



Diversidad bacteriana en fragmentos de bosque de la Reserva Ecológica Mache-Chindul

María Isabel Aguilar Del Pozo. Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales.
Ingeniería en Biotecnología.





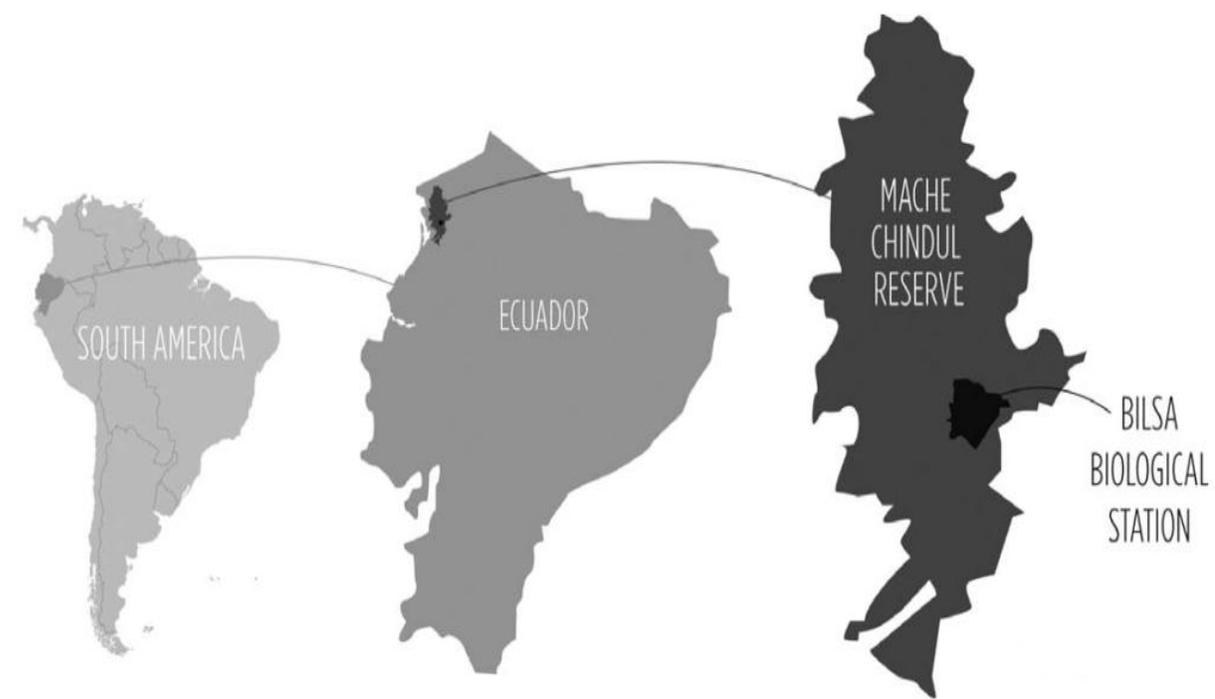
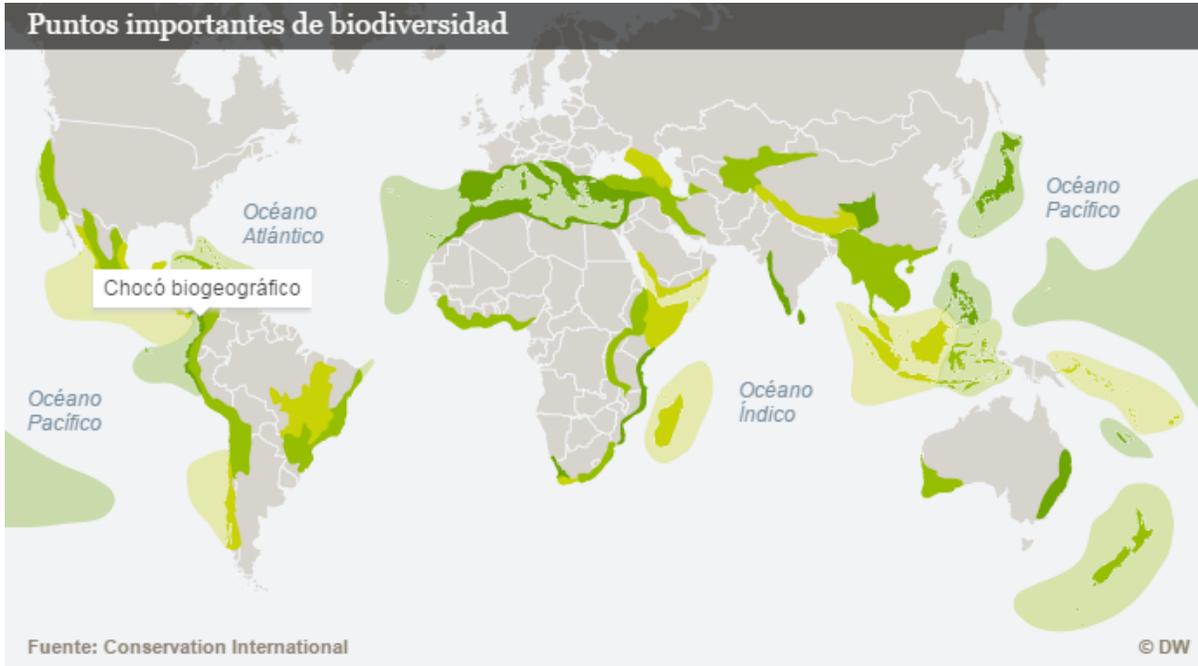
Diversidad bacteriana en ecosistemas selectos del Ecuador: Nevados y Bosques Húmedos Tropicales



