- Longitud del aguijón (LA), desde el origen en la base de la cola hasta la punta del aguijón (Fig. 4C).
- Longitud del disco (LD), donde se mide desde la punta del disco hasta la base de la cola.

Estos registros y medidas se tomaron con una cinta métrica con precisión de 1mm, siguiendo las instrucciones de Last et al. (2016). Para todo este procedimiento se contó con la presencia de, al menos, dos personas, con la finalidad de manejar de una manera más segura al organismo, sosteniendo su cola y cumpliendo todo el protocolo en el menor tiempo posible, garantizando la seguridad tanto de la raya como de las personas en el proceso de captura. Los individuos fueron liberados inmediatamente finalizó el procedimiento bajo procedimientos estándar como se describe en la figura 5, sin generar mayores traumatismos en los ejemplares manipulados, ya que no se produjeron afectaciones sobre los organismos y su aguijón se regenera con el paso de los días (Johansson et al., 2004; Lowe et al., 2007).

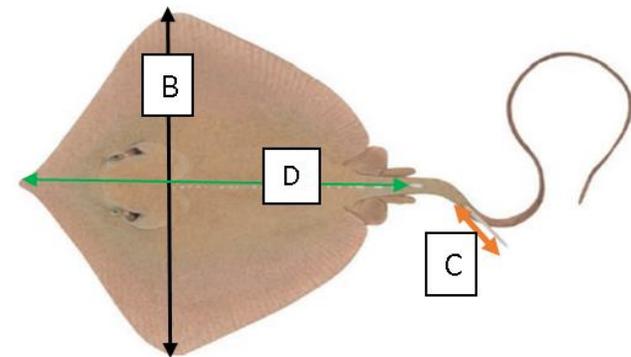
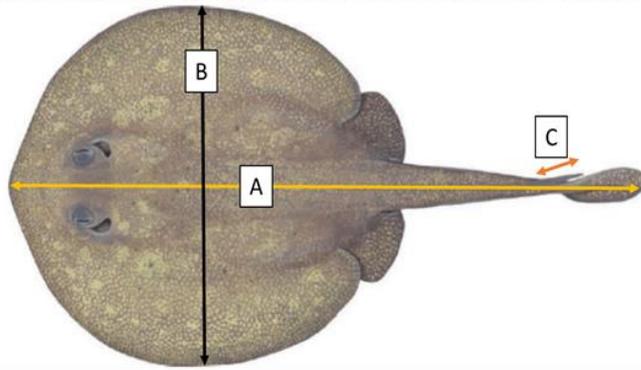
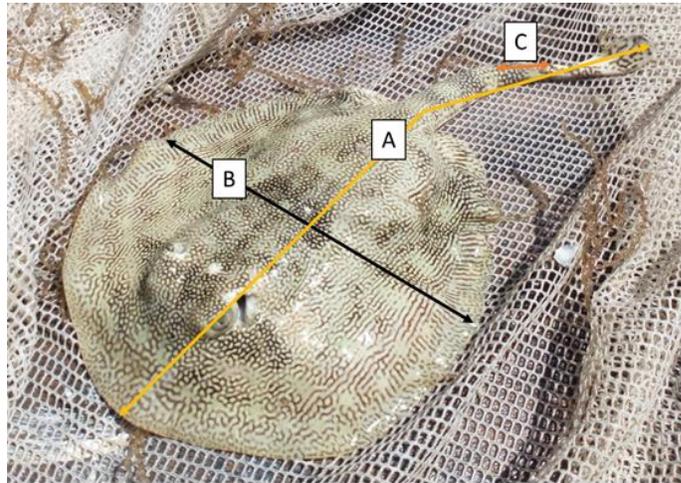


Figura 4: Especificación de las medidas morfométricas registradas en una raya viva y en dos representaciones esquemáticas: Longitud total (A), Ancho de disco (B), Longitud de Aguijón (C) y Longitud de disco para el género *Hypanus* (D). Esquemas tomado y modificado de Last et al. (2016).

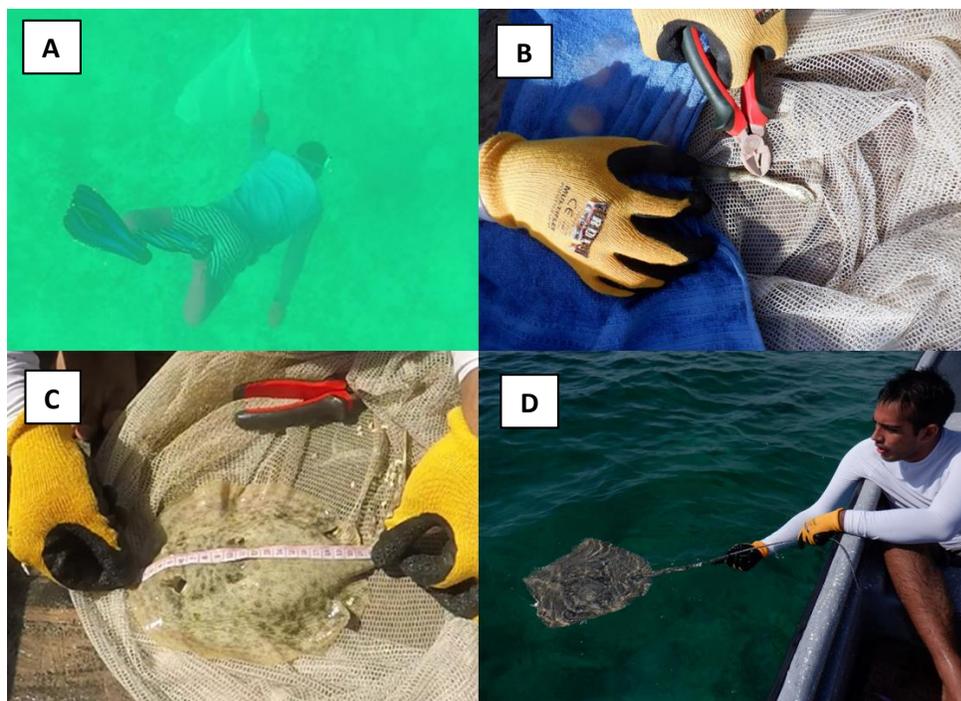


Figura 5: Fase de campo. Captura de los ejemplares (A), Corte de aguijón (B), Toma de datos Morfométricos (C) y liberación de los individuos (D).

En el mismo punto de muestreo de los especímenes, fueron recolectadas muestras de sedimentos marinos, empleando un corazonador de 2" de diámetro (Kerfahi et al., 2014), el cual se enterró hasta 5 cm y la muestra fue depositada directamente en una bolsa con cierre hermético. Por último, en el mismo sitio, también fueron obtenidas dos muestras de agua de fondo, que posteriormente fueron depositadas en frascos de vidrio SCHOTT® tapa rosca estériles (Suarez, 2015; Carranza-León, 2016). Al finalizar, las muestras fueron refrigeradas y transportadas por vía terrestre desde Rincón del Mar hasta la ciudad de Cartagena de Indias, con un tiempo aproximado de traslado de 5 horas hasta su procesamiento en el laboratorio de Microbiología de la Universidad del Sinú – Seccional Cartagena.

6.6. Procesamiento de muestras:

En el caso de los aguijones, se adicionaron 10 mL de caldo nutritivo (Tioglicolato) en los tubos de ensayo donde se encontraban almacenados; adicionalmente, 1 mL de la muestra original, previamente incubada a 36°C por 24 horas, fueron depositados en 9 mL de Caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Fig. 6A). Para las muestras de sedimento, fueron tomados con ayuda de espátula 1-2 g de la muestra,

y de igual manera, depositados en tubos de ensayo con Tioglicolato. Por su parte, las muestras de agua fueron diluidas de manera seriada, hasta conseguir una dilución final de 10^{-5} (1/100.000). Al finalizar, todas las muestras fueron incubadas a 36°C por 24 horas (Fig. 6B).

Estos caldos BHI y Tioglicolato enriquecidos en nutrientes son de uso general y permiten almacenar muestras que no pueden ser cultivadas con facilidad, proporcionando un desarrollo bacteriano óptimo para todo tipo de bacterias gracias a sus características y fundamentos, como son:

- **Caldo BHI:** Preparado a base de una infusión de corazón y cerebro de vaca, junto con la mezcla de peptona, proporcionan un medio rico en nutrientes propicio para el crecimiento de diversas bacterias de requerimiento nutricional exigente.
- **Caldo Tioglicolato:** Facilita el crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios de un requerimiento nutricional exigente; su composición permite neutralizar los posibles efectos de metales pesados en las muestras.

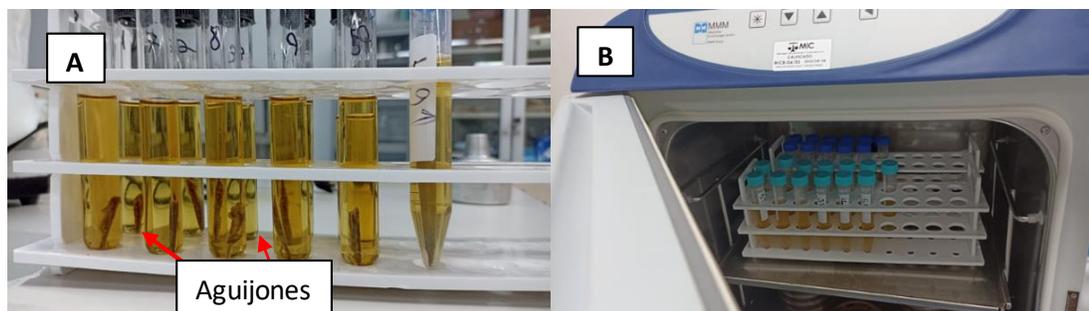


Figura 6: Muestras almacenadas en el laboratorio: A) Agujones inmersos en tioglicolato, y B) Agujones en BHI, agua en diluciones seriadas y sedimento listos para ser incubados.

6.7. Cultivos en Agares

Posterior a la incubación, con ayuda de una pipeta automática, fueron tomados $30\mu\text{L}$ del caldo de cada tubo y se sembraron por agotamiento, con el propósito de aislar colonias de los diferentes microorganismos a obtener para los próximos análisis, y, nuevamente, al finalizar el barrido, se incubó por 24 horas a 36°C . Fueron empleados 5 agares (Fig. 7), los cuales se describen a continuación:

- **Agar Chocolate:** Medio que utiliza glóbulos rojos lisados, además de otros componentes, para brindar un medio enriquecido no selectivo para microorganismos con un requerimiento nutricional exigente.
- **Agar Chromocult:** Medio de cultivo selectivo y diferencial para la detección de coliformes totales en muestras de agua. En este medio, *E. coli* se observa de color azul mientras que el género *Citrobacter* se puede observar en tonos rosados o púrpuras.
- **Agar EMB (Eosin Methylene Blue):** Es un medio selectivo para cultivo de Bacilos Gram negativos, principalmente especies de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. La coloración permite determinar algunos microorganismos como *E.coli* y *Citrobacter* (brillo metálico), *Acinetobacter* (azul lavanda), bacterias que utilizan lactosa (borde azul o rosado), entre otros.
- **Agar Sangre:** Medio de cultivo nutritivo o generalista que permite el crecimiento de numerosos microorganismos nutricionalmente exigentes, los cuales pueden ser identificados por los 3 tipos de hemólisis sobre el agar: 1) Hemólisis alfa - se observa un color verdoso alrededor de la colonia debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina; 2) Hemólisis beta - se observa un tono claro brillante alrededor de la colonia originado por la lisis total de los glóbulos rojos; y 3) Hemólisis gamma - ausencia de lisis de los glóbulos rojos donde el medio de cultivo no presenta modificaciones de color y aspecto.
- **Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bili-Sacarosa):** Es un medio altamente selectivo para *Vibrio* spp.; por su contenido de sales biliares, inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivas y otros Gram negativos. Además, contiene sucrosa (sacarosa) como carbohidrato fermentable, debido a que la mayoría de integrantes del género *Vibrio* fermenta este azúcar.



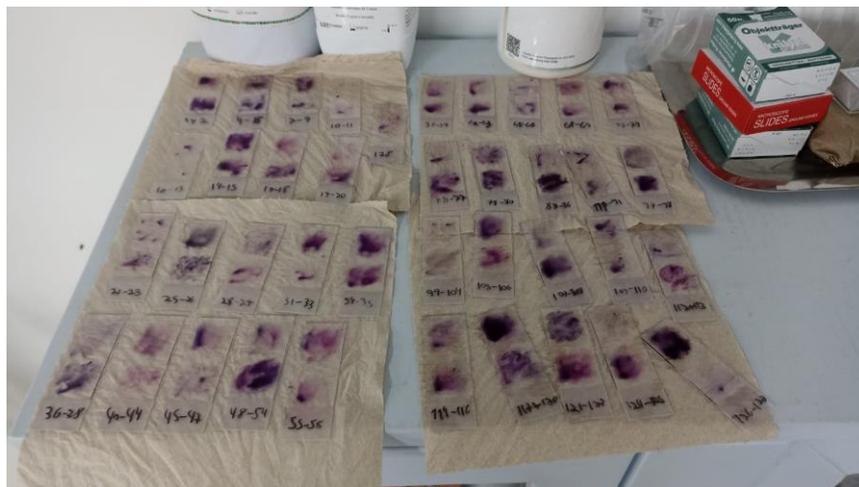
Figura 7: Diferentes agares utilizados en los cultivos.

6.8. Caracterización de las colonias:

Se tomó un registro fotográfico, y se realizó un análisis morfo-cultural de los crecimientos obtenidos, inmediatamente las cajas Petri cumplieron su periodo de 24 horas en la incubadora, esto con la finalidad de establecer los morfotipos, a los cuales se les realizó su identificación fenotípica por medio de las siguientes pruebas:

- **Tinción de Gram:** Es un procedimiento diferencial eficaz y de gran utilidad que permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos, Bacterias Gram positivas y Bacterias Gram negativas (López-Jácome et al., 2014), las cuales se pueden observar al microscopio finalizando el proceso (Fig. 8). Para este procedimiento se tomó una colonia del microorganismo objetivo, y con el apoyo de un asa previamente esterilizada se extendió sobre un portaobjetos en una gota de solución salina, y se secó exponiendo ligeramente el portaobjetos a la llama de un mechero.

Posteriormente, se aplicaron los diferentes colorantes: primero, cristal violeta durante 60 segundos, que permite teñir la capa de peptidoglicano de la pared bacteriana; segundo, Lugol por 60 segundos, que permite fijar el anterior colorante a la pared bacteriana, gracias a un complejo Cristal violeta-yodo; tercero, Alcohol-Acetona por 15-30 segundos, que deshidrata la pared bacteriana, destruyendo la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que son teñidas de rosa al aplicar Fuscina como último colorante por 45 segundos, lo que permite separarlas de las bacterias Gram positivas, que poseen el característico tono púrpura al observarse al microscopio. Entre cada paso del procedimiento, se enjuagó suavemente con agua para remover el exceso de los reactivos, y se dejó secar antes de aplicar el siguiente colorante.



- **Pruebas Bioquímicas:** A cada morfotipo ya confirmado por tinción de Gram, se le realizaron pruebas extra de Catalasa, Coagulasa y Oxidasa, como apoyo en el proceso de identificación (Fig. 9).

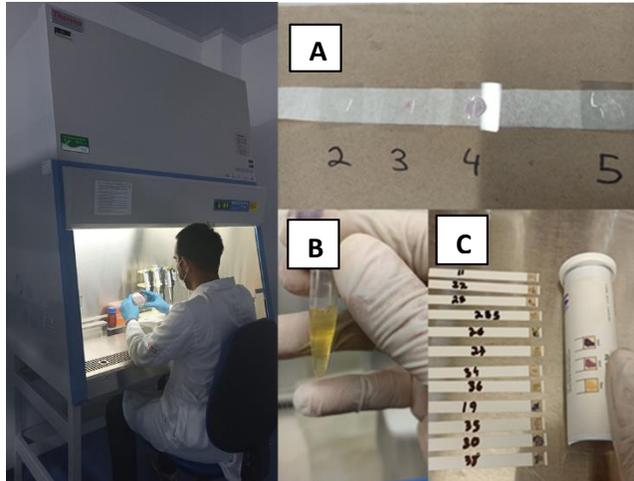


Figura 9: Pruebas bioquímicas preliminares de apoyo para la caracterización de las colonias: **A.** Catalasa, **B.** Coagulasa y **C.** Oxidasa.

- **Agares Cromogénicos:** una colonia de cada morfotipo fue tomada y repicada en el agar cromogénico Gelose chromID® CPS del fabricante BioMérieux SA; este medio es altamente eficaz para detectar e identificar bacterias que producen infecciones en el sistema urinario, incluso si se trabaja con colonias mezcladas permite diferenciar, por su color en el medio, Proteobacterias como *E. coli* (rojo) y *Proteus mirabilis* (marrón), así como bacterias grampositivas como *Enterococcus faecalis* (verde). A pesar de tener como objetivo estas tres especies, es posible que presenten crecimientos de otras cepas de los mismos grupos taxonómicos, por lo que se realiza la prueba de Indol para diferenciarlos (BioMérieux Clinical Diagnostics, 2021, October 6). Como adicción, se realizó una prueba control positivo y negativo con cepas ATCC para utilizar como guía al momento de identificar los morfotipos (Fig. 10).

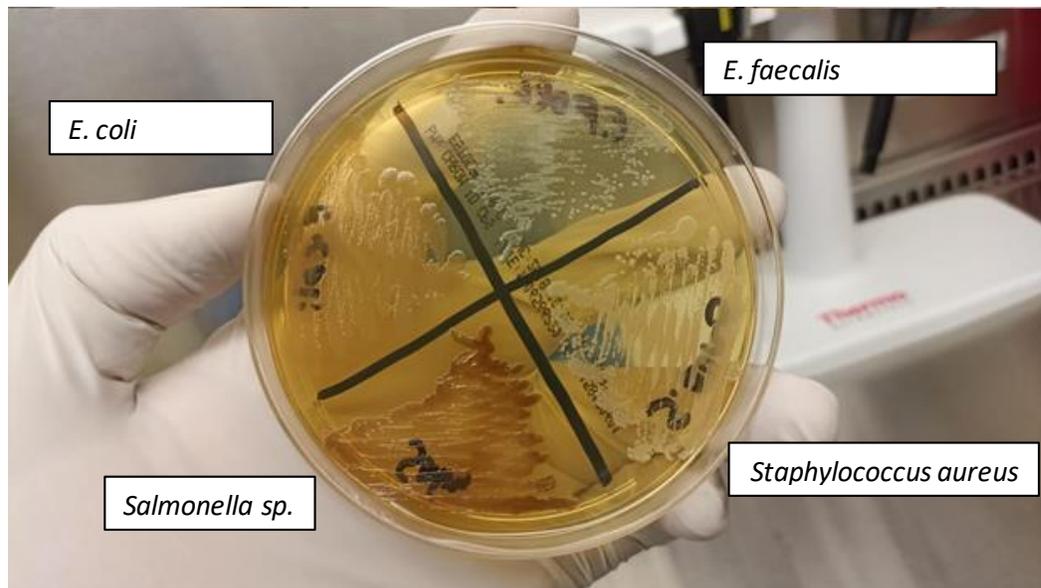


Figura 10: Control positivo de las diferentes especies identificadas por agar cromogénico.

Finalmente, de los morfotipos reconocidos se tomó una colonia para ser preservada para futuros análisis o repiques, siendo depositadas en viales de polipropileno (marca Eppendorf) con caldo BHI + Glicerol para ser congeladas a -23°C (Fig. 11).



Figura 11: Morfotipos conservados en tubos viales, en caldo BHI + glicerol congeladas a -23°C .

6.9. Plan de análisis para el procesamiento de los datos obtenidos:

La información morfométrica de los ejemplares capturados se integró en una tabla, y se realizó la definición del estadio de desarrollo de los ejemplares, considerando juveniles a los organismos con un tamaño por debajo de la talla de primera madurez sexual (TPMS), y adulto por encima de la misma; los valores de TPMS se obtuvieron a partir de los documentos de Mejía-Falla et al. (2011), Spieler et al. (2013) y Last et al. (2016). Adicionalmente, se elaboraron diagramas de barras con los valores de las medidas morfométricas registradas.

Se realizó un análisis descriptivo de los valores de medidas morfométricas en las tres especies de raya, así como se obtuvieron medidas de tendencia central como la media y medidas de dispersión de los datos, como desviación estándar, error estándar y varianza. Se realizaron las pruebas de Shapiro-wilks y de Levene para confirmar los supuestos de normalidad y homocedasticidad en todas las variables morfométricas (resultados de las pruebas en anexo 6), al no cumplirse los supuestos se implementaron pruebas no paramétricas. En el caso de *U. jamaicensis*, se evaluó el comportamiento de los datos morfométricos entre machos y hembras por medio de la prueba U de Mann-Whitney y se representaron de manera gráfica en un diagrama de caja o Boxplot.

Sobre los cultivos iniciales, se realizó un análisis morfocultural que permitió diferenciar los principales morfotipos, a estos se les realizó tinción de Gram y por medio de un diagrama de torta se representaron las proporciones de cada una de las formas observadas en el microscopio, siendo estos: bacilos, cocos o cocobacilos, así como su respectiva diferenciación entre Gram positivos y Gram negativos.

Completados los análisis morfoculturales, tinción de Gram y las pruebas bioquímicas aplicadas a cada uno de los denominados morfotipos o identidades bacterianas, se realizó un diagrama de barras con el número de identidades aisladas por cada OTU (Unidad taxonómica operacional), que en este estudio se definieron 5: 3 a nivel de familias (*Enterobacteriaceae*, *Morganellaceae* y *Vibrionaceae*), el Phylum Proteobacterias y por último, un conjunto de identidades bacterianas denominado "Sin ID" o "sin identificar", que al finalizar las pruebas no se logró categorizar en algún nivel taxonómico.

Posteriormente, se presentó la proporción de estas OTUs por cada una de las especies, para las muestras de agua y sedimento, así como el número de identidades bacterianas caracterizadas para cada OTU en cada especie de raya y en las muestras de agua y sedimento. A través de un diagrama ternario, realizado con el programa Pastv4.11 (Windows, Noruega), se estableció la relación entre *H. americanus*, *H. guttatus* y *U. jamaicensis* teniendo en cuenta los 5 OTUs definidos, y por medio de diagramas de Venn, utilizando la herramienta InteractiVenn (Heberle et al., 2015; Gonçalves e Silva et al., 2020), se presentaron de manera gráfica las identidades compartidas entre: 1) Los 5 grupos de muestras, que incluyen las 3

especies de rayas, agua y sedimento; 2) Las 3 especies de raya y muestras de agua; y 3) Las 3 especies de raya y muestras de sedimento.

Para analizar el comportamiento de las OTUs entre las tres especies de raya, se realizaron las pruebas de Shapiro-wilks y de Levene para confirmar los supuestos de normalidad y homocedasticidad (resultados de las pruebas en anexo 7), al no cumplirse los supuestos se implementó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, complementada con la prueba *a posteriori* de Dunn ($\alpha=0,05$).

Se generó un análisis del potencial patógeno teórico de aquellas identidades bacterianas registradas hasta el nivel de especie resaltando el impacto que pueden generar al momento de producirse las picaduras y cómo se comportan estas especies bacterianas en el medio marino junto con su importancia clínica.

Con el fin de identificar cuáles variables medidas en el estudio fueron las más influyentes al momento de determinar la composición del pool bacteriano asociado al aguijón de las rayas, se elaboró un modelo de análisis por medio de redes neuronales, también conocido como Extreme Learning Machine (por sus siglas en inglés, ELM), el cual destaca como una herramienta útil para generar resultados de estudios ecológicos, pesqueros o incluso microbiológicos (Namkung, 2020; Hosseini et al., 2022; Ning et al., 2022) cuya función es la de generar un análisis a partir de datos y variables no lineales simulando diferentes escenarios donde se le asignan pesos aleatorios a las variables de estudio por nodos o neuronas, resultando en una caracterización de los datos y sus influencias en los modelos. Este análisis permite juntar diferentes modelos de regresión para brindar resultados precisos aun trabajando con sets de datos relativamente pequeños (Goz & Karadurmus, 2019; Ulloa, 2021).

En relación con lo anterior, se tomó como variable independiente la presencia de cada una de las identidades bacterianas registradas en, al menos, uno de los 15 individuos, y como variables dependientes los datos cuantitativos, como las medidas morfométricas, los datos categóricos, como el sexo y la presencia-ausencia en las variables de especie y muestras del medio. Para realizar este modelo de ELM se siguieron los siguientes pasos:

1. Se transformaron aquellos datos categóricos (Macho-hembra, presencia-ausencia) en variables ficticias o "DUMMYS" que se ajustan al modelo de regresión (Peláez, 2016), para esto se le asignó un valor de **1** en las variables de estudio del individuo donde dicha bacteria fue registrada (Spp, sexo, registro en agua y/o sedimento) y un valor de **0** a las variables del individuo donde no se registró la bacteria o identidad bacteriana con el fin de darle un peso numérico.
2. Por medio de un análisis de regresión lineal en Excel (Microsoft, Estados Unidos), se determinó si los datos presentaban un comportamiento lineal en cada una de las variables por medio de 4 supuestos: **1.** Relación lineal, donde la media de los residuos es igual a 0; **2.** Comportamiento de los residuos de

manera normal; **3.** Homocedasticidad, donde las varianzas de los residuos son iguales y **4.** La independencia de los residuos (Peña & Slate, 2006).

- 3.** Al no cumplirse los supuestos y observar que no hay un comportamiento lineal de las variables, se diseñó un modelo de ELM que fue ejecutado a través de un código madre de prueba, en el cual se tomó una selección de 10 datos y se seleccionaron 8 elementos como individuos de entrenamiento o prueba, y 2 para verificar el funcionamiento del modelo, es decir un modelo de 80%:

```
1 model<-elm(P.mirabilis~.,P.mirabilis[0:8,],35,"sig")
2
3 predict(model,P.mirabilis[9:10,])
```

- 4.** Este modelo fue diseñado y ejecutado por medio de RStudio (R Development Core Team, Estados Unidos), en conjunto con algoritmos de la librería del programa que permiten realizar análisis de ELM, estos son “elmNNRcpp”, “KernelKnn”, “Rcpp” y “RcppArmadillo”. Estos algoritmos funcionan con los pasos y fórmulas presentados a continuación:

- I. Crear el peso de entrada w_i y el sesgo $b_i, i = 1, 2, \dots, \tilde{N}$ al azar con rango $[-1, 1]$
- II. Calcular la matriz de salida de la capa oculta H , como:

$$H = \begin{bmatrix} g(w_{1, \cdot} x_1 + b_1) & \cdots & g(w_{\tilde{N}, \cdot} x_1 + b_{\tilde{N}}) \\ \vdots & \cdots & \vdots \\ g(w_{1, \cdot} x_N + b_1) & \cdots & g(w_{\tilde{N}, \cdot} x_N + b_{\tilde{N}}) \end{bmatrix}_{\tilde{N} \times \tilde{N}}$$

- III. Calcular el peso de salida β , como:

$$\beta = H^\dagger T$$

$$\beta = \begin{bmatrix} \beta_1^T \\ \vdots \\ \beta_{\tilde{N}}^T \end{bmatrix}_{\tilde{N} \times m} \quad \text{and} \quad T = \begin{bmatrix} t_1^T \\ \vdots \\ t_N^T \end{bmatrix}_{N \times m}$$

Con el valor de H :

$$H^\dagger = (H^T H)^{-1} H^T \quad \text{and} \quad H^T H \text{ non-singular}$$

$$H^\dagger = H^T (H H^T)^{-1} \quad \text{and} \quad H H^T \text{ non-singular.}$$

Y valor de t :

$$t_i^k = \begin{cases} 1 & \text{if } c_i = k \\ -1 & \text{if } c_i \neq k \end{cases} \quad k = 1, 2, \dots, C.$$

Donde β = la matriz de ponderación de salida, H^\dagger = la pseudoinversa de Moore Penrose de la matriz H , T = matriz objetivo, H = matriz de capa oculta de salida, HT es la matriz de capa oculta de salida transpuesta, c_i es una etiqueta de clase para x_i y C es el número de clase.

- IV. Calcular la predicción de los resultados utilizando:

$$y_k = H \cdot \beta_k, \quad k = 1, 2, \dots, C.$$

- V. Estimando la etiqueta de clase utilizando:

$$\hat{c}_i = \arg \max_{k=1,2,\dots,C} y_i^k.$$

- VI. Se utilizó una función de activación (AF O FA), cuyo propósito es, primero, entrenar la red neuronal brindando el patrón sobre el cual se realizan las estimaciones, y, segundo, permitir realizar las ponderaciones de salida al final del modelo. En este modelo se trabajó con la función Sigmoide, que está representada en la ecuación:

$$f(x) = \left(\frac{1}{1 + \exp^{-x}} \right)$$

Las fórmulas y ecuaciones fueron tomadas del artículo guía elaborado por Ratnawati et al. (2020).

5. Después de verificar el funcionamiento del código madre, se diseñaron 3 modelos diferentes, teniendo en cuenta la diferencia en tallas de las tres especies de raya, y que algunas bacterias presentaban registro en solo un (1) individuo; esto con el fin de obtener datos más precisos al incluir todas las variables propuestas en la investigación.
6. En el primer modelo solo se tomaron los valores cuantitativos, es decir, los datos morfométricos (LT, AD y LA), en el segundo, se tomó el registro en las especies del estudio junto con AD y una conversión entre LA/LT para evitar un posible sesgo, y el tercer, y último, modelo donde se utilizaron todos los datos; se implementaron a su vez tres proporciones de entrenamiento (60%,70%,100%) así como 4 cantidades diferentes de neuronas o nodos (10, 35, 350, 1000), resultando en 12 valores por modelo en cada identidad bacteriana.

7. Por último, para evaluar el desempeño de estos resultados, se toma el Mean square error, o error cuadrado mínimo (MSE), calculado a partir de las predicciones del modelo y los sets de prueba; posteriormente, para evaluar el peso de cada una de las variables del estudio, se calculó el promedio ponderado de la influencia de cada una de estas variables usando los pesos de entrada y los pesos de salida de las neuronas, aprovechando la característica de las ELM de ser redes neuronales de “single layer”, o una sola capa intermedia. Como complemento se realizó un análisis de inferencia bayesiana para observar las probabilidades de presencia o ausencia de cada una de las identidades bacterianas según las variables.

7. RESULTADOS

7.1. Descripción general de las capturas de rayas

Fueron capturados 15 ejemplares de rayas durante la fase de campo, siendo de éstos 10 individuos de la especie *Urobatis jamaicensis*, 3 de *Hypanus guttatus* y 2 de *Hypanus americanus*. Respecto a la distribución de sexos, se encontraron 4 machos y 6 hembras para *U. jamaicensis*, 1 macho y 2 hembras para *H. guttatus* y, finalmente, 2 hembras para *H. americanus*.

7.1.1. Sexos y estadios de desarrollo

Los registros de tallas, basado en los parámetros definidos por Mejía-Falla et al. (2011), Spieler et al. (2013) y Last et al. (2016), demostraron que los ejemplares de *U. jamaicensis* eran adultos completamente desarrollados, mientras que para las dos especies del género *Hypanus*, teniendo en cuenta que la talla de madurez sexual para las hembras de estas dos especies oscila entre 50-55 cm de ancho de disco (AD), para *H. guttatus*, y 75-80 para *H. americanus*, se obtuvieron 3 juveniles (2 H.a, 1 H.g) y una hembra apenas pasada su primera madurez sexual (Tabla 1).

Tabla 1: Registro de tallas, longitud de aguijón, sexo y estadio de madurez para los ejemplares capturados.

Datos de captura							
Rayas	Zona de captura	Sexo	LT	AD	Long. aguijón	Técnica de captura	ED
U.j 1	Isla Palma (ISP)	M	25 cm	14 cm	5 cm	Red de mano	A

U.j 2	Isla Palma (ISP)	H	29 cm	18 cm	7 cm	Red de mano	A
U.j 3	Isla Palma (ISP)	H	37 cm	22 cm	10 cm	Red de mano	A
U.j 4	Isla Palma (ISP)	M	27 cm	16 cm	6 cm	Red de mano	A
U.j 5	Isla Palma (ISP)	H	37 cm	19 cm	5 cm	Red de mano	A
U.j 6	Isla Palma (ISP)	M	28 cm	15,5 cm	4 cm	Red de mano	A
U.j 7	Isla Palma (ISP)	H	30 cm	16 cm	4 cm	Red de mano	A
U.j 8	Isla Palma (ISP)	M	29 cm	14,5 cm	5 cm	Red de mano	A
U.j 9	Isla Palma (ISP)	H	34 cm	20 cm	7 cm	Red de mano	A
U.j 10	Isla Palma (ISP)	H	35 cm	19,5 cm	7 cm	Red de mano	A
H.g 1	Isla Palma (ISP)	M	114 cm	116 cm	15 cm	Red de mano	A
H.g 2	Isla Palma (ISP)	H	47 cm	48 cm	11 cm	Red de mano	J
H.g 3	Isla Palma (ISP)	H	65 cm	67 cm	12 cm	Red de mano	A
H.a 1	Isla Palma (ISP)	H	42 cm	47 cm	11 cm	Red de mano	J
H.a 2	Isla Palma (ISP)	H	35 cm	37,5 cm	10 cm	Red de mano	J

LT: Longitud Total. **AD:** Ancho de disco. **ED:** Estadio de Desarrollo, A. Adulto J. Juvenil
M: Macho, **H:** Hembra

7.1.2. Variables morfométricas

Los registros morfométricos (Fig. 12) fueron similares entre los ejemplares de *U. jamaicensis*, con una media de 31,1 cm de LT, con 17,45 cm de AD y 6 cm Longitud de agujón; los ejemplares de *H. americanus*, con una media de 38,5 cm de LT, con 42,25 cm de AD y 10,5 cm de LA; mientras que, en el caso de *H. guttatus*, al tener un ejemplar con aproximadamente el doble de las medidas del resto de individuos, se obtuvo una media de 75,3 cm de LT, con 77 cm de AD y 12,6 cm de LA.

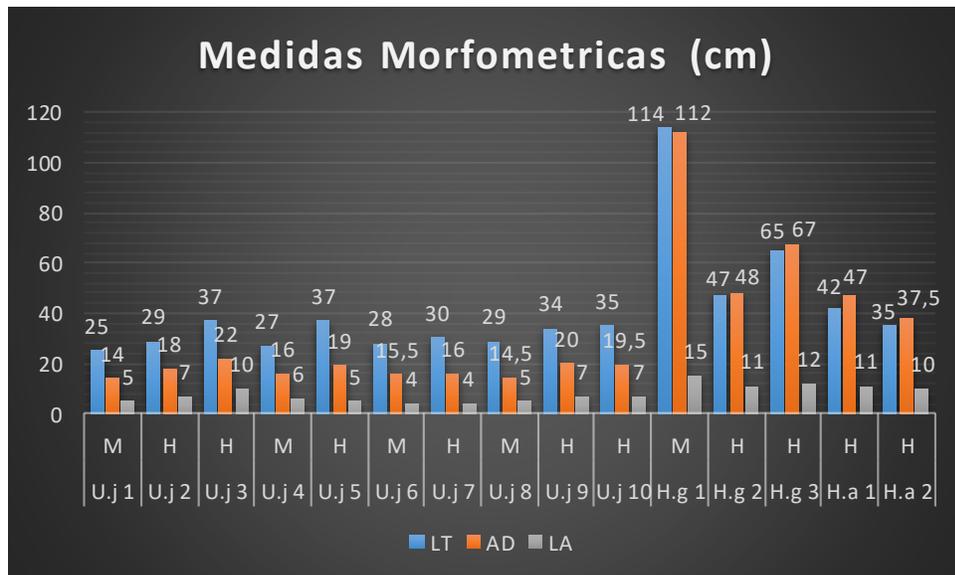


Figura 12: Medidas morfométricas obtenidas de los 15 individuos de las 3 especies: **LT**=Longitud Total, **AD**=Ancho de disco, **LA**=Longitud de Aguijón, **M**=Macho, **H**=Hembra, **U.j**=*U. jamaicensis*, **H.g**=*H. guttatus*, **H.a**=*H. americanus*.

Los individuos capturados del género *Hypanus* exhibieron unas tallas medias de 75.3 ± 34.6 cm, para *H. guttatus*, y de 38.5 ± 4.94 cm para *H. americanus*; la amplia diferencia en las tallas medias entre las dos especies se debe a la captura de un macho de gran tamaño de *H. guttatus*.

La especie con mayor número de ejemplares capturados fue *U. jamaicensis*, donde se obtuvieron 10 individuos previamente mencionados que poseen una media de tallas de 31.1 ± 4.3 cm, donde se evidenciaron diferencias significativas al analizar las medidas morfométricas entre machos y hembras, como en el caso de la longitud total (U Mann-Whitney = 0,018297; $p < 0.05$) y ancho de disco (U Mann-Whitney = 0,018655; $p < 0.05$), mientras que en la longitud del aguijón no se presentaron dichas diferencias (U Mann-Whitney = 0,18831; $p > 0.05$).

Así mismo, los diagramas de caja o Boxplot (Fig. 13) demuestran como las hembras de *U. jamaicensis* son los ejemplares de mayor tamaño, con relación a las tres medidas, pero se presentaron algunas excepciones para los aguijones (LA), donde ambos sexos comparten medidas similares.

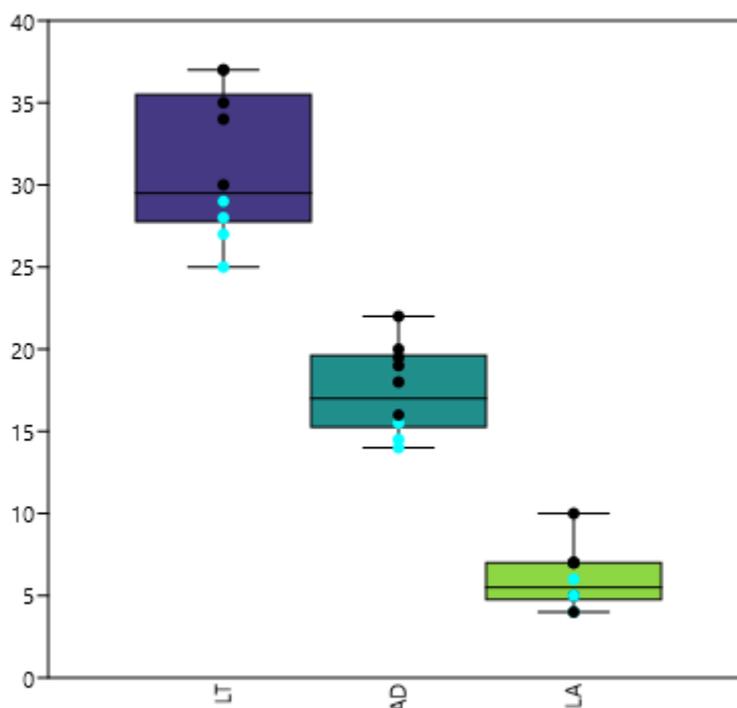


Figura 13: Boxplot entre hembras (puntos negros) y machos (puntos azules) de *Urobatis jamaicensis* para las medidas morfométricas: **LT**=Longitud Total, **AD**=Ancho de disco, **LA**=Longitud de Aguijón.

7.2. Definición de identidades bacterianas

Cuatro de los agares (Chocolate, Chromocult, EMB y Sangre) demostraron gran desempeño en los cultivos, registrando un crecimiento abundante y diverso de colonias; en el caso de TCBS, a pesar de que se cultivaron las 19 muestras (15 agujones, 2 muestras de sedimento y dos muestras de agua), solo se obtuvo crecimiento en 6 medios.

7.2.1. Análisis morfocultural

En total se registraron 164 crecimientos en los cultivos microbiológicos de agujones, sedimento y agua, a los cuales se les realizó un registro fotográfico a cada uno de los agares (anexo 1); posteriormente, se elaboró una matriz con el análisis morfocultural (anexo 2), donde se tomaron en cuenta las variables de color,

elevación, textura, contorno, entre otros; todos estos morfotipos fueron observados al microscopio posterior a la tinción de Gram.

7.2.2. Tinción de Gram

Este procedimiento permitió que los 164 microorganismos potencialmente únicos se redujeran en 66 morfotipos, donde se observó que la gran mayoría de identidades bacterianas eran Gramnegativas (74%), principalmente bacilos Gramnegativos los cuales representaron el 51% del total de los registros en los cultivos (Fig. 14).

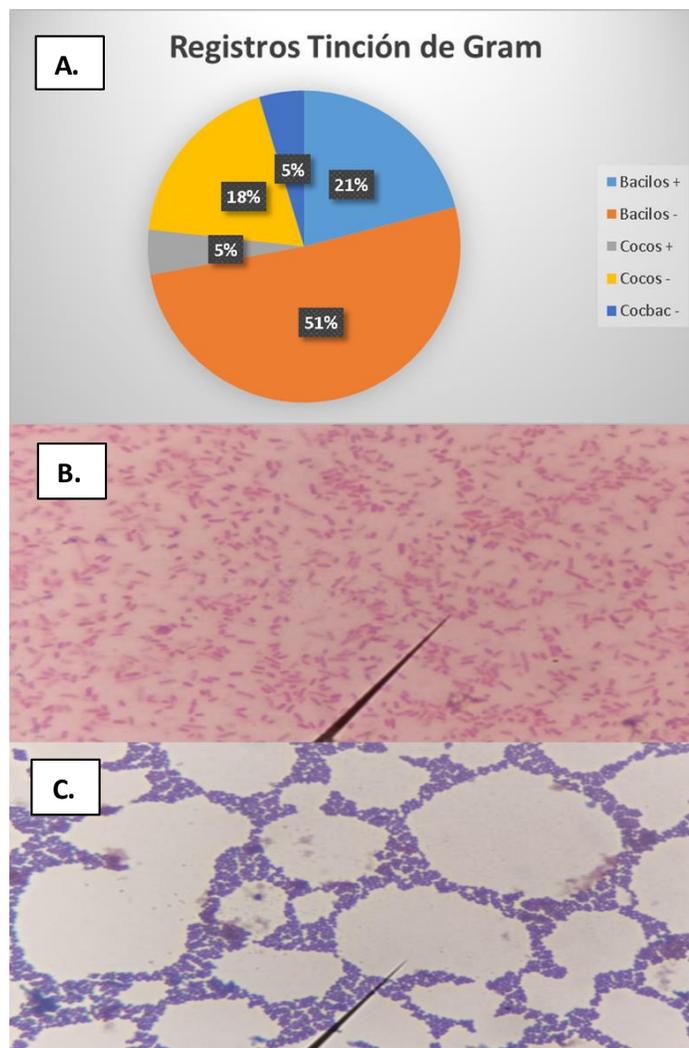


Figura 14: Registros Gramnegativos y Grampositivos en los cultivos microbiológicos. **A.** Porcentaje de representatividad en tinción de Gram **B.** Bacilos Gramnegativos **C.** Cocos Grampositivos.

7.2.3. Pruebas bioquímicas preliminares

Teniendo ya 66 morfotipos establecidos, se realizaron las pruebas preliminares de Catalasa, Coagulasa y Oxidasa (anexo 4), que en conjunto con los resultados obtenidos del repique de cada una de los morfotipos en agar cromogénico (anexo 5), en adición con la prueba de Indol, permitió la caracterización de 43 identidades bacterianas. Cabe mencionar que, aunque el agar cromogénico Gelose chromID® CPS se utilice principalmente para el análisis de bacterias Gramnegativas de interés clínico, el buen desempeño de cepas Grampositivas como *Enterococcus faecalis* observados a su vez en el control realizado dio las bases para repicar todos los morfotipos, incluso aquellos definidos Grampositivos por la tinción de Gram.

7.2.4. Unidades taxonómicas operacionales (OTUs)

7.2.4.1. Número de OTUs registradas

Las 43 identidades fueron subdivididas por medio de los resultados de los repiques en el agar cromogénico en 3 familias, algunas otras fueron catalogadas a nivel general en Phylum (*Proteobacterias*), y se les categorizó como Unidades Taxonómicas Operacionales u OTUs. Por último, aquellas bacterias que no tuvieron una respuesta por medio del color en el agar cromogénico, fueron definidas como cepas Sin identificar o Sin ID (Fig. 15).

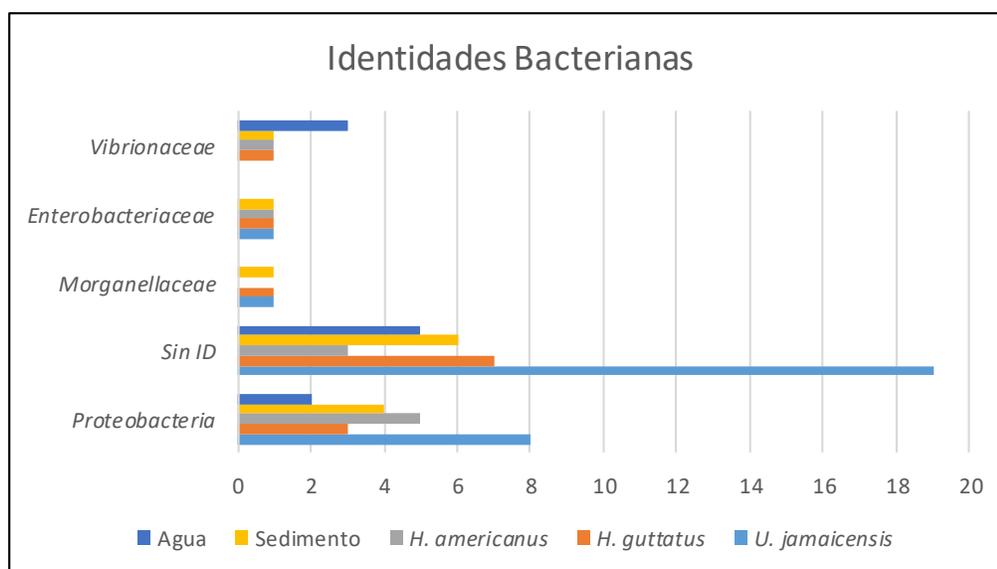


Figura 15: Numero de identidades bacterianas por OTU en las diferentes muestras del estudio.

7.2.4.2. Número de OTUs por especies de raya

En relación con las especies de raya del estudio, aquellas bacterias pertenecientes a las Proteobacterias, o por lo menos la mayoría de las identidades, fueron compartidas entre las 3 especies de raya; *U. jamaicensis* fue la especie que, no solo tuvo mayor cantidad de agujones recolectados, sino que a su vez fue la especie con mayor diversidad o mayor registro de identidades bacterianas (Fig. 16). El género *Hypanus*, por su parte, tuvo un registro directo de cepas de *Vibrio*, estas gracias al crecimiento en el medio TCBS, lo que no sucedió en *U. jamaicensis*, pero en un análisis global *Hypanus guttatus* (Fig.17) fue la segunda especie con mayor diversidad de especies, mientras que *H. americanus* tuvo un registro más bajo en cuanto a diversidad, y su composición se basó más que todo de Proteobacterias (Fig. 18).