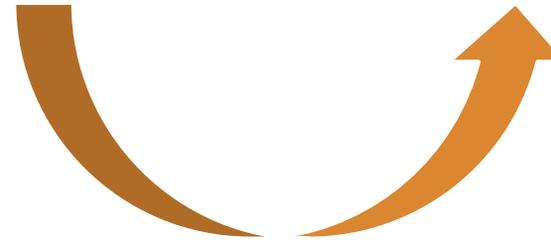
The Earth Microbiome Project is a systematic attempt to characterize the global microbial taxonomic and functional diversity for the benefit of the planet and mankind



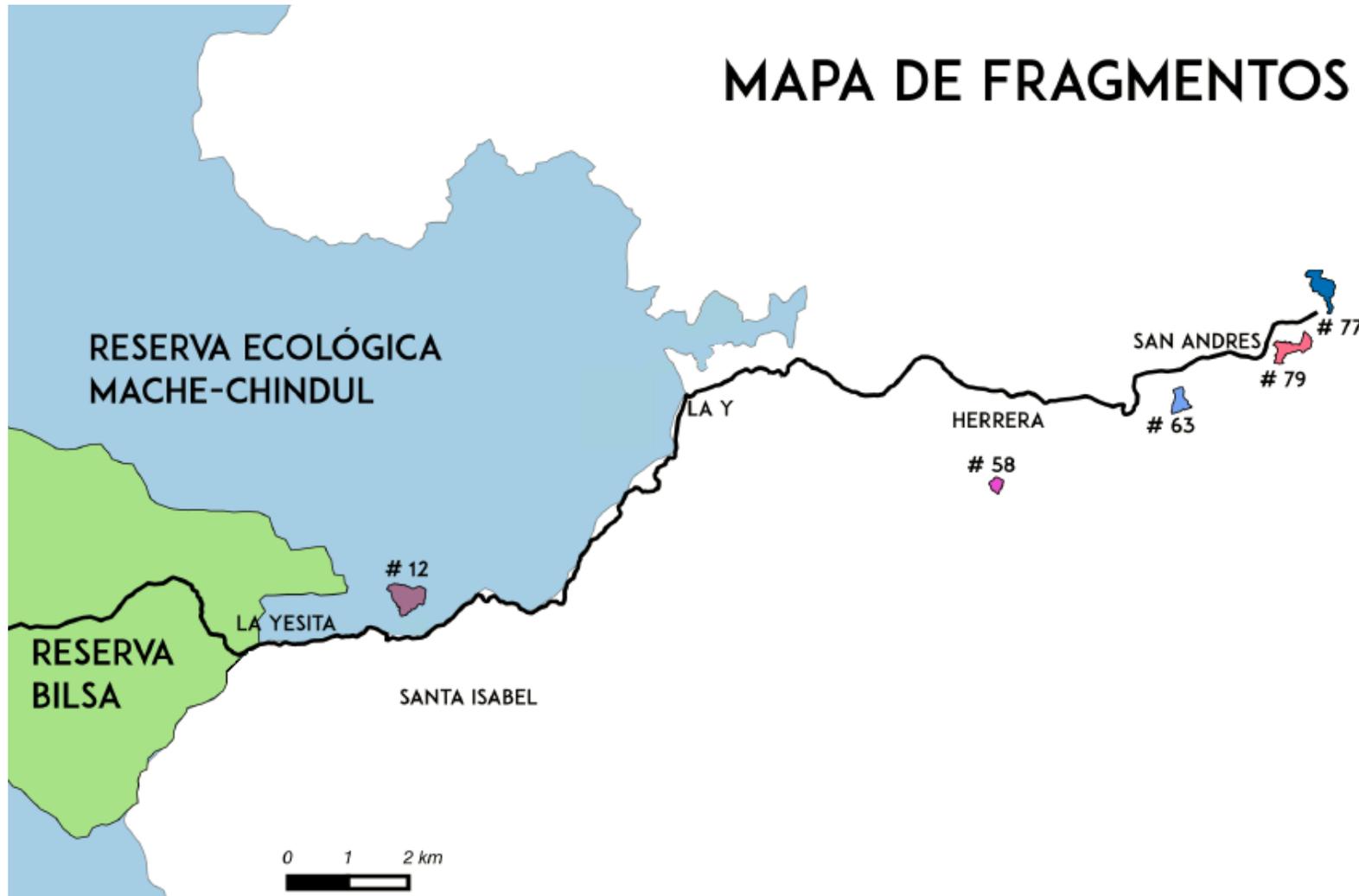
Introducción



Conocer y comparar la composición de las comunidades bacterianas de fragmentos de bosque de la