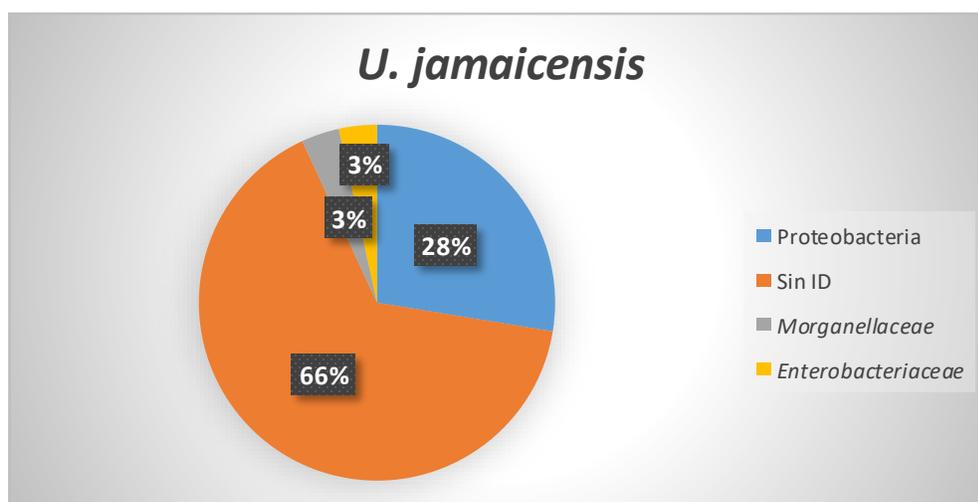


Figura 16: Representación porcentual de identidades bacterianas registradas en las diferentes OTUs en *Urobatis jamaicensis*.

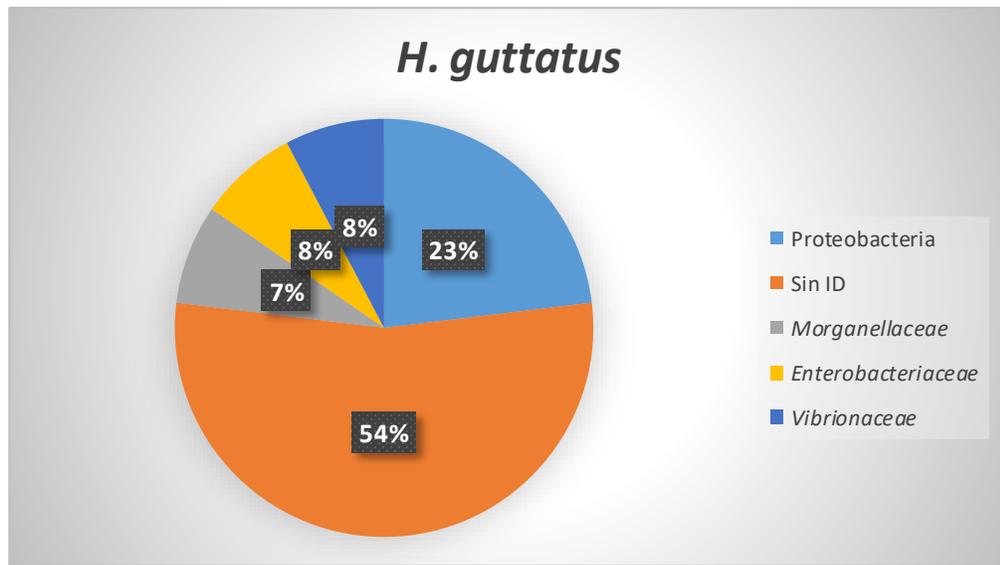


Figura 17: Representación porcentual de identidades bacterianas registradas en las diferentes OTUs en *Hypanus guttatus*.

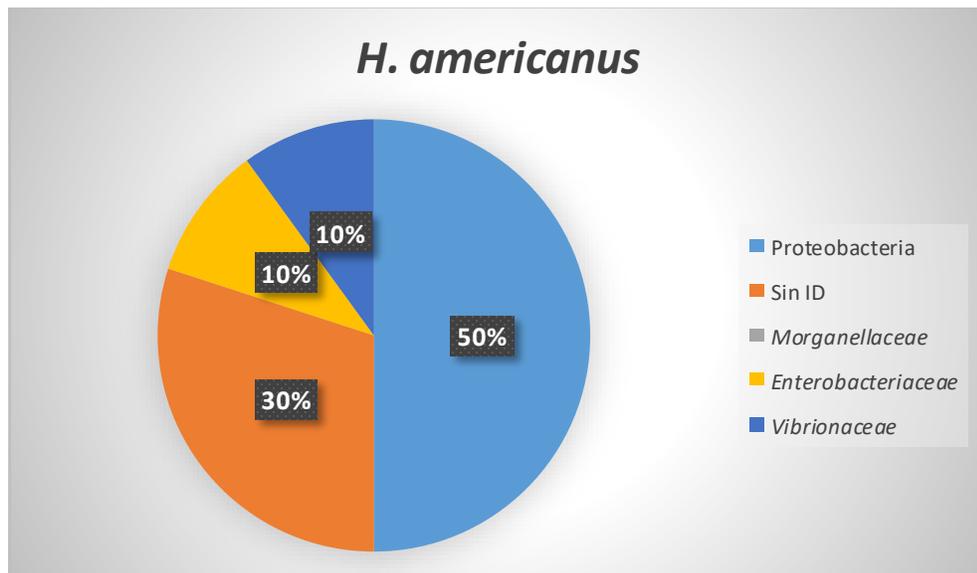


Figura 18: Representación porcentual de identidades bacterianas registradas en las diferentes OTUs en *Hypanus americanus*.

Todas las clasificaciones de las identidades bacterianas o OTUs fueron registradas en las tres especies de raya, con las excepciones de que no se tuvo registro de *Vibrio* spp. Directamente sobre el agar TCBS para *U. jamaicensis*, como a su vez no se registró crecimiento de *Proteus mirabilis* en las muestras de aguijón de *H.*

amaricanus (Fig. 19). De las 43 identidades definidas, 29 fueron observadas en los cultivos microbiológicos provenientes de las muestras de aguijón de *U. jamaicensis*, de los cuales 13 tienen registro único en los aguijones de esta especie, 14 identidades en los cultivos de *H. guttatus* con 3 registros únicos y 9 identidades en los cultivos de *H. americanus* con 2 registros únicos.

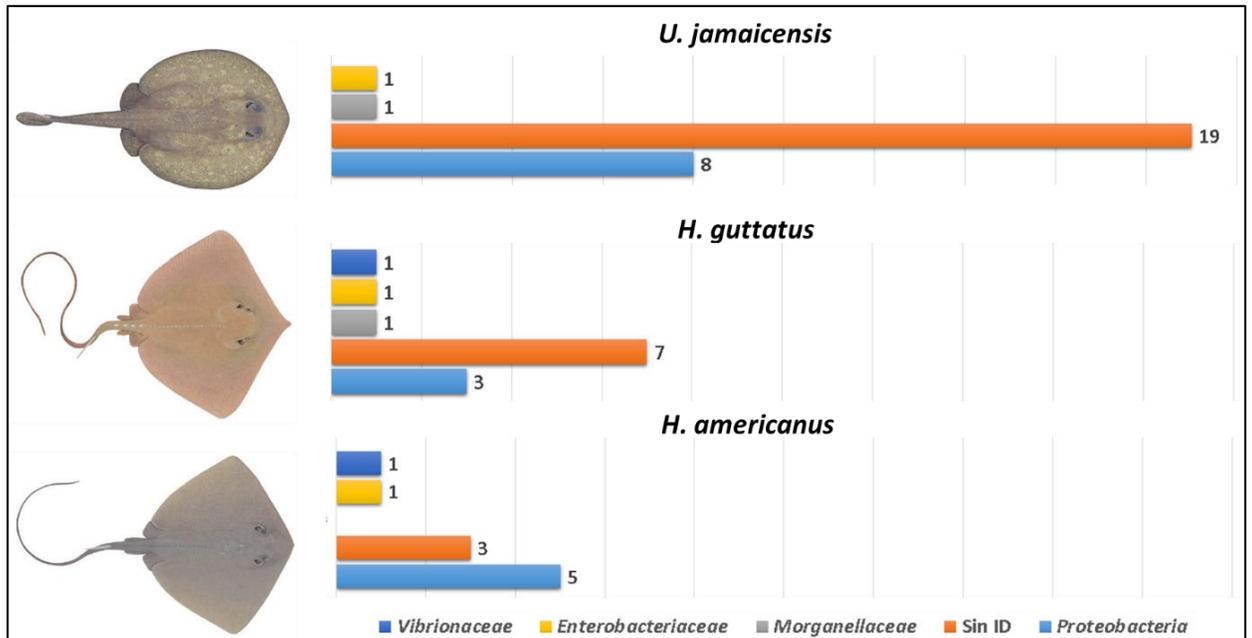


Figura 19: Composición bacteriana de los aguijones en cada especie de raya. Imágenes representativas de las especies tomadas y modificadas de Last et al. (2016).

Un diagrama ternario demuestra que la familia *Enterobacteriaceae* y las Proteobacterias son aquellos grupos que se encuentran en las tres especies, y es un factor que compara la similitud de estas tres especies de raya con una precisión del 62,8% aproximadamente. Por otro lado, *P. mirabilis* perteneciente a la familia *Morganellaceae*, solo fue identificada en *U. jamaicensis* y *H. guttatus*, como a su vez diferentes especies de *Vibrio* fueron identificadas de manera directa únicamente en el género *Hypanus*. Las identidades sin identificar tienen mayor afinidad hacia *U. jamaicensis*, algo evidente, si se tiene en cuenta los 19 registros de identidades bacterianas Sin ID, donde de éstos 10 son exclusivos de los aguijones de *U. jamaicensis* (Fig. 20).

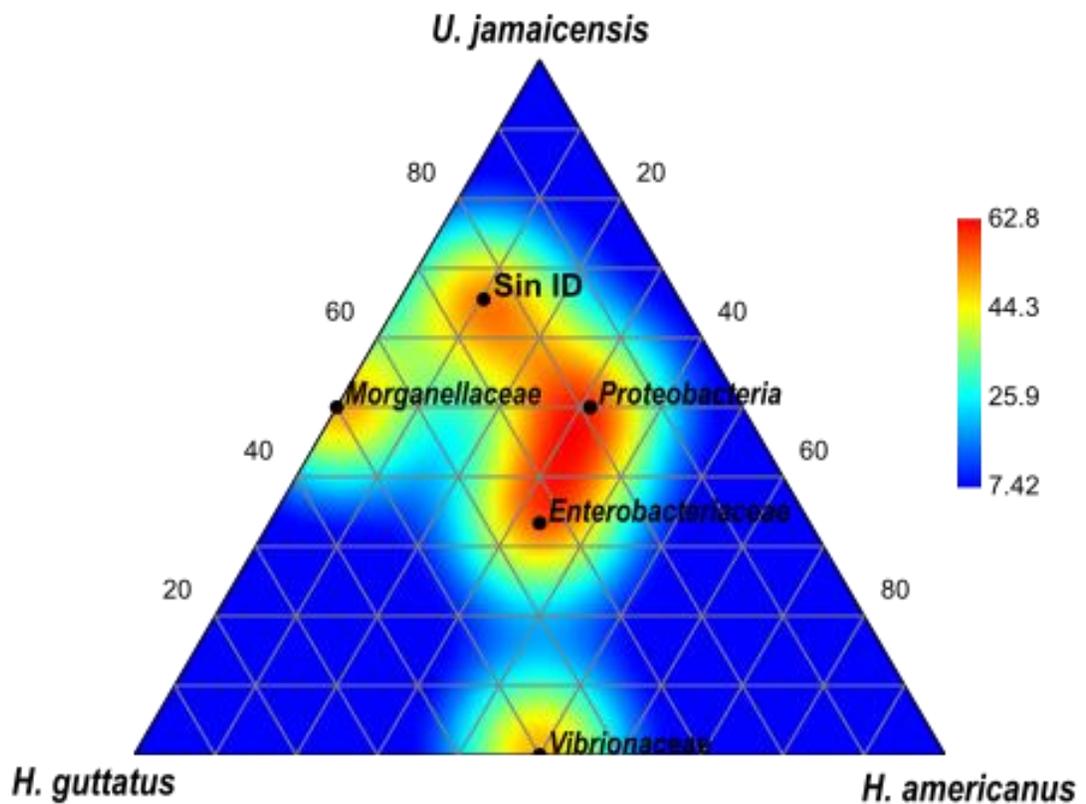


Figura 20: Diagrama ternario representando la relación entre las tres especies de raya mediante su similitud en composición bacteriana por OTUs.

7.2.4.3. Número de OTUs en muestras de agua y sedimento

Las muestras ambientales (agua y sedimentos) mostraron un registro diverso en términos de OTUs, pero no en cantidad de identidades únicas. El sedimento presentó un mayor registro de identidades bacterianas, similar al de las especies de rayas, especialmente a aquellas pertenecientes a las *Proteobacterias* y cepas de la familia *Vibrionaceae* (Fig. 21). Por último, se obtuvieron solo 10 registros de identidades bacterianas provenientes de las muestras de agua (Fig. 22).

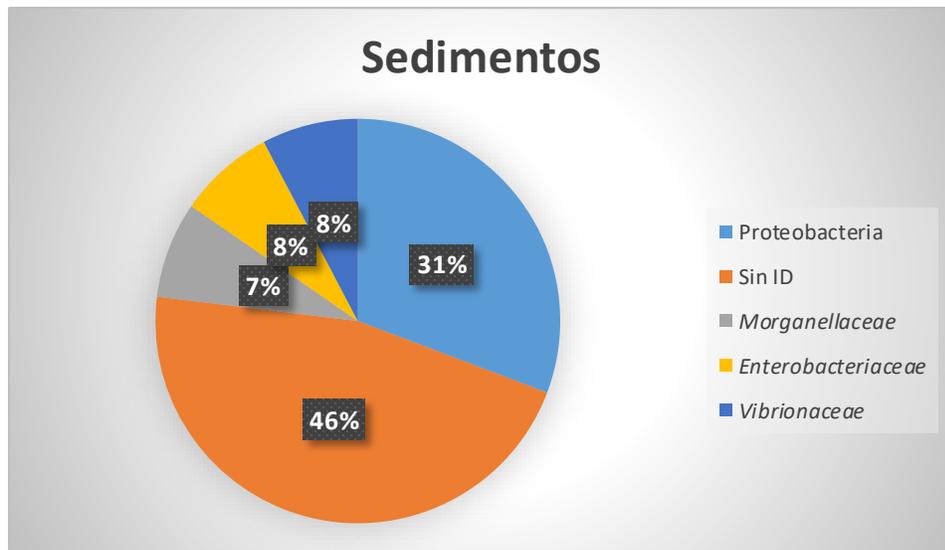


Figura 21: Representación porcentual de identidades bacterianas registradas en las diferentes OTUs en muestras de sedimentos.

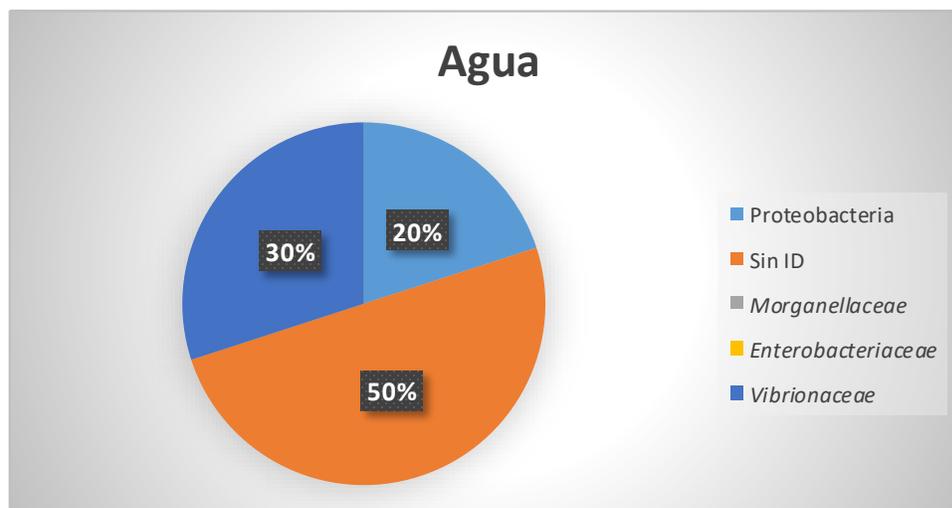


Figura 22: Representación porcentual de identidades bacterianas registradas en las diferentes OTUs en muestras de agua.

Solo el sedimento presentó crecimiento de los 5 grupos definidos; además, dentro de sus registros cuenta con 6 identidades bacterianas únicas de estas muestras, con 13 registros en total. Las muestras de agua, a pesar de no tener un crecimiento destacado de la mayoría de los grupos, sí logró aislar 3 cepas diferentes de *Vibrio* sp., siendo éste su grupo más abundante, junto identidades sin identificar. En total se registraron 10 identidades bacterianas con 4 cepas únicas (Fig. 23).

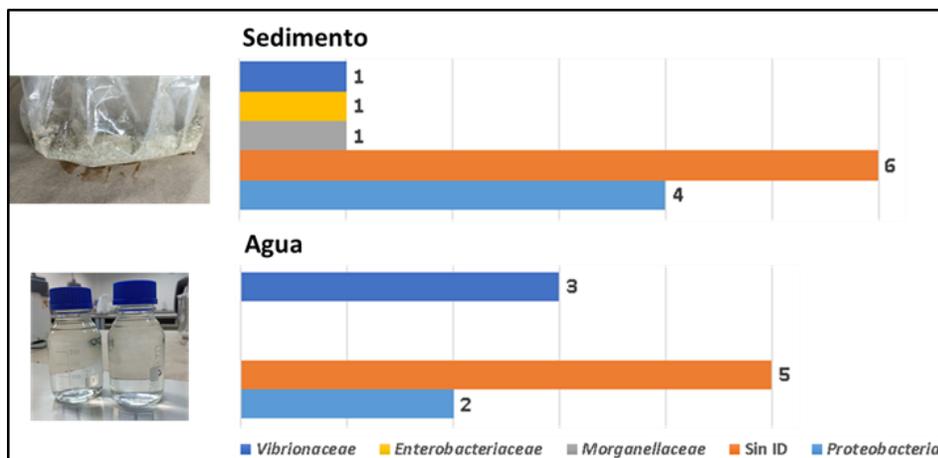


Figura 23: Composición bacteriana de las muestras de sedimento y de agua provenientes de la zona de captura.

7.2.4.4. Análisis conjunto de las OTUs registradas en las distintas especies de raya y las muestras del medio

No se encontraron bacterias que fueran compartidas entre los 5 conjuntos de muestras: las especies (*H. americanus*, *H. guttatus* y *U. jamaicensis*) y las muestras del medio (agua y sedimento), como se evidencia en el diagrama de Venn (Fig.24). Sin embargo, si se toman las identidades bacterianas de las especies de raya con las muestras de agua, se encuentra que comparten solo dos identidades, PRO1 y SID3 (Fig.25), así como la relación con el sedimento evidencia que, aunque solo tienen una bacteria en común con las tres especies de raya, resultan ser el componente medioambiental que más se relaciona con la composición del aguijón al compartir 6 identidades bacterianas (Fig.26).

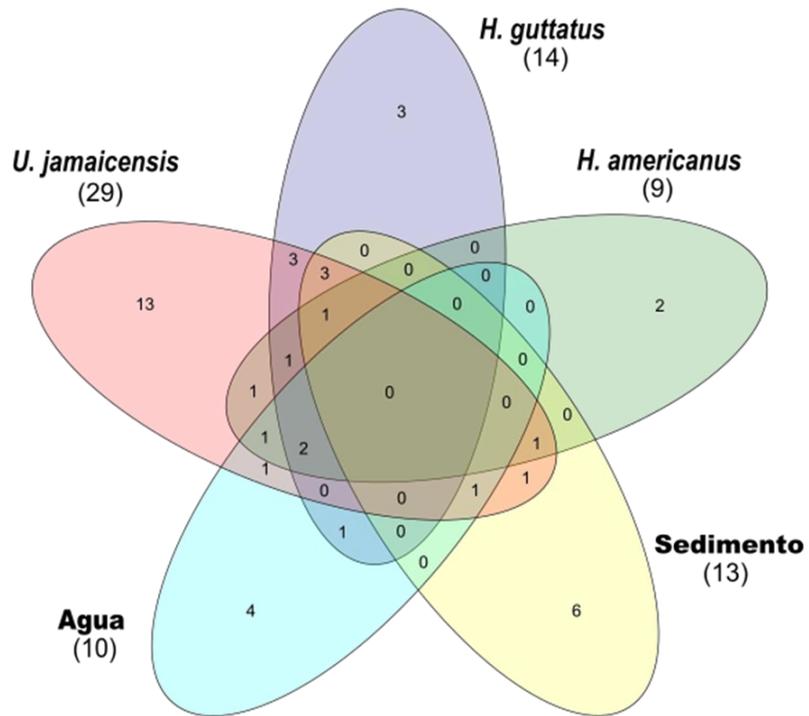


Figura 24: Diagrama de Venn representando las relaciones de las identidades bacterianas entre las tres especies de raya y el medio.

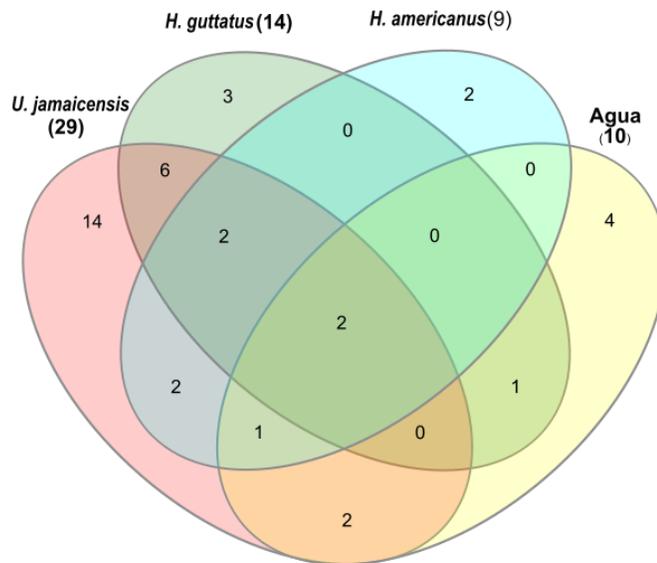


Figura 25: Diagrama de Venn representando las relaciones de las identidades bacterianas entre las tres especies de raya y las muestras de agua.

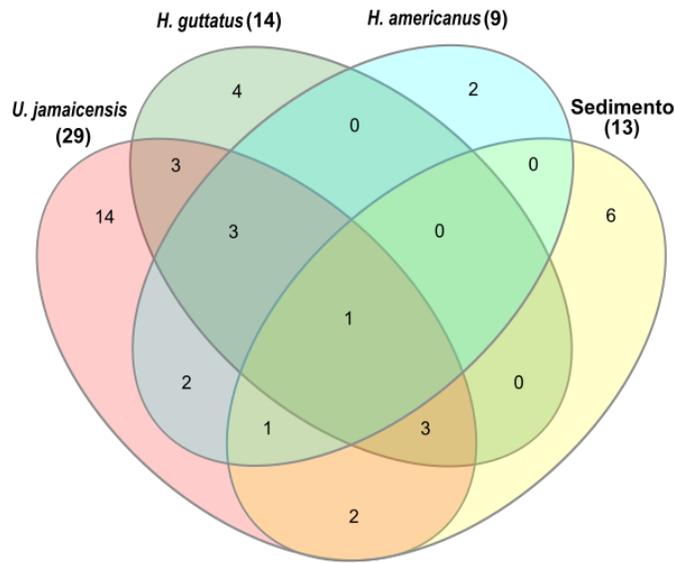


Figura 26: Diagrama de Venn representando las relaciones de las identidades bacterianas entre las tres especies de raya y las muestras de sedimento.