Reserva Ecológica Mache-Chindul con diferente grado de intervención antropogénica.



Zona de muestreo



REMACH

Estación Biológica Bilsa

12: Bosque conservado

58 y 63: Bosque medianamente conservado

77 y 79: Bosque no conservado



Metodología de campo: Muestreo

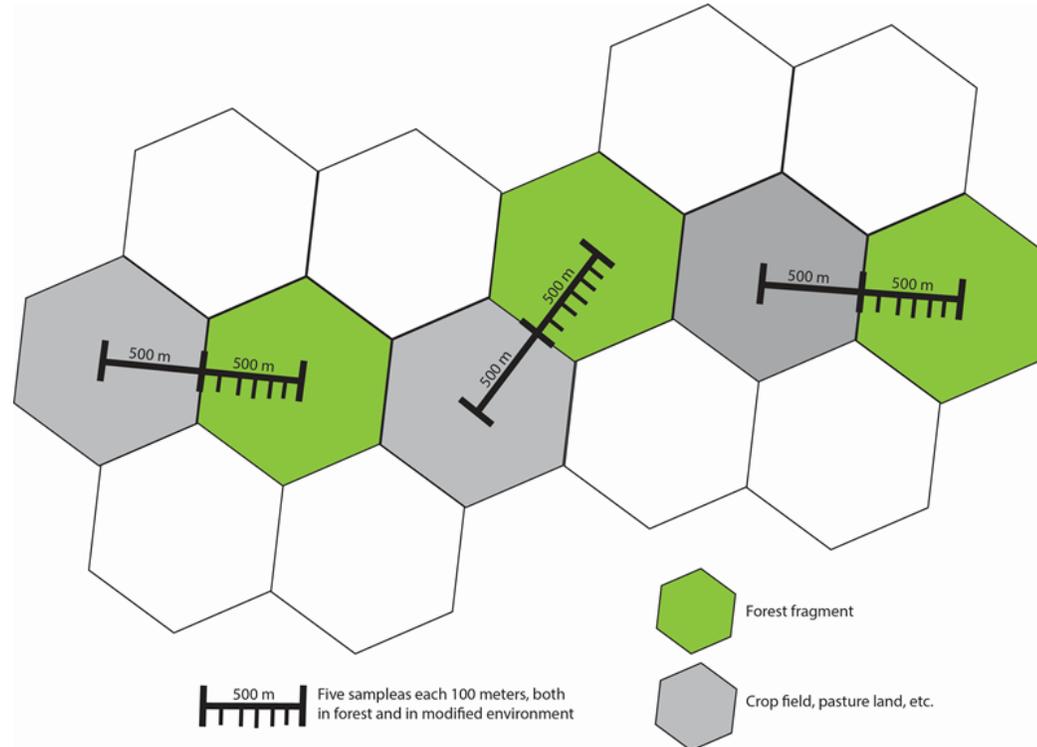
Técnica nucleadores:
Neplos 10-15cm
autoclavados con
tapa