7.2.5. Potencial patógeno de las especies identificadas

Las técnicas empleadas en la caracterización de este estudio permitieron el aislamiento y registro de 4 identidades bacterianas hasta el nivel de especie, siendo estas 4 proteobacterias: *E. coli*, *P. mirabilis*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio alginolyticus*. Especies como *E.coli* y *P.mirabilis* son especies derivadas de aguas residuales, o de desechos orgánicos del hombre u otros organismos marinos que pueden sobrevivir en el medio marino adhiriéndose a un huésped u organismo, ambas pueden causar grandes infecciones y suelen ser oportunistas cuando se produce una herida (Fernández-Delgado et al., 2007; Luna et al. 2010).

Las especies del genero *Vibrio*, como nativas del medio natural, tienen una amplia distribución en el agua de mar y se les asocia con eventos de mortandad de peces de cultivo y crustáceos (Zorilla et al., 2003; Sganga et al., 2009), así como con enfermedades e infecciones en los seres humanos. Estas bacterias pueden causar infecciones, siempre y cuando ingresen al organismo por consumo o por heridas en el cuerpo (Tabla 2).

Tabla 2: Descripción de las especies y su potencial patógeno en los accidentes con rayas y las heridas causadas por el aguijón.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Especie	Descripción
Proteobacterias	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>E. coli</i>	Establecida como indicadores de contaminación fecal antropogenico (Gross et al. 2020), <i>E.coli</i> puede sobrevivir en los sedimentos y agua marina proveniente de aguas residuales así como de las heces fecales de los organismos marinos (Rozen & Belkin, 2001; Luna et al. 2010).Posee 6 diferentes subgrupos que pueden adoptar comportamientos comensales y hasta patógenos (Van Elsas et al. 2011) causando afectaciones como diarrea, dolor abdominal, fiebre y vómito
			Morganellaceae	<i>P. mirabilis</i>	<i>P.mirabilis</i> es conocido por ser un patógeno presente en las infecciones del tracto urinario así como ser una bacteria oportunista presente en heridas y quemaduras (Manos & Belas, 2006; Fernández-Delgado et al., 2007). Las bacterias del género <i>Proteus</i> pueden estar relacionados con diversos organismos acuáticos, logando habitarlos o incluso causar la mortalidad de los mismos en cultivos (Drzewiecka 2016; Zhai et al. 2023).
		Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio cholerae</i>	Los Vibrios son bacilos Gramnegativos nativos de aguas marinas con gran distribución e incluye una variedad de especies patógenas (Fleming et al., 2006; Håkonsholm et al., 2020). Como su nombre lo indica, <i>V.cholerae</i> es el microorganismo responsable de inducir la enfermedad del cólera que resulta en diarrea (Maheshwari et al., 2011), mientras que <i>V. alginolyticus</i> ha sido asociada a la mortandad de especies de cultivo y a las infecciones en el ser humano si ingresa al sistema por ingesta o por medio de un corte o herida en la piel (Zorilla et al., 2003; Sganga et al., 2009).
				<i>Vibrio alginolyticus</i>	

7.3. Modelo “Extreme Learning Machine” (ELM)

7.3.1. Datos requeridos

El modelo de ELM diseñado para esta investigación tiene como objetivo identificar aquellas variables que determinan o tiene más influencia en la composición bacteriana del pool bacteriana proveniente de los agujijones. Para esto se tomó en cuenta el comportamiento de los datos obtenidos en las medidas morfométricas y se analizó las identidades bacterianas en los diferentes OTUs respecto a las especies de raya por medio de sus medidas de tendencia central (Tabla 3).

Tabla 3: Estadística descriptiva para las identidades bacterianas pertenecientes a los diferentes OTUs registrados en las especies de Raya: Medidas de tendencia central (PROM) y medidas de dispersión de datos (Error std, Varianza, Desv. Std).

	<i>Proteobac</i>	<i>Sin ID</i>	<i>Morganella</i>	<i>Enterobac</i>	<i>Vibrio</i>
<i>U. jamaicensis</i>					
U.j 1	4	6	0	0	0
U.j 2	5	2	1	0	0
U.j 3	2	3	1	1	0
U.j 4	4	3	1	1	0
U.j 5	5	3	0	1	0
U.j 6	3	7	1	1	0
U.j 7	4	2	1	1	0
U.j 8	4	2	1	0	0
U.j 9	2	3	1	1	0
U.j 10	4	3	1	0	0
PROM	3.7	3.4	0.8	0.6	0
Error std.	0.3349959	0.541603	0.1333333	0.1632993	0
Varianza	1.122.222	2.933.333	0.1777778	0.2666667	0
Desv. Std	105.935	1.712.698	0.421637	0.5163978	0
<i>H. guttatus</i>					
H.g 1	3	4	1	0	0
H.g 2	1	4	0	0	0
H.g 3	0	1	0	1	1
PROM	1.333.333	3	0.3333333	0.3333333	0.33333
Error std.	0.8819171	1	0.3333333	0.3333333	0.33333
Varianza	2.333.333	3	0.3333333	0.3333333	0.33333

Desv. Std	1.527.525	1.732.051	0.5773503	0.5773503	0.57735
H. americanus					
H.a 1	2	3	0	1	0
H.a 2	4	1	0	0	1
PROM	3	2	0	0.5	0.5
Error std.	1	1	0	0.5	0.5
Varianza	2	2	0	0.5	0.5
Desv. Std	1.414.214	1.414.214	0	0.7071068	0.70711

Las identidades bacterianas de estos OTUs presentaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis = 3,065E-10; $p < 0.05$), entre las especies pertenecientes al Phylum Proteobacterias y las especies del género *Vibrio* (Dunn $p=6,688E-08$).

7.3.2. Análisis de regresión lineal

Como parte de los análisis estadísticos se realizó un aproximamiento al comportamiento de cada una de las identidades bacterianas identificadas respecto a las variables por medio de una Regresión lineal (anexo 6), lo que mostró, en primera instancia, que más de la mitad de las bacterias (67.6%) no tiene un comportamiento lineal respecto a las variables, donde se logra observar que los valores que le dan validez al modelo no son adecuados (R^2 muy por debajo de 1 y valor p intercepto por debajo de 0.05), esto hace que se rechace este tipo de regresión al no tener validez por no cumplir con los estándares de ambos valores (Tabla 4).

Tabla 4: Valores obtenidos en la prueba de regresión lineal.

Regresión Lineal				
Identidad	R²	P intercepto	Validez*	Veredicto
<i>E. coli</i>	0.402334244	0.165710218	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
ENT.1	0.751370931	0.033770439	VALIDO	R ² y p intercepto no adecuado
<i>P. mirabilis</i>	0.584571136	0.436934092	VALIDO	R ² y p intercepto no adecuado
PRO.1	0.510664855	0.283056666	VALIDO	R ² y p intercepto no adecuado
PRO.2	0.991939857	0.001570683	NO VALIDO	p intercepto no adecuado
PRO.3	0.986359758	0.961182889	VALIDO	R ² y p intercepto no adecuado
PRO.4	0.621491293	0.044097459	NO VALIDO	p intercepto no adecuado
PRO.5	0.230996942	0.953756459	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²

PRO.6	0.469134691	0.47583178	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
PRO.7	0.39030482	0.905042034	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
PRO.8	0.138623037	0.907340204	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.1	0.625442495	0.396943132	VALIDO	Ambos valores son validos
SID.2	0.24109881	0.86226838	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.3	0.205664524	0.720458207	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.4	0.553803431	0.260949659	VALIDO	Ambos valores son validos
SID.5	0.405190654	0.874422228	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.6	0.538632888	0.307273033	VALIDO	Ambos valores son validos
SID.7	0.743459812	0.283614446	VALIDO	Ambos valores son validos
SID.8	0.24109881	0.86226838	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.9	0.24109881	0.86226838	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.10	0.691665386	0.764321898	VALIDO	Ambos valores son validos
SID.11	0.819979134	0.927118988	VALIDO	Ambos valores son validos
SID.12	0.269860745	0.589376954	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.13	0.47765441	0.469385692	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.14	0.331575875	0.232899857	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.15	0.331575875	0.232899857	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.16	0.242783823	0.455185001	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.17	0.331575875	0.232899857	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.18	0.334586331	0.449872897	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.19	0.138623037	0.907340204	NO VALIDO	Valor no adecuado de R ²
SID.20	0.97334519	0.000731186	NO VALIDO	<i>p</i> intercepto no adecuado
SID.21	0.971452162	0.000229483	NO VALIDO	<i>p</i> intercepto no adecuado
<i>V. cholerae</i>	0.54715986	0.110418326	VALIDO	R ² y <i>p</i> intercepto no adecuado
VIB.2	0.75137093	0.033770439	NO VALIDO	<i>p</i> intercepto no adecuado
Para que un modelo sea válido debe poseer un R² cercano a 1 y un <i>p</i> intercepto por encima de 0.05, si no se cumple alguna de las estimaciones no es válido.				

7.3.3. Definición de las variables que más influyen en la composición bacteriana

Implementada una vez la red neuronal con sus diferentes modelos (anexo 7), se analizaron cada una de las 36 valoraciones dadas juntando los 3 modelos y se seleccionó el valor de MSE más cercano a 0, es decir, el valor del modelo con mayor precisión y que se adapta al comportamiento de la identidad bacteriana dentro del análisis de regresión (Tabla 5).

Tabla 5: Resultados de los mejores valores para cada identidad bacteriana.

Identidad	MSE	# Neuronas	Proporción de entrenamiento
<i>E. coli</i>	0.048273041	35	100%
ENT.1	0.009979552	35	100%
<i>P. mirabilis</i>	0.029435522	1000	100%
PRO.1	0.043067692	35	100%
PRO.2	0.012299411	35	100%
PRO.3	0.010711527	35	100%
PRO.4	0.008916601	350	100%
PRO.5	0.076172239	350	70%
PRO.6	0.07675261	350	100%
PRO.7	0.005653223	35	70%
PRO.8	0.033376112	35	100%
SID.1	0.005653223	35	70%
SID.2	0.015184774	350	100%
SID.3	0.060329036	350	100%
SID.4	0.051236477	35	100%
SID.5	0.127507161	350	100%
SID.6	0.044564847	35	100%
SID.7	0.013082811	35	100%
SID.8	0.026011169	35	70%
SID.9	0.026011169	35	70%
SID.10	0.015071084	350	100%
SID.11	0.004392177	350	70%
SID.12	0.019261643	35	60%
SID.13	0.008009207	35	70%
SID.14	0.021946113	35	70%
SID.15	0.021946113	35	70%
SID.16	0.021946113	35	70%
SID.17	0.021946113	35	70%
SID.18	0.042118032	35	100%
SID.19	0.051482606	350	100%
SID.20	0.016933581	35	100%
SID.21	0.016933581	35	100%
<i>V. cholerae</i>	0.038659227	35	100%
VIB.2	0.010987474	35	100%

Los resultados de los modelos obtenidos previamente nos permiten obtener el peso de cada una de las variables dentro del modelo desarrollado aplicando un promedio ponderado a los valores generados por cada neurona (anexo 8), otorgando así el acercamiento matemático que reporta que variable tiene mayor influencia en la composición del pool bacteriano del agujón de raya. Resaltando que las variables de mayor influencia son las medidas morfométricas, seguido de *U. jamaicensis* como especie de mayor influencia en el modelo (Tabla 6). *H. guttatus* posee el valor más cercano a 1, pero al ser el valor más influyente en solo 1 de los 34 análisis realizados dentro del modelo, no es tenido en cuenta.

Tabla 6: Mejor y segundo mejor valor de promedios ponderados por variable destacando las más influyentes en los modelos elaborados (Próximo a 1).

Variable	Mejor valor	Segundo mejor valor
Hembra	No aplica	No aplica
Macho	0.447417993	0.7063089
<i>U. jamaicensis</i>	0.37601793	0.201573812
<i>H. guttatus</i>	0.60677293	0.156366519
<i>H. americanus</i>	0.35425178	0.372707005
Agua	No aplica	0.050886485
Sedimento	No aplica	0.42811531
Longitud Total (LT)	0.342117767	0.06829736
Longitud Agujón (LA)	0.00952258	0.2371995
Ancho de Disco (AD)	0.326426383	0.193459854
LA/LT	0.352451973	0.218623767

Aun así, dentro de las 32 identidades bacterianas tenidas en cuenta para el modelo, la variable que más veces destacó como el mejor valor fueron las longitudes (LA/LT y AD), con un 42% de contribución en total (Fig. 26). Como dato adicional, si se toman los segundos mejores valores de cada modelo (Fig. 27), se puede observar cómo *H. guttatus* destaca dentro del modelo, así como el sedimento, que a pesar de que no tuvieron el mejor valor en el análisis, son en su medida determinantes al hablar de composición bacteriana del agujón.

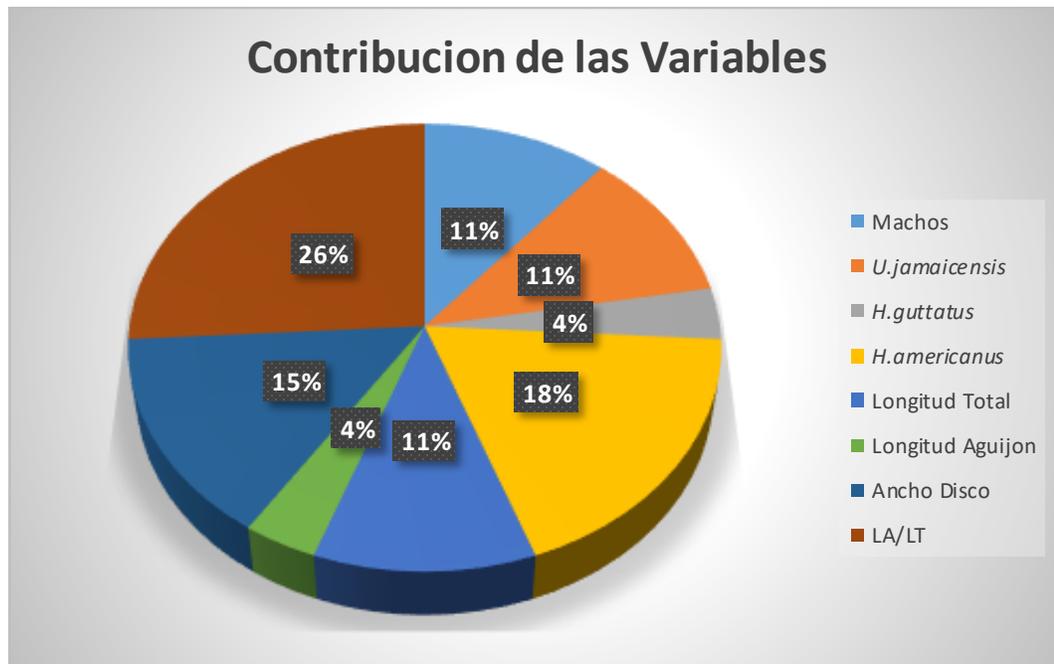


Figura 27: Contribución o peso de las variables dentro del modelo.

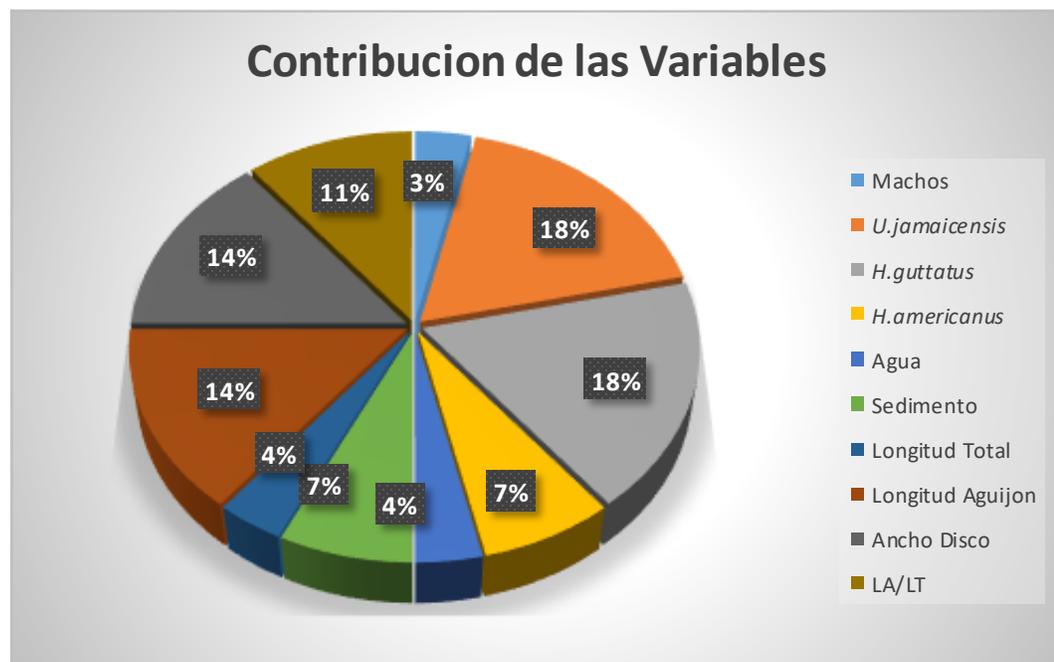


Figura 28: Contribución de los segundos mejores valores al modelo.

Probabilidad Bayesiana:

La inferencia bayesiana o probabilidad bayesiana permite asignar un valor complementario a los datos presentados anteriormente. Aquí se lista la probabilidad de que cada identidad bacteria esté presente según su interacción con las variables categóricas, obteniendo el porcentaje por especies, sexo y entre machos y hembras de cada especie de raya (Tabla 7).

Tabla 7: Probabilidad bayesiana por cada variable categórica.

$p(\theta x)$	H (%)	M (%)	U.j (%)	H.g (%)	H.a (%)	H-U.j (%)	H-H.a (%)	H-H.g (%)	M-U.j (%)	M-H.g (%)
<i>E. coli</i>	50	40	60	33	0	67	0	50	67	0
ENT1	10	0	0	0	50	0	50	0	0	0
<i>P. mirabilis</i>	50	80	80	33	0	83	0	100	75	0
PRO1	60	80	60	67	100	50	100	50	75	100
PRO2	60	100	100	33	0	100	0	0	100	100
PRO3	80	100	100	33	100	100	100	0	100	100
PRO4	10	20	20	0	0	17	0	0	25	0
PRO5	20	20	30	0	0	33	0	0	25	0
PRO6	30	20	30	0	50	33	50	0	25	0
PRO7	20	20	20	0	50	17	50	0	25	0
PRO8	10	0	10	0	0	17	0	0	0	0
SID1	30	20	20	67	0	17	0	100	25	0
SID2	0	20	10	0	0	0	0	0	25	0
SID3	30	20	20	33	50	17	50	50	25	0
SID4	30	40	50	0	0	50	0	0	50	0
SID5	40	20	40	33	0	50	0	0	50	0
SID6	10	20	20	0	0	17	0	0	0	0
SID7	40	40	50	33	0	67	0	0	25	100
SID8	0	20	10	0	0	0	0	0	25	0
SID9	0	20	10	0	0	0	0	0	25	0
SID10	30	40	10	67	100	0	100	50	25	100
SID11	20	0	10	0	50	17	50	0	0	0
SID12	0	20	10	0	0	0	0	0	25	0
SID13	10	0	10	0	0	17	0	0	0	0
SID14	0	20	10	0	0	0	0	0	25	0
SID15	0	20	10	0	0	0	0	0	25	0
SID16	0	20	10	0	0	0	0	0	25	0
SID17	0	20	10	0	0	0	0	0	25	0

SID18	0	20	10	0	0	0	0	0	25	0
SID19	10	0	10	0	0	17	0	0	0	0
SID20	0	20	0	33	0	0	0	0	0	100
SID21	0	20	0	33	0	0	0	0	0	100
<i>V. cholerae</i>	10	0	0	33	0	0	50	0	0	0
VIB2	10	0	0	0	50	0	50	0	0	0

8. DISCUSION

8.1. Apreciaciones generales sobre las especies de raya y los individuos capturados

Las rayas alrededor del mundo, y entre ellas aquellas especies registradas en el presente estudio, son mesodepredadores de importancia pesquera que juegan un rol importante en la regulación de los ecosistemas (Perry et al., 2021); y así como son controladores de poblaciones de muchas especies de invertebrados marinos, también son presa de una gran diversidad de organismos, con los cuales presentan encuentros agonísticos (Bornatowski et al., 2014). Comprender la composición bacteriana en los agujones de estos organismos, permite generar el conocimiento suficiente para identificar aquellos componentes que pueden persuadir a un depredador, o afectar la salud humana, en los eventuales accidentes con las rayas, además permiten conocer más a detalle sus mecanismos de defensa y aquellos factores que pueden moldear, con el paso del tiempo, las poblaciones de microorganismos asociados por medio del proceso conocido como phyllosymbiosis (Doane et al., 2020).

La especie más representativa en los muestreos de la presente investigación fue *U. jamaicensis*, lo cual se justifica al analizar las condiciones ecológicas de la zona de colecta, ya que la principal cobertura en cercanías de isla Palma, son las praderas de pastos marinos (Gómez-López, 2011), con composición predominante del pasto tortuga *Thalassia testudinum* y una comunidad coralina asociada, que constituye el hábitat principal de esta especie. Adicionalmente, la presencia de solo ejemplares adultos de la especie precisamente en el mes de muestreo (Agosto), podría ser consecuencia de la unión de dos procesos importantes: la segunda etapa reproductiva anual de la especie (Agosto-Septiembre), y la época de parto del primero, que a pesar de que no se observaron neonatos durante la actividad de campo, puede extenderse hasta el mes de septiembre (Spieler et al., 2013).

Por su parte, del género *Hypanus* se capturaron muy pocos individuos entre los cuales se presentó una mayor proporción de ejemplares juveniles que de adultos. Esta situación puede haber sido un tanto fortuita y estar ligada a las condiciones de muestreo, ya que las especies de este género que habitan a lo largo del mar Caribe y del Océano Atlántico, presentan un asocio mayor hacia los fondos arenosos y pueden habitar hasta profundidades de 70 metros (Freitas et al., 2019; Feitosa et al., 2021), que en el área circundante a Isla Palma se encuentran en posiciones más alejadas del borde insular (consultar mapa de coberturas en Díaz et al., 2000). Debido a lo anterior, la captura de ejemplares de este género presentaba una mayor dificultad operativa durante los muestreos, ya que las faenas se realizaron con redes manuales a buceo libre y no con ayuda de equipo autónomo.

8.2. Descripción de las identidades bacterianas

La composición bacteriana de las tres especies de estudio destacó al estar compuesta mayormente por bacilos Gramnegativos, resultado que coincide con los registros de otros autores donde los Phyla más abundantes fueron Proteobacterias y Bacteroidetes (Gonçalves e Silva et al. 2020) ambos bacilos Gramnegativos.

El agar cromogénico ChormID CPS Elite, a pesar de enfocarse en un número pequeño de especies bacterianas de interés clínico, fue un medio de gran desempeño que, aunque no logro identificar las 43 identidades bacterianas por los motivos previamente mencionados, permitió realizar la clasificación en OTUs y el repique exitoso de las identidades. En este sentido, fue una herramienta importante que permitió diferenciar dos identidades presuntamente iguales, las cuales se observaron en el agar cromogénico de color rojo-marrón y presentaron un perfil metabólico similar, pero por medio de la prueba bioquímica de indol, que es recomendada como complemento del medio, determinó la presencia de *P. mirabilis* a nivel de especie por su resultado negativo (Yarbrough et al., 2016; Faron et al., 2019), así como una identidad denominada Pro. 3 de resultado positivo, la cual tiene una alta probabilidad de formar parte de la misma familia (*Morganellaceae*).

En general, se registró una alta diversidad bacteriana en muestras de agua, sedimento y en los agujones de las tres especies de rayas, lo cual se pensó que podría tener una relación directa con la zona de estudio seleccionada, ya que Isla Palma se encuentra ubicada en un punto intermedio entre las desembocaduras del Canal del Dique y del Río Sinú, que podrían alterar las condiciones ambientales con sus aportes de agua dulce y contaminantes. En este sentido, se ha registrado que la mayor contaminación en el Mar Caribe colombiano se debe a las descargas fluviales, y entre los ríos con mayor incidencia se encuentran el Canal del Dique y el río Sinú, en tercer y cuarto puesto, respectivamente (INVEMAR, 2004; Villota et

al., 2020). No obstante, isla Palma se encuentra aproximadamente a 34 km a la desembocadura de Caño Correa, que comprende el curso de agua más cercano del delta del Canal del Dique, y a 39 km de la desembocadura más cercana del Río Sinú, que comprenden distancias bastante considerables, por lo que en el último reporte del Índice de Calidad de Aguas Marinas y Costeras - ICAM, realizado por el INVEMAR para el período 2012-2, el resultado fue de una calidad de aguas “adecuada” para Isla Palma (Saldarriaga et al., 2022); pero en el mismo documento se registraron variaciones interanuales que demuestran cierta fluctuación, producto del efecto que alcanzan a tener estos dos cursos de agua sobre la zona. En consideración a lo anterior, se discutirán de manera separada las condiciones que pueden estar determinando la composición bacteriana en el medio (agua y sedimentos), así como en las tres especies de raya.

8.2.1. Identidades bacterianas del medio

El número de identidades bacterianas obtenidas a partir de muestras del medio natural fueron mayores en sedimento que en agua, ya que, a pesar de que la salinidad juega un rol importante en la dilución de las concentraciones de algunas especies de bacterias como aquellas de origen fecal, el sedimento, por otro lado, aporta nutrientes, materia orgánica y superficies colonizables, lo que aumenta la supervivencia de grupos como las enterobacterias (Darakas et al., 2009; Acuña et al., 2011), cuya presencia fue altamente significativa en las muestras de sedimento en esta investigación.

Además de esto, se observó la presencia de tres identidades de *Vibrio*, que junto a las especies sin identificar representan los OTUs con mayor registro en las muestras de agua. *Vibrio* es un género de bacterias que está presente constantemente en la columna de agua y su presencia aumenta aún más cuando hay altas temperaturas (Mira-Gutiérrez & García-Martos 2016); aun así, su presencia se puede ver afectada gracias a otras bacterias que compiten en el ambiente y pueden inhibir su crecimiento, efecto antagónico producido incluso por cepas del mismo género presentes en el medio natural (Garza et al., 2021), fenómeno que puede influir en su poca presencia en un medio rico en bacterias como el sedimento, así como en los mismos agujones de las rayas.

8.2.2. Definición del potencial patógeno de las especies de raya

Es interesante notar que no se observó el crecimiento de hongos en ningún medio de cultivo utilizado en el estudio; esto se relaciona con la capacidad del pool bacteriano, en sí, de ser una extensión del sistema inmunológico de la raya, donde

gracias a la presencia de péptidos y proteínas, como la actina, se genera un efecto antibiótico para algunos microorganismos (Coelho et al., 2019); no obstante, estos mismos componentes brindan un medio propicio para el alojamiento o colonización de otros grupos (Sachett et al., 2018), lo cual causa que bacterias que se encuentran en el medio, o especies adheridas al mucus epidermal de la raya, tengan un medio rico para su crecimiento.

El bajo número de identidades bacterianas Grampositivas registradas en el estudio (26 del total) se relaciona con el hecho de que en el medio marino predominan las bacterias Gramnegativas; sin embargo, patógenos humanos Grampositivos, como *Staphylococcus*, *Listeriae*, *Mycobacteria*, entre otros, pueden estar presentes en la columna de agua (Lleò et al., 2005), así como Actinobacterias presentes en los sedimentos, que juegan un rol crucial en los ecosistemas (Gontang et al., 2007). Teniendo en cuenta los registros, es posible que algunas de las identidades bacterianas pertenezcan a estos grupos, lo que es una mera especulación hasta que pruebas posteriores se realicen para identificar las identidades bacterianas sin clasificar.

Por su parte, se ha registrado que la presencia de bacterias puede verse influenciada por descargas de agua dulce o incluso aguas residuales, ya que de estas fuentes provienen un gran número de Proteobacterias que se alojan en el sedimento y pueden sobrevivir largos periodos de tiempo (Pianetti et al., 2004; Luna et al., 2010), esto se puede relacionar directamente con los comportamientos demersales de las rayas y puede ser la causal del registro importante de *E.coli* y otras Proteobacterias en las muestras de aguijón.

Sin embargo, la posible ausencia de indicadores de contaminación entrantes por descargas de agua dulce, la cual era la hipótesis inicial sobre el porqué se observaba una mayor presencia de Proteobacterias presente en el aguijón de *U. jamaicensis*, genera una nueva incógnita acerca de las variaciones en la composición bacteriana.

Se ha visto como algunos autores señalan la influencia del número de glándulas secretoras de proteínas, mencionada en algunos otros casos como veneno (Barbaro et al., 2007; Bauman et al., 2014), tienden a influenciar el potencial toxico del aguijón de ciertas especies. Esto se observa en el caso de las rayas marinas, donde se registra poco número de glándulas secretoras en el aguijón, ya que solo se observan en los bordes aserrados en una baja cantidad, mientras que en las especies de río, principalmente en la familia Potamotrygonidae, hay un mayor número de glándulas pero ubicadas a lo largo de todo el aguijón (Pedroso et al., 2007).

Así mismo, se han registrado diferencias en la composición tóxica incluso entre especies de la misma familia (Silva et al., 2018); sin embargo, se cree que una implicación taxonómica puede influir esta condición. La familia Urotrygonidae, de la

cual hace parte *U. jamaicensis*, es la más cercana a nivel filogenético a las especies del género *Potamotrygon* (Last et al., 2016), por lo que posee un número mayor de glándulas, lo cual significaría una mayor capacidad de adquirir y retener bacterias del medio como mecanismo extendido de defensa, lo que aumentaría la diversidad de especies bacterianas en el aguijón, representando en este estudio, un mayor número de Proteobacterias en comparación a *H. americanus* e *H. guttatus*. En síntesis, al tener este elevado número de Proteobacterias, se considera a *U. jamaicensis* como una especie de raya con gran potencial para causar afectaciones de sepsis y gangrena, que han sido reportadas por algunos autores en las rayas de agua dulce (Junior et al., 2013; Sachett et al., 2018; Cevik et al., 2022).

Existen muy pocos estudios que relacionen la variación en la composición bacteriana de los organismos con las etapas de madurez, pero los resultados de este estudio sugieren que los individuos más grandes poseen una mayor diversidad bacteriana, lo que se relaciona con estudios anteriores donde los ejemplares más jóvenes, incluso neonatos, a pesar de que pueden representar una toxicidad mayor, poseen un menor número de bacterias en comparación con los adultos de gran tamaño (Kirchhoff et al., 2014; Gonçalves e Silva et al. 2020).

Esto se puede observar como un mecanismo de supervivencia de estos peces cartilaginosos, donde el aguijón es quizá su única defensa contra depredadores, por lo que en estas especies se ha desarrollado para ser altamente patógeno en edades tempranas, a fin de que optimizar los mecanismos de defensa de los neonatos, y a medida de que la raya crece, esta composición se va modificando al cruzarse con otros grupos de bacterias presentes en el medio. Sin embargo, es una hipótesis que requiere mayor profundización en investigaciones posteriores, y que se podría complementar con las posibles variaciones en la composición bacteriana en aguijones recién mudados.

Por otra parte, la presencia de *Vibrio* en los aguijones de raya del género *Hypanus* puede representar un riesgo para la salud humana; esto debido a su potencial de transmitir enfermedades anexas como el ya mencionado cólera (Maheshwari et al., 2011), y como se pudo apreciar con el ejemplar más grande del estudio, perteneciente a la especie *H. guttatus*, entre más grande sea el individuo, es más alta la probabilidad que tenga una mayor riqueza y concentración de bacterias, por lo que es probable que los accidentes con rayas sea un mecanismo de transmisión de enfermedades como esta.

En síntesis, estos resultados ubican a las rayas del género *Hypanus* como un potencial portador de enfermedades externas presentes en el medio marino, algunas de las cuales son causados por bacterias del género *Vibrio* (Baker-Austin et al., 2018), por lo que, a pesar de que los dos géneros de rayas estudiados tengan el potencial de causar gran dolor con sus picaduras y ser altamente infecciosas, ésta podría ser la principal diferencia de *Hypanus* con *U. jamaicensis*.

Finalmente, se desconoce la concentración de cada una de las especies de bacterias registradas en este estudio, y en el escenario de los accidentes, la evolución de los síntomas y gravedad de las afectaciones estará ligada a la respuesta inmune de cada persona. Aun así, es importante mencionar que la severidad de una picadura de raya dependerá en gran medida de la zona donde se produzca la picadura, por lo que una afectación directa al tórax, abdomen o cuello requiere atención médica inmediata (Rodríguez et al., 2022), ya que las heridas en estas áreas del cuerpo son asociadas con la eventual muerte del paciente si no se le da un tratamiento rápido.

8.3. Modelo de ELM y su aporte a la investigación

Una de las metas de este estudio fue, a grandes rasgos, comprender las variables que influyen en la composición bacteriana en los agujijones de rayas, esto se logró gracias al modelo conocido como Extreme Learning Machine o ELM, donde los resultados demostraron que las variables más influyentes en la composición del agujijón fueron las variables “Machos”, las “longitudes”, es decir el tamaño, y “la especie *U. jamaicensis*”, las cuales se discutirán de manera separada.

Desde un punto de vista etológico, los machos pueden llegar a ser más activos en las noches en búsqueda de alimento, o durante las épocas reproductivas cuando recorren largas distancias en busca de hembras para copular (Nordell 1994; Corcoran et al., 2013), donde el sedimento, al variar su composición microbiológica espacialmente bajo la influencia de diferentes fenómenos antrópicos y ambientales (Perkins et al., 2014), puede ser el medio que dentro de su heterogeneidad a nivel microbiológico brinde un conjunto nuevo de especies bacterianas al agujijón; lo anterior coincide con los resultados obtenidos por Dos santos et al., (2019), donde a pesar de que el enfoque de ellos fue en la composición venenosa del agujijón, registraron, igualmente, que los machos poseen un mayor potencial tóxico.

En el caso de las longitudes, al relacionar las tres medidas se encontró que mantenían un comportamiento lineal, por lo que no varía mucho si se toma una u otra. Aun así, fue necesario emplear una conversión de la longitud LA/LT para evitar un posible sesgo de los resultados debido a la notoria diferencia de tamaños entre los individuos del género *Hypanus* con *U. jamaicensis*, donde obviando el macho de gran talla, incluso las hembras en estadios juveniles de *Hypanus* eran más grandes que los individuos de *U. jamaicensis*. No obstante, en todas las especies se evidenció una mayor diversidad bacteriana en ejemplares de mayor tamaño, aún en machos y hembras por separado, lo cual, como se mencionó con anterioridad, se podría relacionar con los cambios producidos en pool bacteriano a medida de que la raya crece y se van adhiriendo especies bacterianas del medio.

Finalmente, a pesar de que el valor de *H. guttaus* fue el más alto en el compilado de los modelos, no fue tenido en cuenta de esta manera por el bajo número de

muestras de la especie y la muestra atípica (H.g 1 que comprendió un macho de un tamaño muy grande en comparación con los demás ejemplares rayas). Así mismo, se omitieron 9 identidades bacterianas de registro único en agua y sedimento (PRO.9, SID.22, SID.23, SID.24, SID.25, *V. alginolyticus*, VIB.3, VIB.4 y VIB.5) para darle énfasis a las identidades del pool bacteriano del aguijón, aun así, la relación de las identidades bacterianas de las especies de raya con el medio se tuvo en cuenta en el modelo, pero no arrojó un impacto estadísticamente significativo en el global del análisis.

En consecuencia, se registró que *Urobatis jamaicensis* es la especie más relevante en esta investigación, desde el punto de vista estadístico por el modelo, y desde el punto de vista microbiológico, al lograrse aislar el mayor número de identidades bacterianas y poseer los dos ejemplares con mayor número de identidades (12 y 10); esta especie es de fácil captura y de incidencia en las actividades turísticas, por lo que la raya “siwi”, como es conocida entre la comunidad local, arrojó interesantes resultados en el estudio y seguramente será tenida en cuenta en futuras etapas de esta investigación.

9. CONCLUSIONES

- Las Proteobacterias son el Phylum más abundante en el pool bacteriano de las tres especies de raya incluidas en el estudio, pero mantiene una mayor representatividad en la especie *U. jamaicensis* que en los representantes del género *Hypanus*.
- La identificación de *Proteus mirabilis* a nivel de especie, representa el primer registro en la literatura de esta Proteobacteria en el pool bacteriano del aguijón de una especie de raya.
- *Urobatis jamaicensis*, a pesar de ser una especie de raya bastante dócil, en un escenario de picadura es la especie que puede representar mayor riesgo para la salud.
- Los aguijones de rayas tienen la capacidad de obtener y retener bacterias del medio gracias a la composición proteica del mucus que los rodea, por lo que estos peces pueden actuar como vectores para la transmisión de enfermedades humanas causadas por diversas bacterias presentes en el mar.
- Los aguijones de raya poseen una composición bacteriana más diversa que el sedimento y el agua circundante, lo cual se relaciona con la presencia de un mucus altamente proteico en los aguijones que actúa como medio para el crecimiento bacteriano.
- Los hábitos demersales de las especies de raya incluidas en el estudio, hacen que el sedimento sea un medio cuya composición bacteriana se relacione en gran medida con el pool bacteriano del aguijón.
- El tamaño de una raya es un factor importante para determinar su potencial patógeno, ya que incrementa la probabilidad de que el individuo posea una mayor diversidad bacteriana.
- Los machos tienen una mayor diversidad bacteriana que las hembras en las especies de raya estudiadas, ya que presentan una mayor probabilidad de obtención y retención de bacterias al desplazarse más en búsqueda de hembras para su reproducción o alimento.

10. RECOMENDACIONES

El desarrollo con éxito de estas investigaciones está estrechamente relacionada con la planeación y el desarrollo de una metodología precisa, donde se analice paso a paso todas las etapas del proyecto y se reúnan todos los materiales necesarios para su ejecución, desde la fase de campo hasta el último día de laboratorio. Es importante además ser lo más prolijo posible y trabajar con los más altos estándares de bioseguridad y no descuidar ningún detalle; el orden y la persistencia marca la diferencia en cualquier estudio, pero sobre todo en uno de carácter microbiológico o biotecnológico.

Respecto a las rayas y sus agujones, es importante prestar mucha atención en campo al estado del agujón, no es recomendable tomar la muestra de un ejemplar donde se evidencien posibles señales de muda previa o incluso si ha sido fragmentado por causas externas; Además, en caso de encontrar un ejemplar con más de un agujón siempre tomar el superior, el cual será el que posea mayor composición bacteriana.

Se debe contar con herramientas que aseguren la refrigeración de los agujones en caso de encontrarse a una distancia considerable del laboratorio, la no correcta refrigeración del agujón puede causar que se desprenda el tegumento del agujón, lo que modificara notoriamente su composición bacteriana además del riesgo del ingreso de microorganismos externos, o en otras palabras, la contaminación de la muestra.

A futuro, para proyectos que se centren en estudios relacionados al microbioma ya sea de rayas o cualquier otro organismo de agua salobre es muy importante contar con un medio selectivo exclusivo para bacterias de origen marino, sean estos medios que contengan sal o en su posibilidad, trabajar con Agar Marino, esto permitirá realizar un análisis más detallado de la composición bacteriana, facilitar la identificación de algunos microorganismos y además del aislamiento de algunas bacterias que posiblemente no crezcan en los medios tradicionales.

Finalmente, es importante contar con el apoyo de técnicas moleculares que respalden las pruebas microbiológicas ya que puede existir un componente importante de bacterias no cultivables presentes en la muestra que queden excluidos de la investigación.

11. BIBLIOGRAFIA

- Acuña, A. J., Torres, C. F., Pucci, G. N., & Pucci, O. H. (2011). Evaluación del tiempo de vida de bacterias potencialmente patógenas en sedimentos marinos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(2), 124-129.
- Amesbury, E., & Snelson, F. F. (1997). Spine replacement in a freshwater population of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Copeia*, 1997(1), 220-223.
- Aquino, G. N. D., Souza, C. C., Haddad Junior, V., & Sabino, J. (2016). Injuries caused by the venomous catfish pintado and cachara (*Pseudoplatystoma* genus) in fishermen of the Pantanal region in Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88, 1531-1537.
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-19.
- Barbaro, C., Lira, M., Malta, M., Soares, S., Neto, D., Cardoso, J., Santoro, M. & Haddad, V. (2007). Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. *Toxicon* 50: 676–687.
- Bornatowski, H., Navia, A.F., Rennó, R., Albijoa, V. & Maia, F.M. (2014). Ecological importance of sharks and rays in a structural foodweb analysis in southern Brazil. *ICES Journal of Marine Science*; doi:10.1093/icesjms/fsu025.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), 601-608.
- Caballero, S., Galeano, A. M., Lozano, J. D., & Vives, M. (2020). Description of the microbiota in epidermal mucus and skin of sharks (*Ginglymostoma cirratum* and *Negaprion brevirostris*) and one stingray (*Hypanus americanus*). *PeerJ*, 8, e10240.
- Carranza León, V. M. (2016). Analisis microbiologico de coliformes totales y fecales en muestras de agua de mar extraidas de los balnearios de Salaverry-Huanchaco en los meses noviembre-diciembre 2015.
- Carrillo-Briceño, J.D., Carrillo, J.D. Aguilera, O.A. & Sánchez-Villagra, M.R. (2018). Shark and ray diversity in the Tropical America (Neotropics)—an examination of environmental and historical factors affecting diversity. *PeerJ* 6:e5313; DOI 10.7717/peerj.5313.
- Cervignon, F., Cipriani, R., Fischer, W., Garibaldi, L., Hendrickx, M., Lemus, A.J., Marquez, R., Poutiers, J.M., Robaina, G. & Rodriguez, B. (1992). Especies

comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de sur américa. FAO.

Cevik, J., Hunter-Smith, D. J., & Rozen, W. M. (2022). Infections following stingray attacks: A case series and literature review of antimicrobial resistance and treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 102312.

CHROMID® CPS® Elite and other Chromid® Media for Urinary Tract infections. bioMérieux Clinical Diagnostics. (2021, October 6). Retrieved November 23, 2022, from <https://www.biomerieux-diagnostics.com/chromidr-cpsr-elite-and-other-chromidr-media-urinary-tract-infections>.

Coelho, G. R., Neto, P. P., Barbosa, F. C., Dos Santos, R. S., Brigatte, P., Spencer, P. J., ... & Sciani, J. M. (2019). Biochemical and biological characterization of the *Hypanus americanus* mucus: A perspective on stingray immunity and toxins. *Fish & Shellfish Immunology*, 93, 832-840.

Corcoran, M.J., Wetherbee, B.M., Shivji, M.S., Potenski, M.D., Chapman, D.D., et al. (2013) Supplemental Feeding for Ecotourism Reverses Diel Activity and Alters Movement Patterns and Spatial Distribution of the Southern Stingray, *Dasyatis americana*. *PLoS ONE* 8(3): e59235. doi:10.1371/journal.pone.0059235.

Darakas, E., Koumoulidou, T., & Lazaridou, D. (2009). Fecal indicator bacteria declines via a dilution of wastewater in seawater. *Desalination*, 248(1-3), 1008-1015.

Díaz, J.M., Barrios, L.M, Cendales, M.H, Garzón-Ferreira, J., Geister, J., López-Victoria, M., Ospina, G.H., Parra-Velandia, F., Pinzón, J., Vargas-Angel, B., Zapata, F.A. y Zea, s. (2000). Áreas coralinas de Colombia. INVEMAR, Serie Publicaciones Especiales No. 5. Santa Marta, Colombia. 176 p.

Doane, M. P., Morris, M. M., Papudeshi, B., Allen, L., Pande, D., Haggerty, J. M., ... & Dinsdale, E. A. (2020). The skin microbiome of elasmobranchs follows phylosymbiosis, but in teleost fishes, the microbiomes converge. *Microbiome*, 8(1), 1-15.

Dos Santos, J. M., Dos Santos, J. C., Marques, E. E., de Araújo, G. C., Seibert, C. S., Lopes-Ferreira, M., & Lima, C. (2019). Stingray (*Potamotrygon rex*) maturity is associated with inflammatory capacity of the venom. *Toxicon*, 163, 74-83.

Drzewiecka, D. (2016). Significance and roles of *Proteus spp.* bacteria in natural environments. *Microbial ecology*, 72, 741-758.

Feitosa, L. M., Queiroz, A. P. N., Labonne, M., Dressler, V. L., & Lessa, R. P. (2021). Habitat use and nursery evaluation for the longnose stingray *Hypanus guttatus* (Bloch & Schneider, 1801) using vertebral microchemistry. *Journal of Fish Biology*. doi:10.1111/jfb.14858

- Fernández-Delgado, M., Contreras, M., García-Amado, M. A., Gueneau, P., & Suárez, P. (2007). Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of Venezuelan oysters. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 49, 355-359.
- Fleming, L. E., Broad, K., Clement, A., Dewailly, E., Elmir, S., Knap, A., ... & Walsh, P. (2006). Oceans and human health: emerging public health risks in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 53(10-12), 545-560.
- Freitas, R. H., Aguiar, A. A., Freitas, A. K. C., Lima, S. M., & Valentin, J. L. (2019). Unravelling the foraging behavior of the southern stingray, *Hypanus americanus* (Myliobatiformes: Dasyatidae) in a Southwestern Atlantic MPA. *Neotropical Ichthyology*, 17.
- Garza, Z. J. M., Jaramillo, G. E. C., Gámez, J. C. I., & Galavíz-Silva, L. (2021). Actividad antagónica de bacterias aisladas de ecosistemas marinos frente a vibrio parahaemolyticus AHPND como patógeno de camarón en cultivos. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura*, 3(2), 78-90.
- Gómez-López, D.I. (2011). Capítulo X. Praderas de pastos marinos. pp 124-135. En: Zarza-González, E. (Ed.). El entorno ambiental del Parque Nacional Natural Corales del Rosario y de San Bernardo. Parques Nacionales Naturales de Colombia – Banco Mundial – Global Environment Facility (GEF) - Patrimonio Natural. Cartagena de Indias, Colombia. 416 p.
- Gonçalves e Silva, F., Santos, H.F., Assis Leite, D.C., Lutfi, D.S., Vianna, M. & Rosado, A.S. (2020) Skin and stinger bacterial communities in two critically endangered rays from the South Atlantic in natural and aquarium settings. *MicrobiologyOpen*. 2020;00:e1141. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1141>.
- Gontang, E. A., Fenical, W., & Jensen, P. R. (2007). Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and environmental microbiology*, 73(10), 3272-3282.
- Goz, E., Yuceer, M., & Karadurmus, E. (2019). Total organic carbon prediction with artificial intelligence techniques. In *Computer aided chemical engineering* (Vol. 46, pp. 889-894). Elsevier.
- Gross, S., Müller, A., Seinige, D., Wohlsein, P., Oliveira, M., Steinhagen, D., ... & Siebert, U. (2022). Occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in marine mammals of the north and baltic seas: Sentinels for human health. *Antibiotics*, 11(9), 1248.
- Håkonsholm, F., Lunestad, B. T., Aguirre Sánchez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Marathe, N. P., & Svanevik, C. S. (2020). Vibrios from the Norwegian marine environment: Characterization of associated antibiotic resistance and virulence genes. *Microbiologyopen*, 9(9), e1093.