Martillo esterilizado



Movimiento, golpe
perpendicular al
suelo



Metodología: laboratorio

Extracción del material genético total de la muestra

PowerSoil® DNA Isolation Kit, MoBio Laboratories

Preparar la muestra



- Colocar la muestra en los *bead tubes*
- Añadir solución C1
- Homogenizar



Centrifugar

Lisis celular



- Añadir solución C2
- Incubar a 4°C



Centrifugar

Remover inhibidores



- Añadir solución C3
- Incubar a 4°C

Unión del DNA



Centrifugar



- Añadir solución C4
- Cargar en los *spin filters*



Centrifugar

Lavar



- Con solución C5



Centrifugar

Eluir

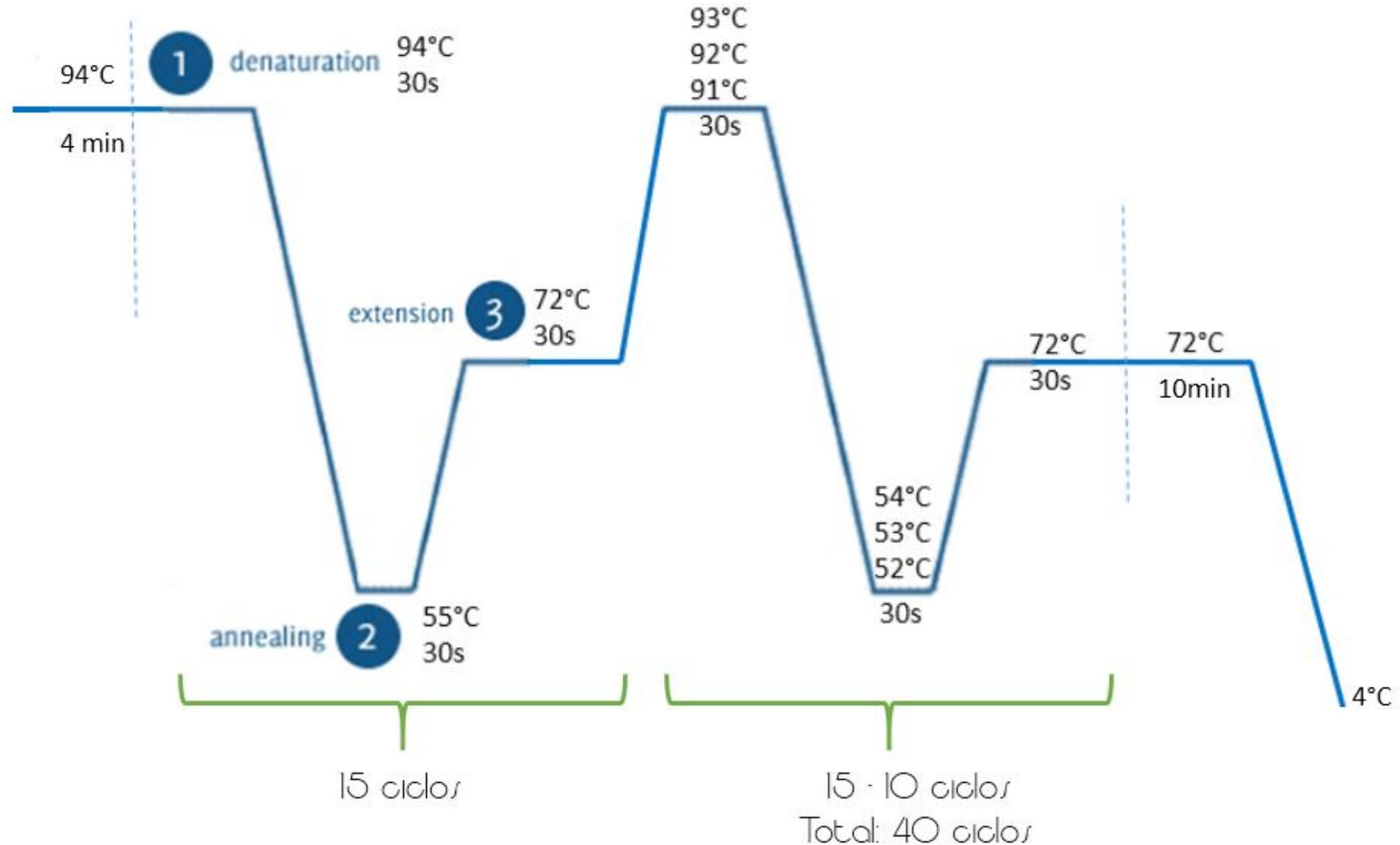
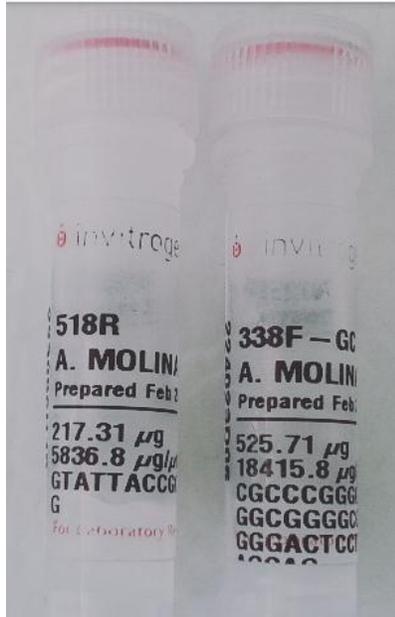