- Heberle, H., Meirelles, G. V., Da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, 16, 169.
- Hosseini Nejad Takhti, A., Saffari, A., Martín, D., Khishe, M., & Mohammadi, M. (2022). Classification of marine mammals using the trained multilayer perceptron neural network with the whale algorithm developed with the fuzzy system. *Computational Intelligence and Neuroscience*, 2022.
- Hughes, R., Pedersen, K., & Huskey, S. (2018). The kinematics of envenomation by the yellow stingray, *Urobatis jamaicensis*. *Zoomorphology*, 137, 409-418.
- Johansson, P. K., Douglass, T. G., & Christopher, G. L. (2004). Caudal spine replacement and histogenesis in the round stingray, *Urobatis halleri*. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*, 103(3), 115-125.
- Junior, V. H., Cardoso, J. L. C., & Neto, D. G. (2013). Injuries by marine and freshwater stingrays: history, clinical aspects of the envenomations and current status of a neglected problem in Brazil. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 19(1), 1-11.
- Kelly, C., & Salinas, I. (2017). Under pressure: interactions between commensal microbiota and the teleost immune system. *Frontiers in immunology*, 8, 559.
- Kerfahi, D., Hall-Spencer, J. M., Tripathi, B. M., Milazzo, M., Lee, J., & Adams, J. M. (2014). Shallow water marine sediment bacterial community shifts along a natural CO₂ gradient in the Mediterranean Sea off Vulcano, Italy. *Microbial ecology*, 67, 819-828.
- Kirchhoff, K. N., Billion, A., Voolstra, C. R., Kremb, S., Wilke, T., & Vilcinskas, A. (2022). Stingray venom proteins: Mechanisms of action revealed using a novel network pharmacology approach. *Marine Drugs*, 20(1), 27.
- Kirchhoff, K. N., Klingelhöfer, I., Dahse, H. M., Morlock, G., & Wilke, T. (2014). Maturity-related changes in venom toxicity of the freshwater stingray *Potamotrygon leopoldi*. *Toxicon*, 92, 97-101.
- Larsen, A., Tao, Z., Bullard, S.A. & Arias, C.R. (2013). Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. *FEMS Microbiol.Ecol.* 85, 483–494.doi:10.1111/1574-6941.12136
- Last, P., Naylor, G., Séret, B., White, W., de Carvalho, M., & Stehmann, M. (Eds.). (2016). *Rays of the World*. CSIRO publishing.
- Legrand, T. P., Catalano, S. R., Wos-Oxley, M. L., Stephens, F., Landos, M., Bansemer, M. S., ... & Oxley, A. P. (2018). The inner workings of the outer surface: skin and gill microbiota as indicators of changing gut health in yellowtail kingfish. *Frontiers in microbiology*, 8, 2664.

- Legrand, T. P., Wynne, J. W., Weyrich, L. S., & Oxley, A. P. (2020). A microbial sea of possibilities: current knowledge and prospects for an improved understanding of the fish microbiome. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 1101-1134.
- Lleò, M. D. M., Signoretto, C., & Canepari, P. (2005). Gram-positive bacteria in the marine environment. *Oceans and health: pathogens in the marine environment*, 307-330.
- López-Hontangas, J. L., Castillo, F. J., & Salavert, M. (2006). Técnicas de identificación. *Microbiología aplicada al paciente crítico*. Bogotá: Distribuna, 27-41.
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18.
- Lowe, C. G., Moss, G. J., Hoisington IV, G., Vaudo, J. J., Cartamil, D. P., Marcotte, M. M., & Papastamatiou, Y. P. (2007). Caudal spine shedding periodicity and site fidelity of round stingrays, *Urobatis halleri* (Cooper), at Seal Beach, California: implications for stingray-related injury management. *Bulletin, Southern California Academy of Sciences*, 106(1), 16-26.
- Luna, G. M., Vignaroli, C., Rinaldi, C., Pusceddu, A., Nicoletti, L., Gabellini, M., ... & Biavasco, F. (2010). Extraintestinal *Escherichia coli* carrying virulence genes in coastal marine sediments. *Applied and environmental microbiology*, 76(17), 5659-5668.
- Magalhaes, M. R. (2001). Estudos bioquímicos do veneno de raias *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Dasyatidae, Potamotrygoninae) —Purificação e caracterização de uma hialuronidase (Doctoral dissertation, Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás: Goiânia, Goiás, Brasil). McEachran, J.D. & Carvalho, M.R. (s.f) BATOID FISHES. , American Museum of Natural History, New York, USA. 508-530.
- Maheshwari, M., Nelapati, K., & Kiranmayi, B. (2011). *Vibrio cholerae*-A Review. *Veterinary world*, 4(9).
- Manos, J., & Belas, R. (2006). The genera proteus, providencia, and morganella. *Prokaryotes*, 6, 245-269.
- Marmi, J., Vila, B., Oms, O., Galobart, À., & Cappetta, H. (2010). Oldest records of stingray spines (Chondrichthyes, Myliobatiformes). *Journal of Vertebrate Paleontology*, 30(3), 970-974.
- Mejía-Falla, P., Navia, A., Mejía-Ladino, L., Acero, A y Rubio, E. (2007). TIBURONES Y RAYAS DE COLOMBIA (PISCES: ELASMOBRANCHII): LISTA ACTUALIZADA, REVISADA Y COMENTADA. Boletín Invemar.

- Mendoza-Carranza, M., Santiago-Alarcón, D., Pérez-Jiménez, J & Hernández-Lazo, C. (2016). Eyeless morphotype in the southern stingray (*Dasyatis americana*): a non-lethal and frequent abnormality from the southern Gulf of Mexico. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 44(3): 460-469.
- Mira-Gutiérrez, J., & García-Martos, P. (2016). Vibrios de origen marino en patología humana. *Revista AquaTIC*, (2).
- Moreno, C. E. (2000). Métodos para medir la biodiversidad. Volumen 1. Manuales y tesis SEA.
- Navia, A. F. & Mejía-Falla, P.A. (2011). Guía para la identificación de especies de tiburones y rayas comercializadas en el Pacífico colombiano. Fundación SQUALUS, Conservación Internacional. 36 p.
- Namkung, J. (2020). Machine learning methods for microbiome studies. *Journal of Microbiology*, 58, 206-216.
- Ning, H., Li, R., & Zhou, T. (2022). Machine learning for microalgae detection and utilization. *Frontiers in Marine Science*, 9, 947394.
- Pedroso, C. M., Jared, C., Charvet-Almeida, P., Almeida, M. P., Neto, D. G., Lira, M. S., ... & Antoniazzi, M. M. (2007). Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. *Toxicon*, 50(5), 688-697.
- Peláez, I. M. (2016). Modelos de regresión: lineal simple y regresión logística. *Revista Seden*, 14, 195-214.
- Peña, E. A., & Slate, E. H. (2006). Global validation of linear model assumptions. *Journal of the American Statistical Association*, 101(473), 341-354.
- Perkins, T. L., Clements, K., Baas, J. H., Jago, C. F., Jones, D. L., Malham, S. K., & McDonald, J. E. (2014). Sediment composition influences spatial variation in the abundance of human pathogen indicator bacteria within an estuarine environment. *PloS one*, 9(11), e112951.
- Perry, C. T., Pratte, Z. A., Clavere-Graciette, A., Ritchie, K. B., Hueter, R. E., Newton, A. L., ... & Stewart, F. J. (2021). Elasmobranch microbiomes: emerging patterns and implications for host health and ecology. *Animal Microbiome*, 3, 1-15.
- Pianetti, A., Bruscolini, F., Sabatini, L., & Colantoni, P. (2004). Microbial characteristics of marine sediments in bathing area along Pesaro-Gabicce coast (Italy): a preliminary study. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), 682-689.
- Reynolds, J. (2005). Serial dilution protocols. *American society for microbiology*.

- Ritchie, K. B., Schwarz, M., Mueller, J., Lapacek, V. A., Merselis, D., Walsh, C. J. & Luer, C. A. (2017). Survey of antibiotic-producing bacteria associated with the epidermal mucus layers of rays and skates. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1050. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01050>
- Rodríguez, H. G. R., Sánchez, E. C., & Méndez, J. D. (2022). Stingray Poisoning, an Aspect with Medical Relevance. *Current Practice in Medical Science* Vol. 5, 121-137.
- Ross-Salazar, E. (2014). Artes, métodos e implementos de pesca. Fundación MarViva. San José, Costa Rica. 86p.
- Rozen, Y., & Belkin, S. (2001). Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS microbiology reviews*, 25(5), 513-529.
- Sachett, J. D. A. G., Sampaio, V. S., Silva, I. M., Shibuya, A., Vale, F. F., Costa, F. P., ... & Monteiro, W. M. (2018). Delayed healthcare and secondary infections following freshwater stingray injuries: risk factors for a poorly understood health issue in the Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51, 651-659.
- Saldarriaga, J.F., Obando, P.S., Espinosa, L.F. (2022). Departamento de Sucre. pp 86-97. En: INVEMAR. 2022. Análisis histórico 2001-2021 de la calidad de las aguas marinas y costeras en el Caribe y Pacífico colombianos. Paola Obando y Luisa Espinosa (Eds). Red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de Colombia – REDCAM: INVEMAR, MinAmbiente, CORALINA, CORPOGUAJIRA, CORPAMAG, CRA, CARDIQUE, CARSUCRE, CVS, CORPOURABÁ, CODECHOCÓ, CVC, CRC y CORPONARIÑO. Informe técnico 2021. Serie de Publicaciones Periódicas No. 4 del INVEMAR, Santa Marta. 208 p.
- Schieber, J. (2021). The Age and growth of the Yellow Stingray (*Urobatis jamaicensis*) in Southeast Florida. Master's thesis. Nova Southeastern University. Retrieved from NSUWorks, . (52)
- Schmidt, B., Amorin, A & Hilsdorf, A. (2015). PCR–RFLP analysis to identify four ray species of the genus *Dasyatis* (Elasmobranchii, Dasyatidae) fished along the southeastern and southern coast of Brazil. *Fisheries Research* 167: 71–74.
- Sganga, G., Cozza, V., Spanu, T., Spada, P. L., & Fadda, G. (2009). Global climate change and wound care: case study of an off-season *Vibrio alginolyticus* infection in a healthy man. *Ostomy/wound management*, 55(4), 60-62.
- Silva, F., Huang, Y., Yang, V., Mu, X., Shi, Q., & Antunes, A. (2018). Transcriptomic characterization of the South American freshwater stingray *Potamotrygon motoro* venom apparatus. *Toxins*, 10(12), 544.

- Spieler, R. E., Fahy, D. P., Sherman, R. L., Sulikowski, J. A. & Quinn, T. P. (2013). The Yellow Stingray, *Urobatis jamaicensis* (Chondrichthyes: Urotrygonidae): a synoptic review. *Caribbean Journal of Science*, 47(1), 67–97
- Suárez, K. L. (2015). Validación del método filtración por membrana para análisis microbiológico de Coliformes Totales y *Escherichia coli* en aguas marinas. *Boletín Científico CIOH*, 33, 215-220.
- Tagliafico, A., Rago, N. & Rangel, M. (2013). Aspectos biológicos de las rayas *Dasyatis guttata* y *Dasyatis americana* (Myliobatiformes: Dasyatidae) capturadas por la pesquería artesanal de la Isla de Margarita, Venezuela. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* Vol. 48, Nº2: 365-373.
- Takahashi, A., Davis, P., Reinick, C., Mizusawa, K. & Sakamoto K. (2016). Characterization of melanocortin receptors from stingray *Dasyatis akajei*, a cartilaginous fish. *General and Comparative Endocrinology* 232: 115–124.
- Talwar, C., Nagar, S., Lal, R., & Negi, R. K. (2018). Fish gut microbiome: current approaches and future perspectives. *Indian journal of microbiology*, 58, 397-414.
- Ulloa, J. G. (2021). *Applied biomedical engineering using artificial intelligence and cognitive models*. Elsevier.
- Urotrygonidae): a synoptic review. *Caribbean Journal of Science*, Vol. 47, No. 1, 67-97.
- Van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., & Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal*, 5(2), 173-183.
- Villota, C.R., Correa, M., Murcia, M., Ordóñez, A., Bastida, ... Ramírez, A. (2020). Estado del ambiente y los ecosistemas marinos y costeros: Indicadores de estado. pp 29-92. En: INVEMAR. Informe del estado de los ambientes y recursos marinos y costeros en Colombia, 2019. Serie de Publicaciones Periódicas No. 3. Santa Marta. 183 p.
- Wilkins, L. G., Leray, M., O’Dea, A., Yuen, B., Peixoto, R. S., Pereira, T. J., ... & Eisen, J. A. (2019). Host-associated microbiomes drive structure and function of marine ecosystems. *PLoS biology*, 17(11), e3000533.
- Yarbrough, M. L., Wallace, M. A., Marshall, C., Mathias, E., & Burnham, C. A. D. (2016). Culture of urine specimens by use of chromID CPS Elite medium can expedite *Escherichia coli* identification and reduce hands-on time in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 54(11), 2767-2773.
- Zarza-González, E. (Ed.). (2011). El entorno ambiental del Parque Nacional Natural Corales del Rosario y de San Bernardo. Parques Nacionales Naturales

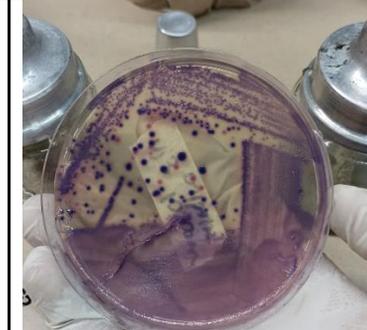
de Colombia – Banco Mundial – Global Environment Facility (GEF) - Patrimonio Natural. Cartagena de Indias, Colombia. 416 p.

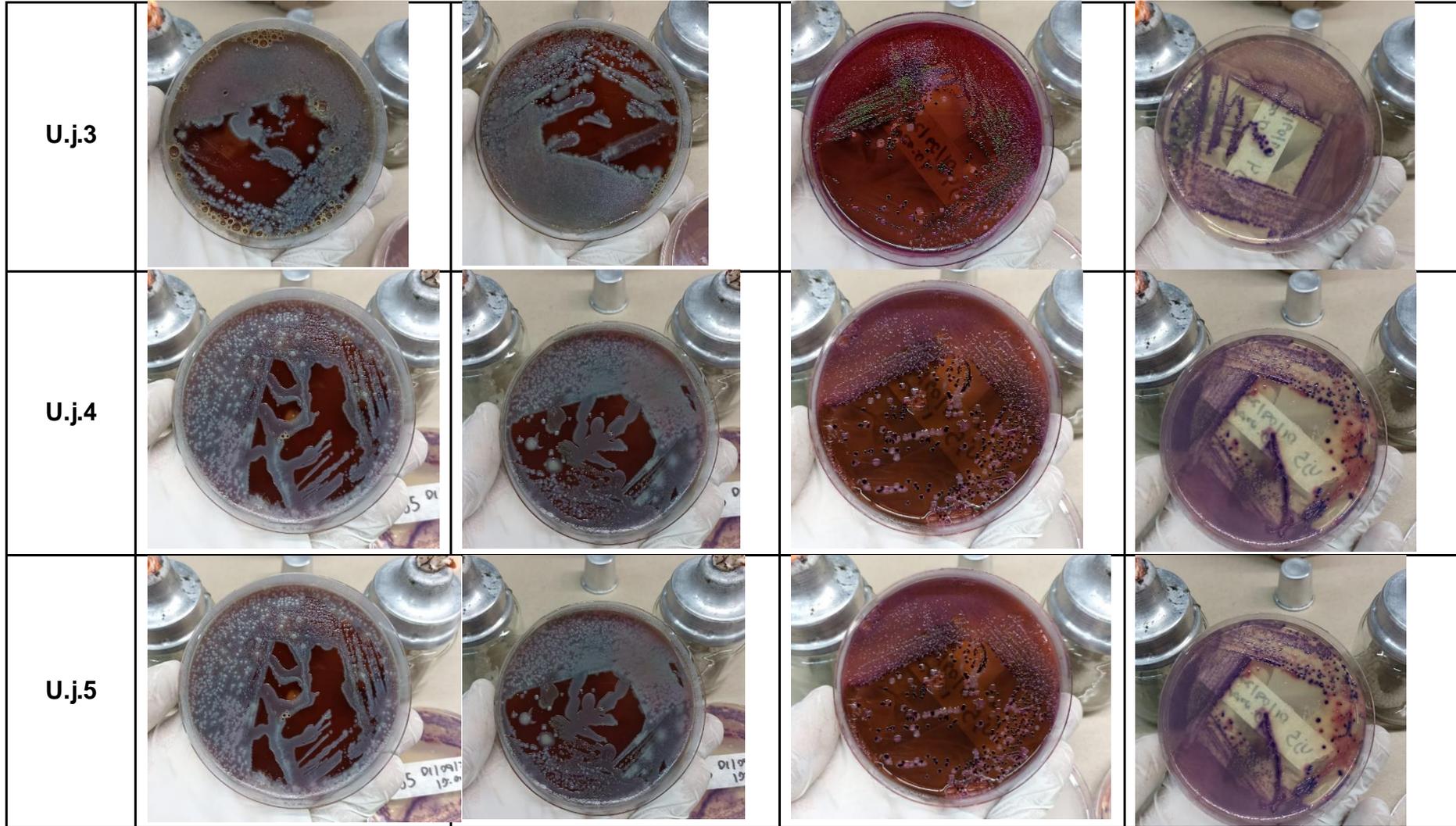
Zhai, W., Wang, Q., Zhu, X., Jia, X., & Chen, L. (2023). Pathogenic infection and microbial composition of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) challenged by *Aeromonas veronii* and *Proteus mirabilis*. *Aquaculture and Fisheries*, 8(2), 166-173.

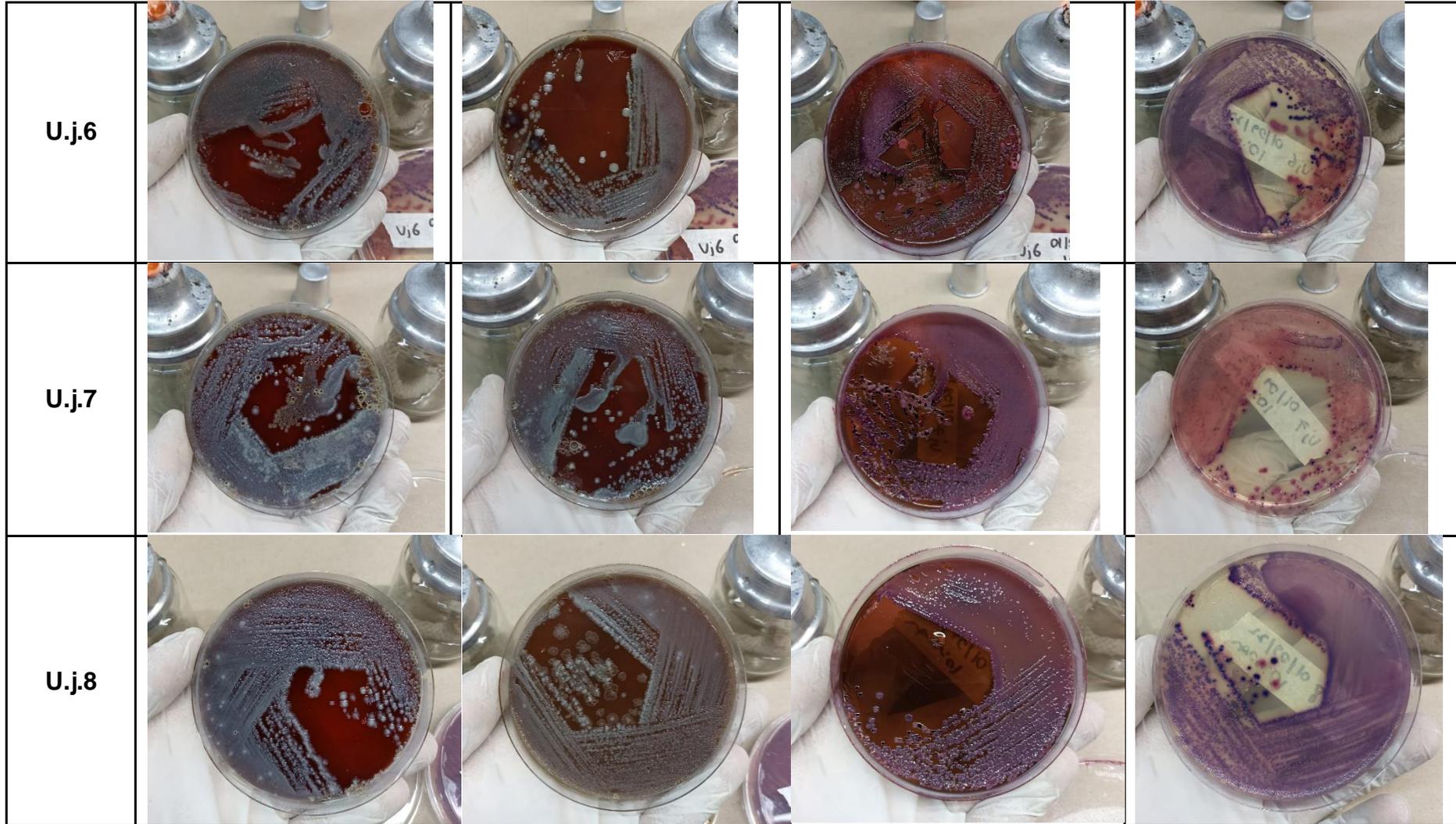
Zorrilla, I., Moriñigo, M. A., Castro, D., Balebona, M. C., & Borrego, J. J. (2003). Intraspecific characterization of *Vibrio alginolyticus* isolates recovered from cultured fish in Spain. *Journal of applied microbiology*, 95(5), 1106-1116.