- Con solución C6



Metodología: laboratorio

Amplificación del material genético



Metodología: laboratorio

DGGE

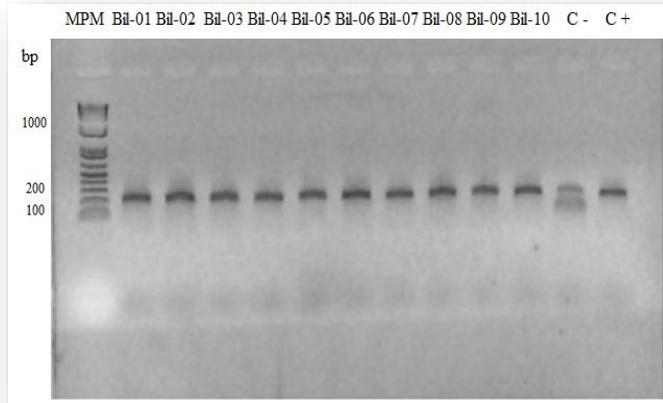
Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

Metagenómica: Conjunto de técnicas *fingerprinting* independientes de los medios de cultivo, que se encargan del estudio del material genético de las comunidades microbianas.

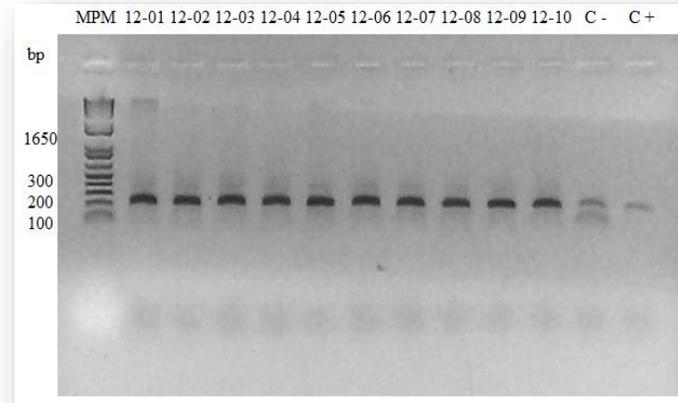


Resultados: Amplificación del gen 16S rRNA

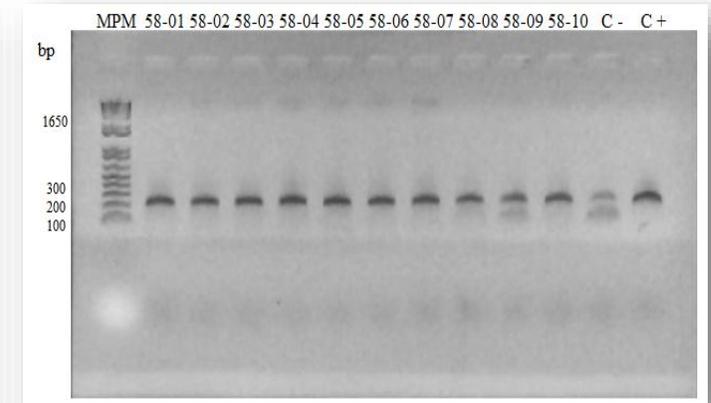
Estación Biológica Bilsa



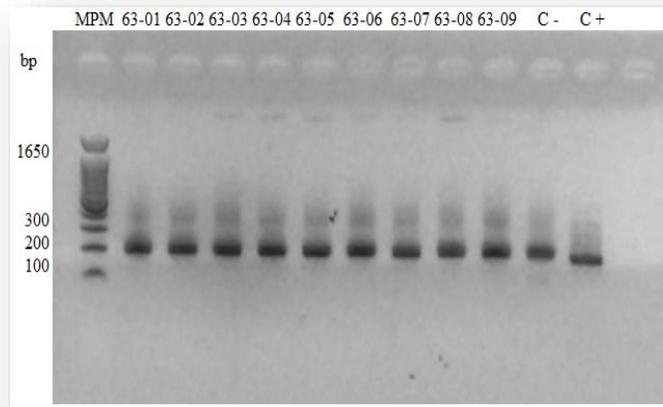
Fragmento 12



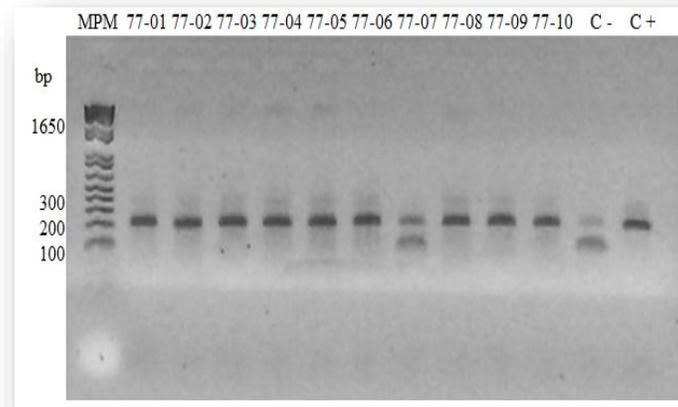
Fragmento 58



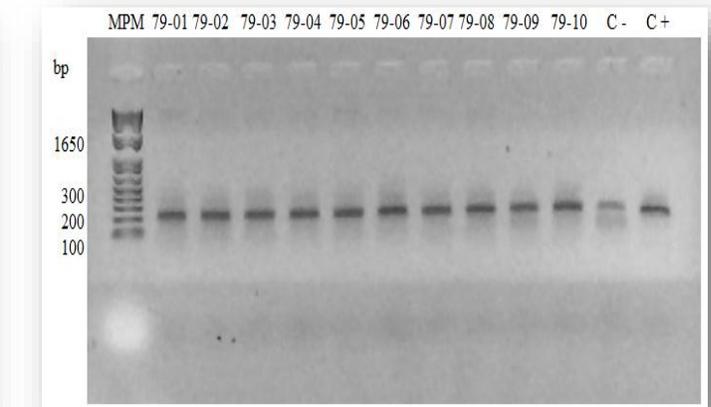
Fragmento 63



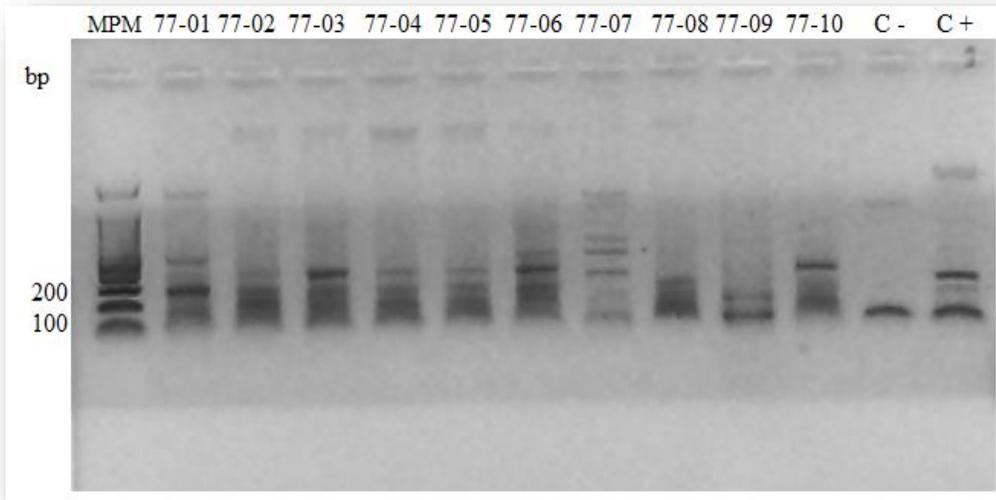
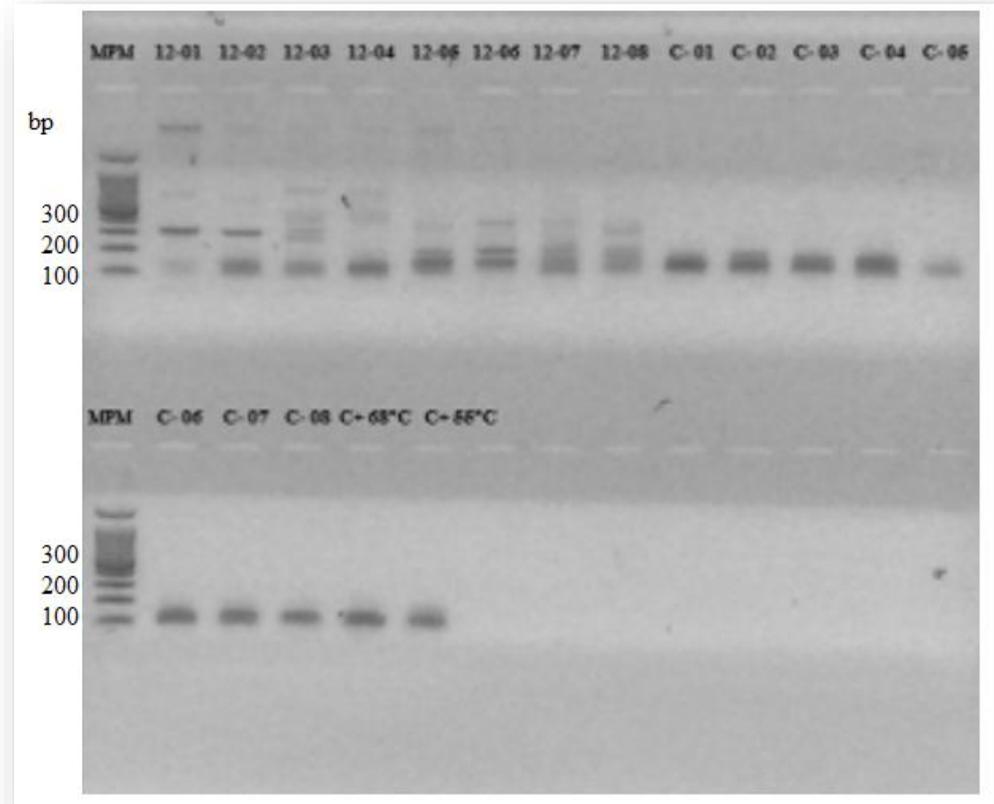
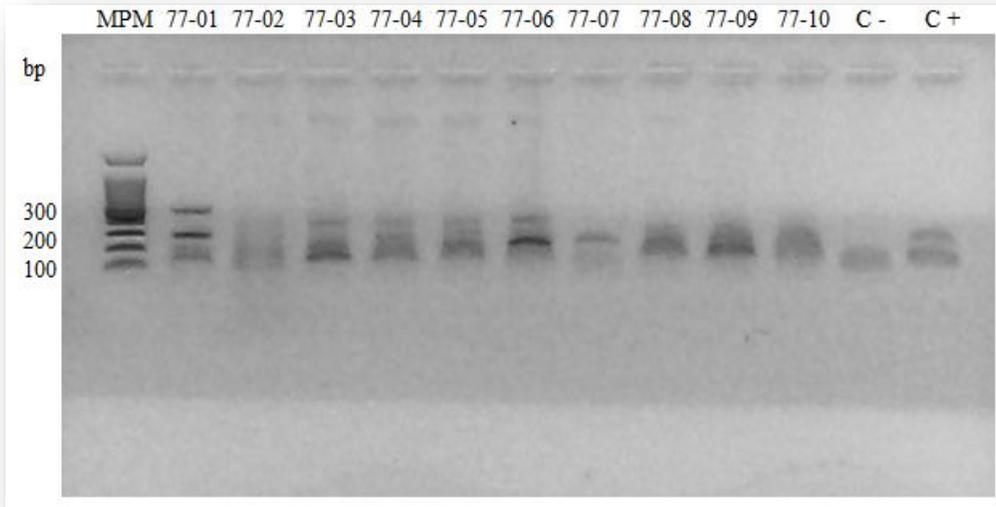
Fragmento 77