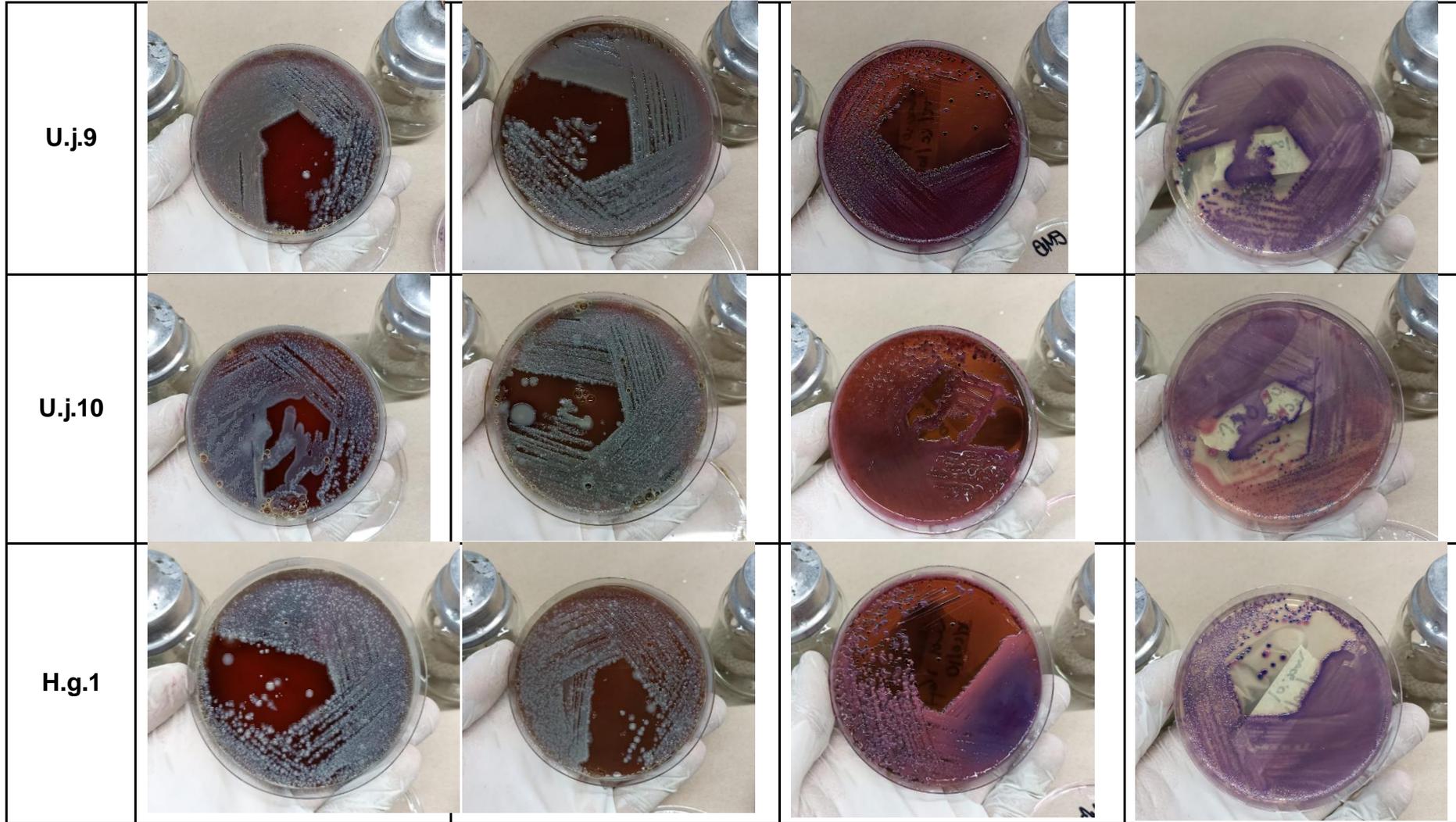
12. ANEXOS

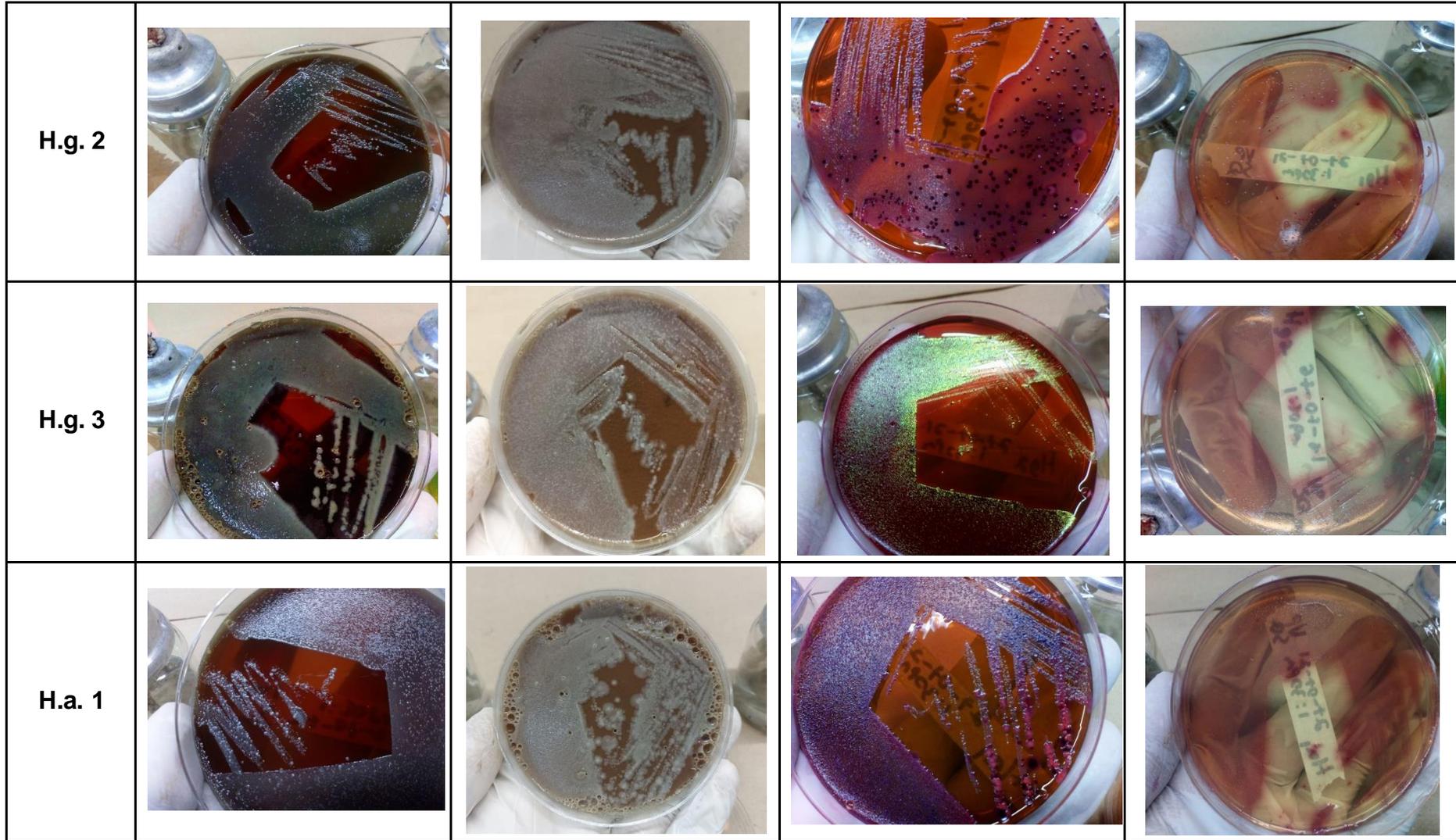
Anexo 1: Cultivos iniciales.

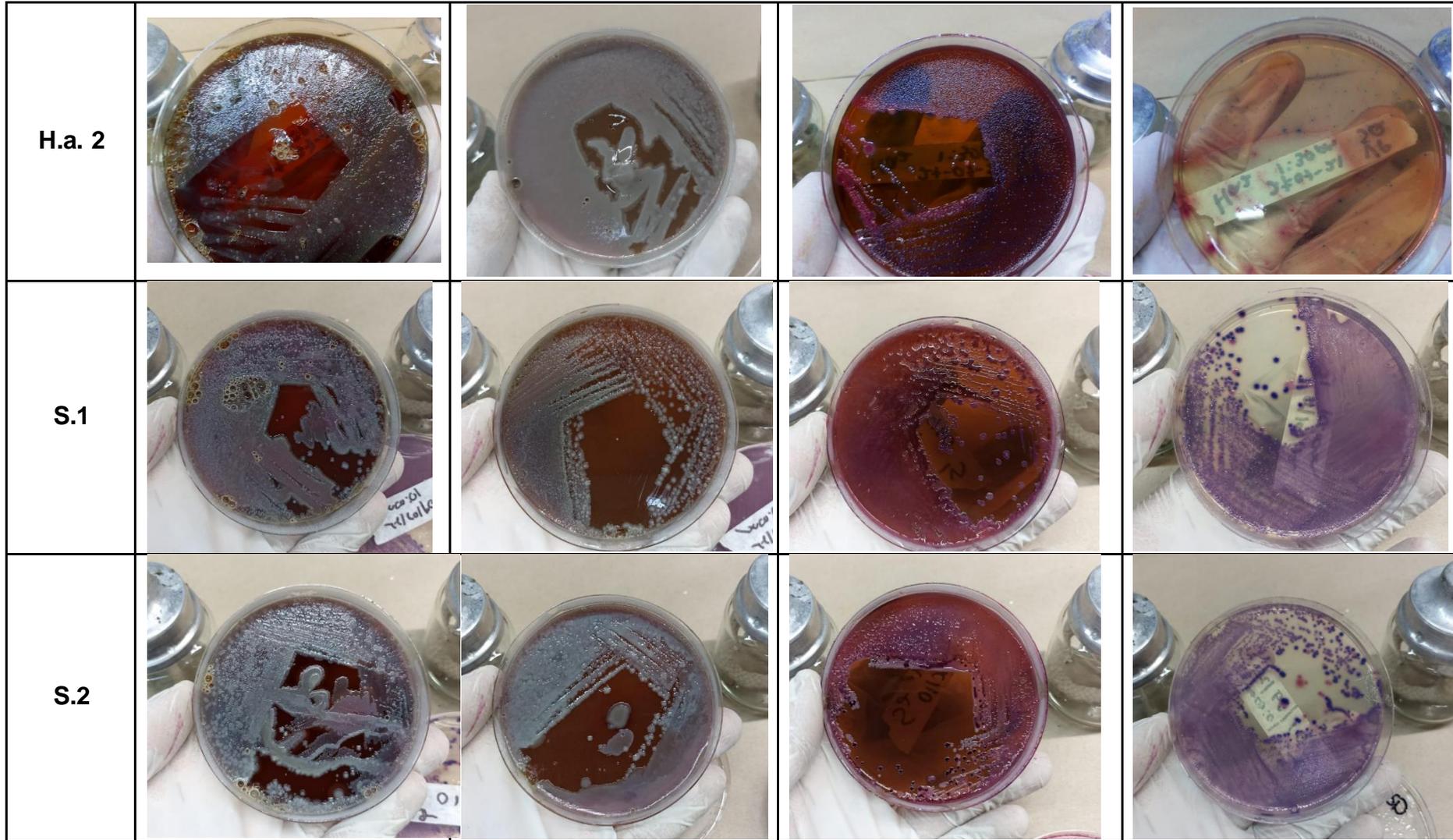
<u>Muestra</u>	<u>Agar Sangre</u>	<u>Agar Chocolate</u>	<u>Agar EMB</u>	<u>Agar Chromocult</u>
U.j.1				
U.j.2				

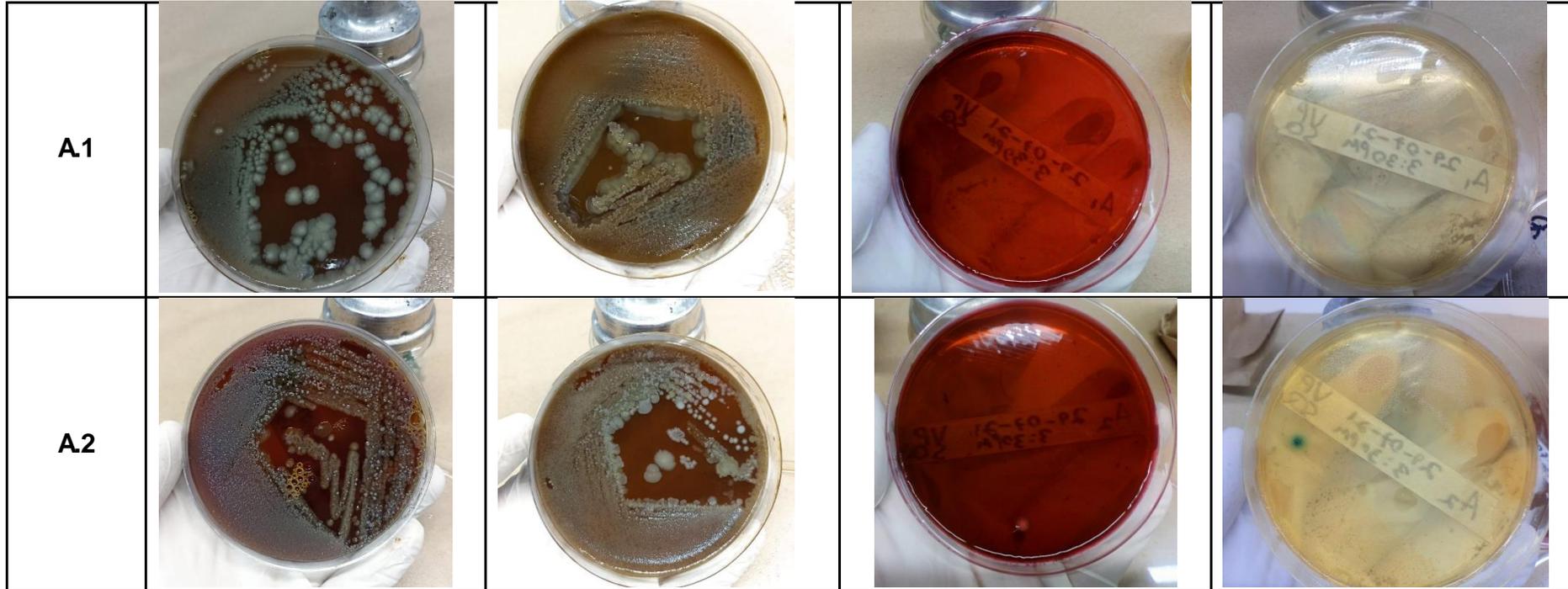












Agar TCBS:

H.g. 3		H.a. 1	
H.a. 2		S.2	
A.1		A.2	

Anexo 2: Caracterización Morfofocultural.

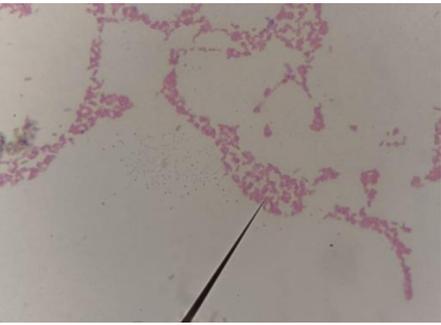
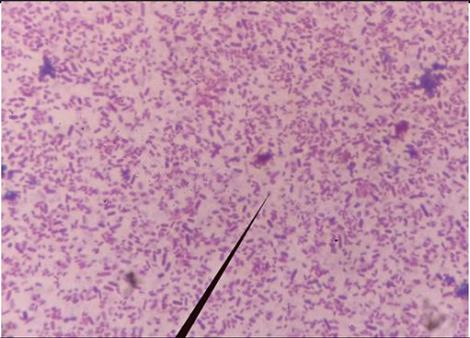
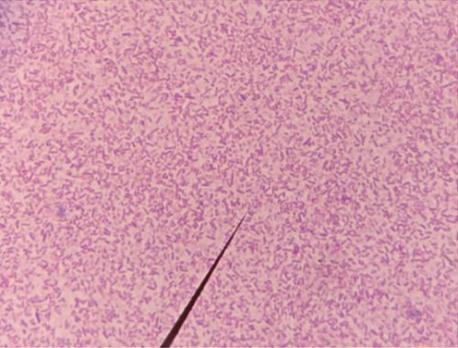
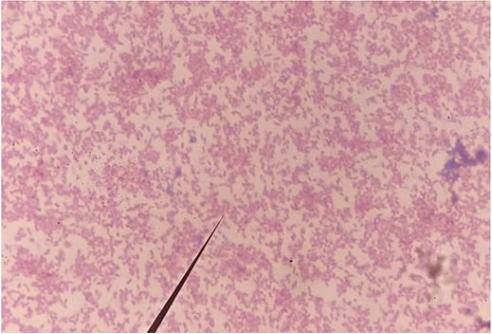
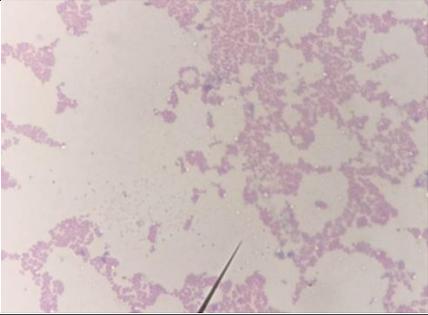
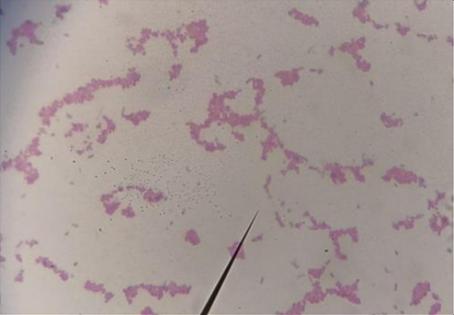
Caracterización Morfofocultural de las comunidades bacterianas del Agujón, Agua y Sedimento							
N°	Cod. Bact	Forma	Superficie	Elevación	Borde	Estructura Interna	Color
Morf. 1	1.U.j.CHC.1(1)	*	*	**	*	**	8
Morf. 2	4.U.j.S.1(1)	*	*	**	*	*	8
Morf. 3	91. U.j.EMB.9(3)	*	*	**	*	**	2
Morf. 4	48.U.j.EMB.5(1)	*	*	**	**	**	4
Morf. 5	10. U.j.CH.1(1)	*	*	*	*	**	10
Morf. 6	11.U.j.CH.1(2)	*	*	*	*	*****	4
Morf. 7	14.U.j.S.2(1)	*	**	***	*	**	8
Morf. 8	15. U.j.S.2(2)	***	****	***	*****	**	8
Morf. 9	40.U.j.EMB.4(2)	*	*	***	*	**	13
Morf. 10	18.U.j.EMB.2(2)	***	**	*	**	*	4
Morf. 11	99.U.j.EMB.10(2)	*	*	**	*	**	9
Morf. 12	83. U.j.CH.8(2)	*	*	**	*	*	12
Morf. 13	26.U.j.S.3(3)	***	**	**	**	***	1
Morf. 14	29.U.j.EMB.3(1)	***	*	***	**	**	16
Morf. 15	123.S2.CHC.1(3)	***	*	**	**	*	1
Morf. 16	44.U.j.S.5(1)	***	*	**	***	**	8
Morf. 17	55.U.j.S.6(2)	***	**	***	***	*	8
Morf. 18	109.H.g.EMB.1(2)	***	*	***	**	**	4
Morf. 19	2.U.j.CHC.1(2)	*	*	*****	**	*	12
Morf. 20	6.U.j.S.1(3)	**	**	**	****	***	8
Morf. 21	7.U.j.EMB.1(1)	*	*	***	**	**	9
Morf. 22	12.U.j.CH.1(3)	*	*	*	*	*****	4
Morf. 23	13.U.j.CH.1(4)	*	*	*****	*	**	10
Morf. 24	25.U.j.S.3(2)	****	**	***	**	**	8

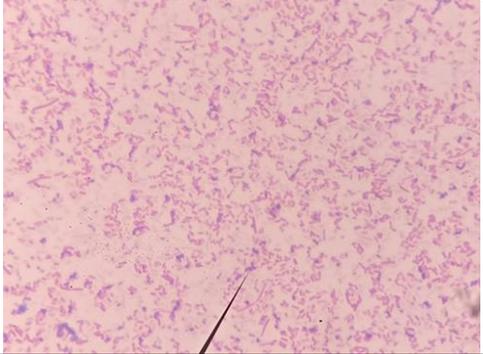
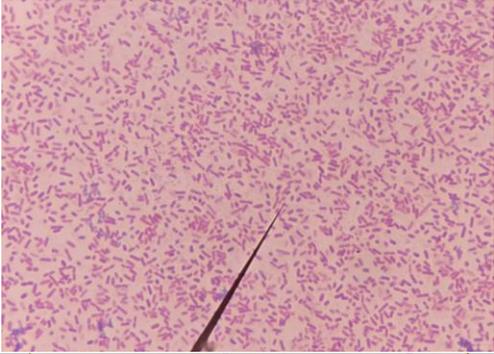
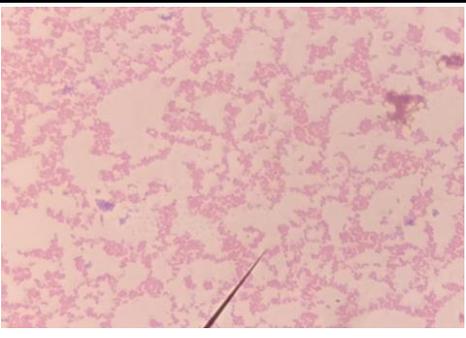
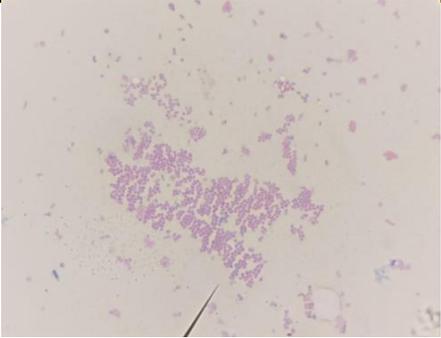
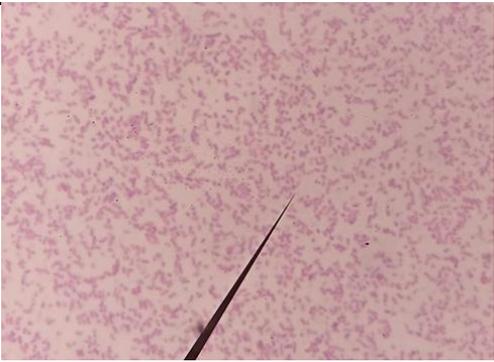
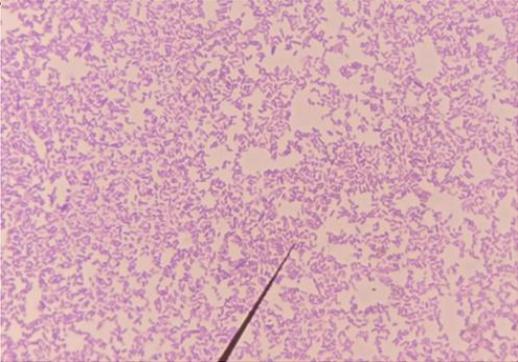
Morf. 25	31.U.j.EMB.3(3)	*	*	**	*	**	2
Morf. 26	36.U.j.S.4(3)	****	*	*	**	*	12
Morf. 27	38.U.j.CHC.4(2)	***	*	**	***	*	8
Morf. 28	47.U.j.CHC.5(2)	***	**	***	*	****	8
Morf. 29	56.U.j.S.6(3)	***	*	***	**	**	8
Morf. 30	58.U.j.CHC.6(2)	***	**	***	**	***	8
Morf. 31	59.U.j.CHC.6(3)	***	*	*	**	*	12
Morf. 32	62.U.j.EMB.6(3)	*	*	***	*	**	2
Morf. 33	63.U.j.EMB.6(4)	***	*	*****	**	*	4
Morf. 34	66.U.j.CH.6(3)	****	*	**	**	*	2
Morf. 35	68.U.j.S.7(2)	*	*	***	**	**	1
Morf. 36	73.U.j.EMB.7(3)	***	*	***	*****	**	2
Morf. 37	77.U.j.CHC.8(1)	*****	*	*****	*****	**	8
Morf. 38	78.U.j.CHC.8(2)	*****	**	**	*****	*	12
Morf. 39	86.U.j.S.9(3)	***	**	***	*****	**	8
Morf. 40	90.U.j.EMB.9(2)	*	**	**	***	*	3
Morf. 41	97.U.j.CHC.10(1)	***	*	***	*	*****	1
Morf. 42	98.U.j.EMB.10(1)	***	*	***	***	**	2
Morf. 43	104.H.g.S.1(2)	*	**	***	****	***	8
Morf. 44	107.H.g.CHC.1(2)	*	**	**	****	*	7
Morf. 45	108.H.g.EMB.1(1)	*	*	***	*	**	9
Morf. 46	116.S1.EMB.1(1)	***	**	***	**	***	2
Morf. 47	117.S1.EMB.1(2)	***	**	***	**	***	2
Morf. 48	120.S2.S.1(1)	****	**	*****	*****	**	8
Morf. 49	121.S2.CHC.1(1)	***	*	**	**	*****	7
Morf. 50	124.S2.CHC.1(4)	*	*	***	*	**	7
Morf. 51	129.A1-1.CHC.1(1)	***	*	**	*	*	7
Morf. 52	130. A1-2.CHC.1(1)	***	**	*****	***	***	8

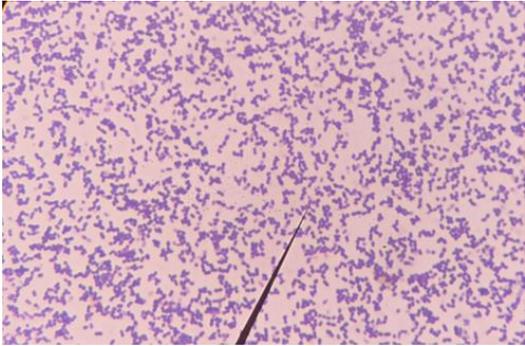
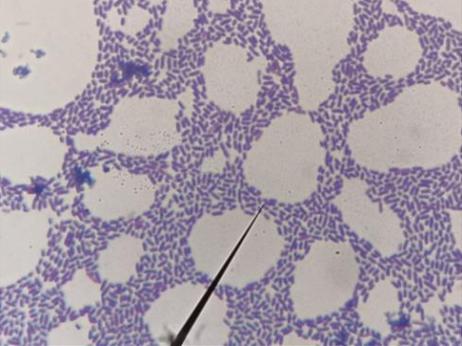
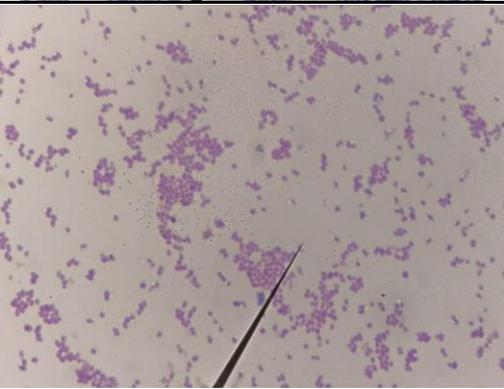
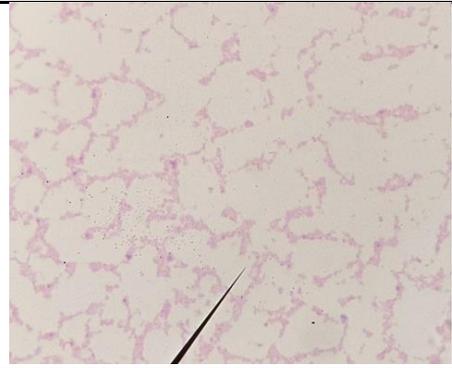
Morf. 53	131. A1-4.CHC.1(1)	***	**	****	*****	*	12
Morf. 54	132. A2-2.S.1(1)	*	*	**	*	*	12
Morf. 55	133. A2-3.S.1(1)	***	*	***	*****	**	1
Morf. 56	134. A2-1.CHC.1(1)	***	*	***	**	*****	8
Morf. 57	135. A2-3.CHC.1(1)	***	*	**	*	*	1
Morf. 58	136. A2-3.CHC.1(2)	*****	**	*****	*****	*****	7
Morf. 59	137. A2-4.CHC.1(1)	***	*	*****	**	**	7
Morf. 60	120.H.g.TCBS.3(1)	*	*	***	*	*	12
Morf. 61	126.H.a.TCBS.1(1)	**	**	*	*	*	12
Morf. 62	133.H.a.TCBS.2(1)	**	**	*	*	*	13
Morf. 63	150.S.TCBS.2(1)	***	*	***	**	**	16
Morf. 64	154.A.TCBS.1(1)	*	*	***	*	*****	15
Morf. 65	155.A.TCBS.1(2)	***	**	***	**	**	14
Morf. 66	164.A.TCBS.2(1)	*	*	***	*	**	15

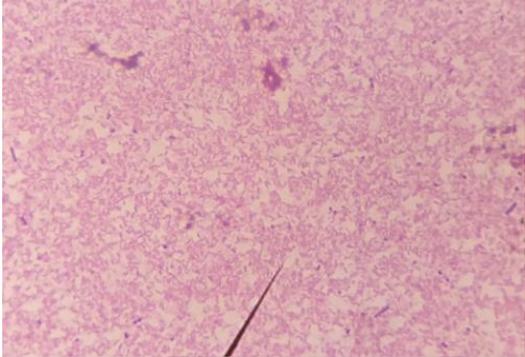
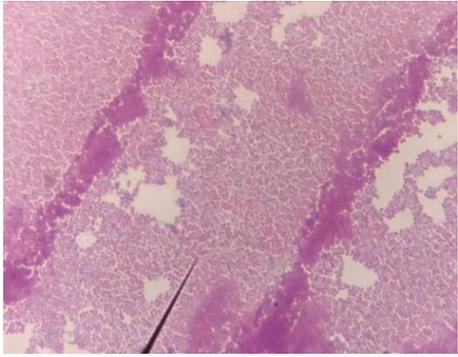
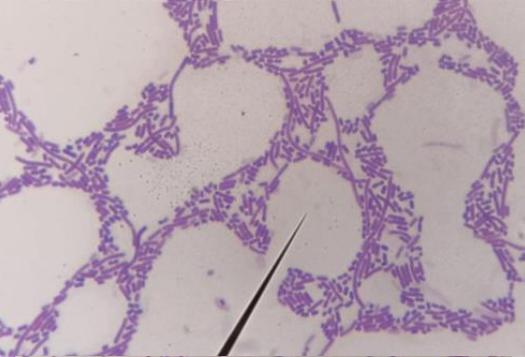
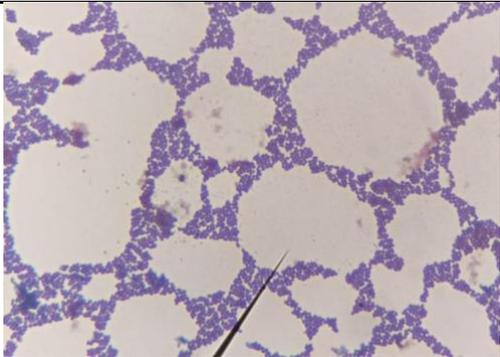
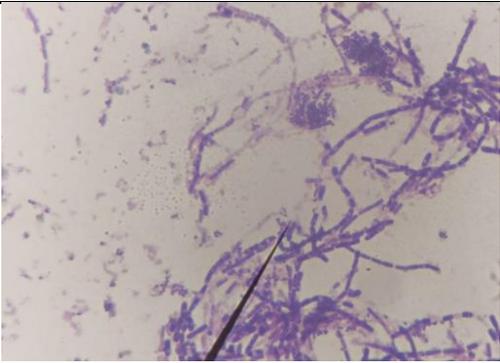
Forma: Circular (*), Filamentosa (**), Irregular (***), Ameboidal (****), Rizoides (*****). **Superficie:** Lisa (*), Rugosa (**), Anillos concéntricos (***), Radiadas (****). **Elevación:** Difusa (*), Ligeramente convexa (**), Elevada (***), Convexa (****), Marcadamente Convexa (*****), Elevada en el centro (*****), Umbilicada (*****). **Borde:** Entero (*), Ondulado (**), Lobulado (***), Erosionado (****), Enrulado (*****), Filamentoso (*****). **Estructura Interna:** Transparente (*), Opaca (**), Finamente Granulada (***), Toscamente Granulada (****), Enrulado (*****), Filamentosa Concéntrica (*****), Concéntrica (*****). **Color:** Beige (1), Violeta (2), Rojizo (3), Rosada (4), Naranja (5), Café (6), Gris (7), Blanca (8), Púrpura (9), Azul (10), Verde-azul (11), Traslucido (12), Negro (13), Verde-amarillo (14), Amarillo (15), Verde oscuro (16).

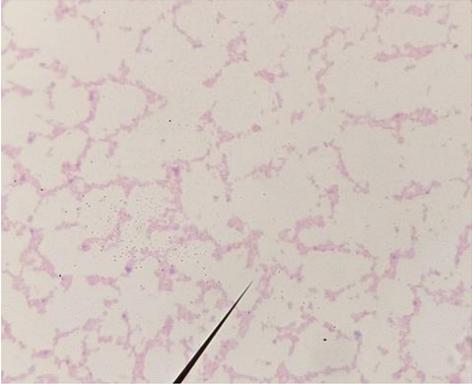
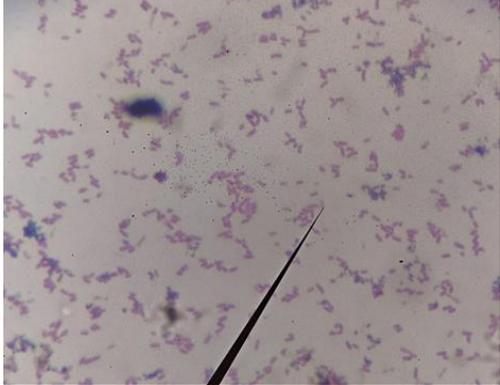
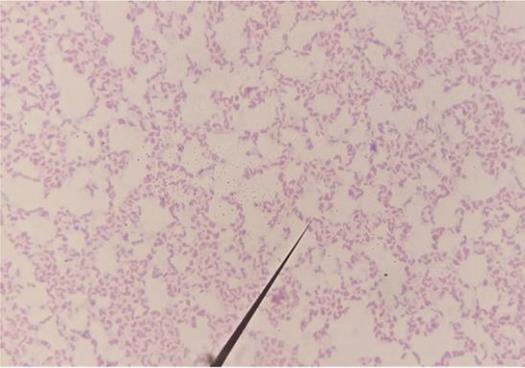
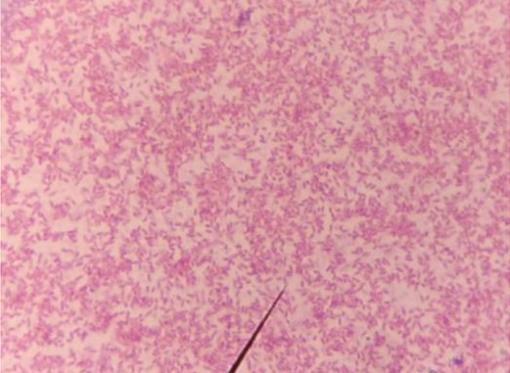
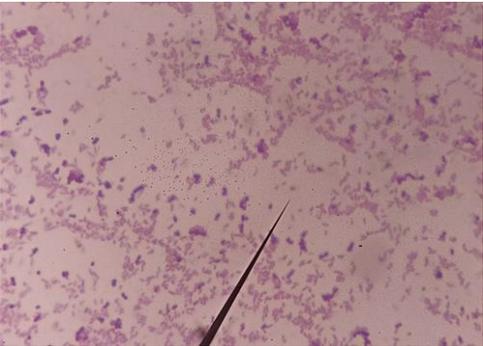
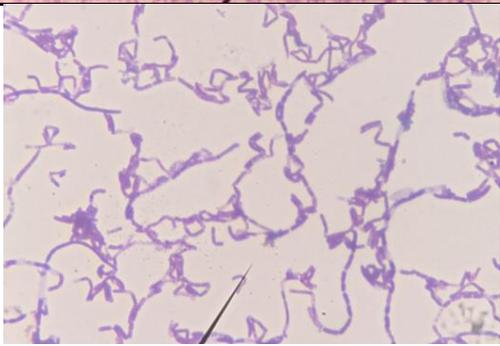
Anexo 3: Tinción de Gram (Objetivo x100).

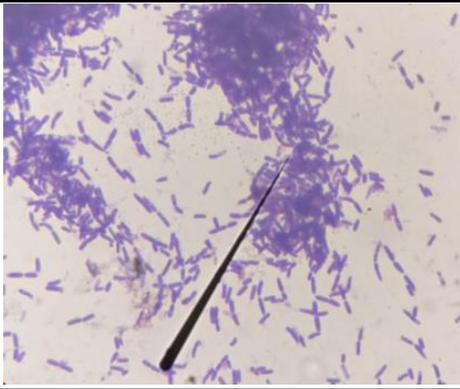
<i>E. coli</i>		ENT.1	
<i>P. mirabilis</i>		PRO.1	
PRO.2		PRO.3	

<p>PRO.4</p>		<p>PRO.5</p>	
<p>PRO.6</p>		<p>PRO.7</p>	
<p>PRO.8</p>		<p>SID.1</p>	

<p>SID.2</p>		<p>SID.3</p>	
<p>SID.4</p>		<p>SID.5</p>	
<p>SID.6</p>		<p>SID.7</p>	

<p>SID.8</p>		<p>SID.9</p>	
<p>SID.10</p>		<p>SID.11</p>	
<p>SID.12</p>		<p>SID.13</p>	

<p>SID.14</p>		<p>SID.15</p>	
<p>SID.16</p>		<p>SID.17</p>	
<p>SID.18</p>		<p>SID.19</p>	

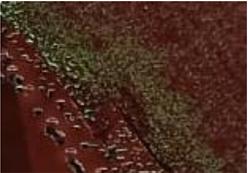
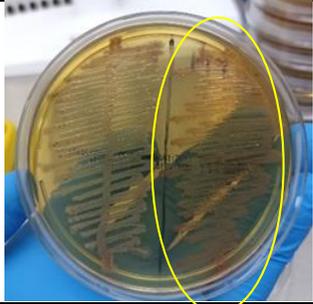
<p>SID.20</p>			<p>SID.21</p>	
---------------	-----------------------------------------------------------------------------------	--	---------------	-------------------------------------------------------------------------------------

Anexo 4: Pruebas Bioquímicas.

Cepa N°	Cod.	CAT	COA	OXI	IND	Familia	Identificacion	gram
1	SID.1	+	-	-	-	Sin ID	Sin ID	coc neg
2	SID.2	+	+	-	-	Sin ID	Sin ID	coc pos
3	SID.3	-	+	+	-	Sin ID	Sin ID	bac pos
4	PRO.1	+	-	+	+	Proteobacteria	Proteobacteria	cocobaci neg
5	PRO.2	-	-	+	+	Proteobacteria	Proteobacteria	coc neg
6	PRO.3	+	-	-	+	Proteobacteria	Proteobacteria	coc neg
7	<i>P. mirabilis</i>	+	-	-	-	Morganellaceae	<i>Proteus mirabilis</i>	bac neg
8	PRO.4	+	+	+	+	Proteobacteria	Proteobacteria	bac neg
9	SID.4	-	-		-	Sin ID	Sin ID	bac neg
10	PRO.5	-	-		+	Proteobacteria	Proteobacteria	bac neg
11	SID.5	+	-		-	Sin ID	Sin ID	coc neg
12	SID.6	+	+	-	+	Sin ID	Sin ID	bac pos / HEMBET
13	<i>E. coli</i>	+	+	-	-	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>	bac neg
14	SID.7	+	+		-	Sin ID	Sin ID	bac neg
15	PRO.6	+	+		+	Proteobacteria	Proteus/KESC	coc neg
16	SID.8	+	+	+	-	Sin ID	Sin ID	bac neg
17	SID.9	+	+		-	Sin ID	Sin ID	sin gram
18	SID.10	-	-		-	Sin ID	Sin ID/purpura	bac pos
19	PRO.7	+	+	-	+	Proteobacteria	Proteobacteria	coc neg
20	SID.11	-	+		-	Sin ID	Sin ID	coc pos
21	SID.12	+	-	+	-	Sin ID	Sin ID	bac neg
22	SID.13	+	+		-	Sin ID	Sin ID	bac pos
23	SID.14	+	+		-	Sin ID	Sin ID	coc neg
24	SID.15	-	+	+	-	Sin ID	Sin ID	bac posneg

25	SID.16	+	-		-	Sin ID	Sin ID	bac neg
26	SID.17	+	+		-	Sin ID	Sin ID	bac neg
27	SID.18	+	+	+	-	Sin ID	Sin ID	cocbac neg
28	SID.19	+	-		-	Sin ID	Sin ID	bac pos
29	PRO.8	+	+		+	Proteobacteria	Proteobacteria	bac neg
30	SID.20	-	-		-	Sin ID	Sin ID	bac neg
31	SID.21	+	-		-	Sin ID	Sin ID	bac pos
32	PRO.9	+	+		+	Proteobacteria	Proteobacteria	bac neg
33	SID.22	+	+		+	Sin ID	Sin ID	bac neg
34	SID.23	+	+	+	-	Sin ID	Sin ID	bac pos
35	SID.24	-	-	+	-	Sin ID	Sin ID	bac pos
36	SID.25	-	-	+	-	Sin ID	Sin ID	coc neg
37	<i>V. cholerae</i>					Vibrionaceae	<i>Vibrio cholerae</i>	apariencia transparente y agar amarillo
38	ENT.1					Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae	Transparente
39	VIB.2					Vibrionaceae	<i>Vibrio sp.</i>	Agar Negro
40	VIB.3					Vibrionaceae	<i>Vibrio sp.</i>	Verde oscuro de apariencia viscosa
41	VIB.4					Vibrionaceae	<i>Vibrio sp.</i>	amarillo centro negro
42	VIB.5					Vibrionaceae	<i>Vibrio sp.</i>	verde opaco textura firme
43	<i>V. alginolyticus</i>					Vibrionaceae	<i>Vibrio alginolyticus</i>	colonias amarillas grandes

Anexo 5: Agar Cromogénico.

Proteobacteria			
<p>Morfotipo 6</p> 		<p>Morfotipo 8</p> 	
Sin ID			
<p>Morfotipos 12-21</p> 		<p>Morfotipo 3</p> 	
Especies identificadas			
<p>Morfotipo 13 <u><i>E.coli</i></u></p> 		<p>Morfotipo 7 <u><i>P.mirabilis</i></u></p> 	

Anexo 6: Resultados de las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene para los medidas morfométricas de los ejemplares de *U. jamaicensis*.

Shapiro-Wilk		Levene
LT	0,9107	0,002939
AD	0,9465	
LA	0,8819	

Anexo 7: Resultados las Shapiro-Wilk y de Levene para las OTUs definidas.

Variable	Shapiro-Wilk	Levene
<i>Proteobacteria</i>	0,09736	7,441E-12
Sin ID	0,04326	
<i>Morganella</i>	4,904E-05	
<i>Enterobacteria</i>	6,562E-05	
Vibrio	7,525E-07	

Anexo 8: Código fuente para evaluar los diferentes modelos en RStudio.

```
1  ##cargar datos al enviroment
2  s19=as.matrix(s19)
3  resultados=c()
4  ##for (microorganismo in microorganismos) {
5  mse=0
6  ##modelo60/40
7  ##model<-elm(SI19[length(SI19[1,])][1:6]~.,SI19[1:6,],350,"sig")
8  model<-elm(SI19~.,s19[1:6,],350,"sig")
9  prediccion=predict(model,as.data.frame.matrix(s19[7:10,]))
10 residuoprediccion=s19[7:10,length(s19[1,])]-prediccion
11 for (residuo in residuoprediccion) {
12   mse=mse+residuo^2
13 }
14 mse=mse/length(residuoprediccion)
15 resultados=c(resultados,c("s19",mse))
16 mse=0
17 ##modelo70/30
18 model<-elm(SI19~.,s19[1:7,],350,"sig")
19 prediccion=predict(model,as.data.frame.matrix(s19[8:10,]))
20 residuoprediccion=s19[8:10,length(s19[1,])]-prediccion
21 for (residuo in residuoprediccion) {
22   mse=mse+residuo^2
23 }
24 mse=mse/length(residuoprediccion)
25 resultados=c(resultados,c("s19",mse))
26 mse=0
27 ##modelo100prediccionsubset
28 model<-elm(SI19~.,s19,350,"sig")
29 prediccion=predict(model,as.data.frame.matrix(s19[5:15,]))
30 for (residuo in model$residuals) {
31   mse=mse+residuo^2
32 }
33 mse=mse/length(model$residuals)
34 resultados=c(resultados,c("s19",mse))
35 mse=0
36 ##}
37 write.csv2(resultados,"C:/Users/USER/Desktop/csv/ResultadosMSE.csv")
```

Anexo 9: Valoraciones para cada variable en los modelos de las identidades bacterianas.

Iden.Bact	H	M	U.j	H.g	H.a	Agua	Sed	LT	LA	AD	LA/LT
<i>E. coli</i>								0.3988454	0.4183956	0.5830673	
ENT.1								0.06829736	0.0029209	0.17680723	
<i>P. mirabilis</i>			0.0917691	0.0303195	0.0108402					0.005918817	0.2862068
PRO.1								0.0661573	0.1225142	0.3174897	
PRO.2			0.3377686	0.0077048	0.4264583					0.187071111	0.085195
PRO.3			0.1926884	0.1367054	0.3544173					0.20918554	0.0961185
PRO.4			0.1616857	0.0272243	0.0656963					0.07853574	0.2221235
PRO.5	0.0361901	0.228682	0.083349	0.1782371	0.1477352	0.0927018	0.176844	0.02830102	0.0556717	0.01717355	
PRO.6			0.1170115	0.0699454	0.0931697					0.05687631	0.0997121
PRO.7	0.0390104	0.0495144	0.1480706	0.0091255	0.0102302	0.0508865	0.0376866	0.023118814	0.0301832	0.048928515	
PRO.8								0.2235758	0.188631	0.1852766	
SID.1	0.0390104	0.0495144	0.1480706	0.0091255	0.0102302	0.0508865	0.0376866	0.023118814	0.0301832	0.048928515	
SID.2			0.1139662	0.0423755	0.2010321					0.0713883	0.4063646
SID.3			0.2585386	0.2741782	0.2485968					0.05955888	0.6146936
SID.4								0.15338	0.2192572	0.2283413	
SID.5			0.0022671	0.1578517	0.1440779					0.023214297	0.4899346
SID.6								0.3072278	0.2043334	0.3071529	
SID.7								0.4955497	0.1415182	0.2440856	
SID.8	0.0898226	0.6457229	0.2179133	0.4523509	0.4301651	0.3372255	0.4951711	0.06072719	0.144618	0.08571836	
SID.9	0.0898226	0.6457229	0.2179133	0.4523509	0.4301651	0.3372255	0.4951711	0.06072719	0.144618	0.08571836	
SID.10			0.1215254	0.1673866	0.1553376					0.07154948	0.4068393
SID.11	0.001169	0.0006309	0.001646	0.0041789	0.0028357	0.0029088	0.000809	0.001904695	0.0095226	0.003220163	
SID.12			0.0663975	0.1536709	0.3417738					0.12445806	0.2610419
SID.13	0.066867	0.467849	0.1489303	0.3240782	0.3089945	0.2410058	0.3610596	0.04658147	0.0826306	0.05416656	
SID.14			0.0875825	0.2369747	0.3171786					0.02622382	0.2951173
SID.15			0.0875825	0.2369747	0.3171786					0.02622382	0.2951173
SID.16			0.0875825	0.2369747	0.3171786					0.02622382	0.2951173
SID.17			0.0875825	0.2369747	0.3171786					0.02622382	0.2951173
SID.18	0.2104765	0.7063089	0.8629717	0.4115436	0.3787037	0.4178592	0.2258974	0.1018925	0.1739541	0.1157284	
SID.19			0.0024395	0.0199975	0.0714921					0.013415377	0.1930259
SID.20			0.2238096	0.0159043	0.3314309					0.13515944	0.0267308
SID.21			0.2238096	0.0159043	0.3314309					0.13515944	0.0267308
<i>V.cholerae</i>			0.1928361	0.0106888	0.105351					0.13537999	0.2004274
VIB.2			0.0519843	0.6067729	0.5443819					0.17816475	0.3426316