Fragmento 79



Resultados: Ensayos propuestos para evitar la contaminación



↓518

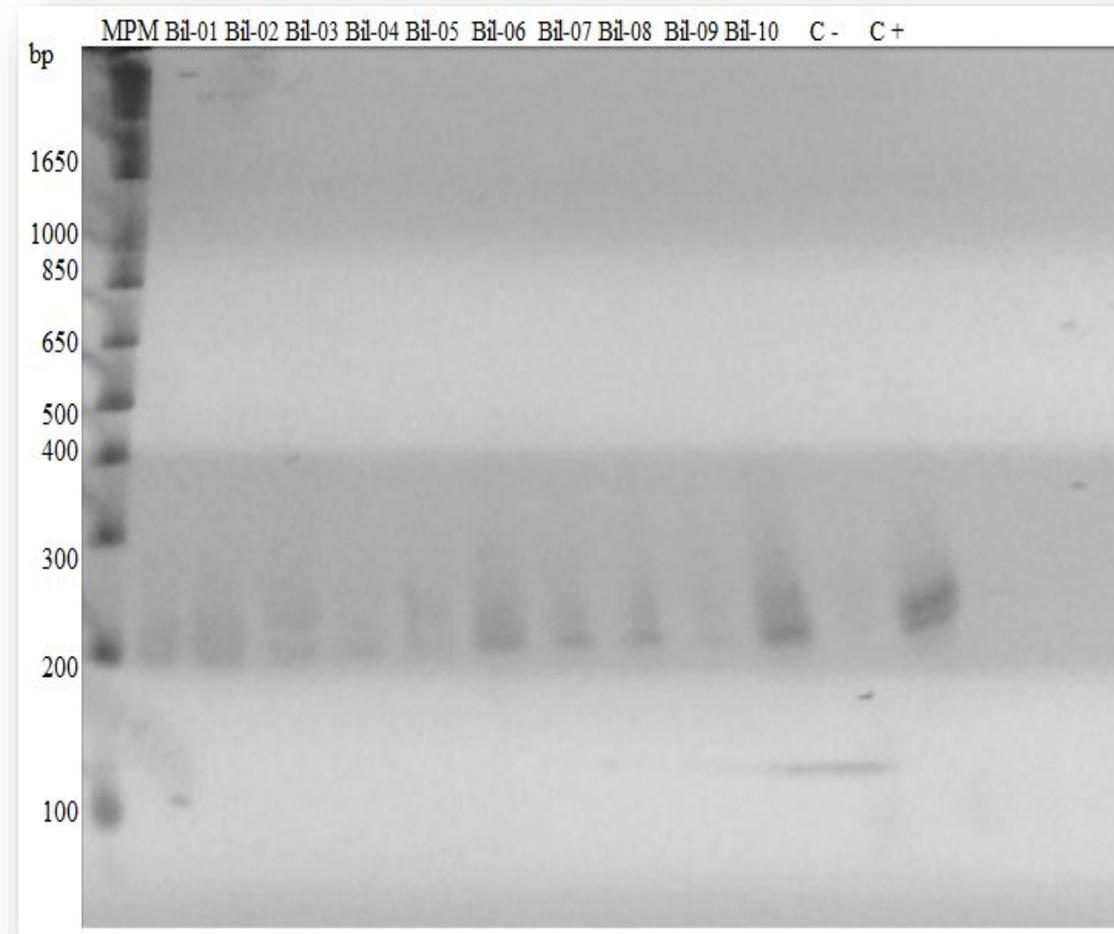
<i>Escherichia</i> (Poteobacteria)	cgtg ccagcagccgcggta atacg
<i>Microsporidium</i> (Fungi)	g.....C
<i>Gadus</i> (Metazoa)	g.....t.c
<i>Homo sapiens</i> (Eukarya)	ggtg.....tcc



Resultados: DGGE

Estación Biológica Bilsa

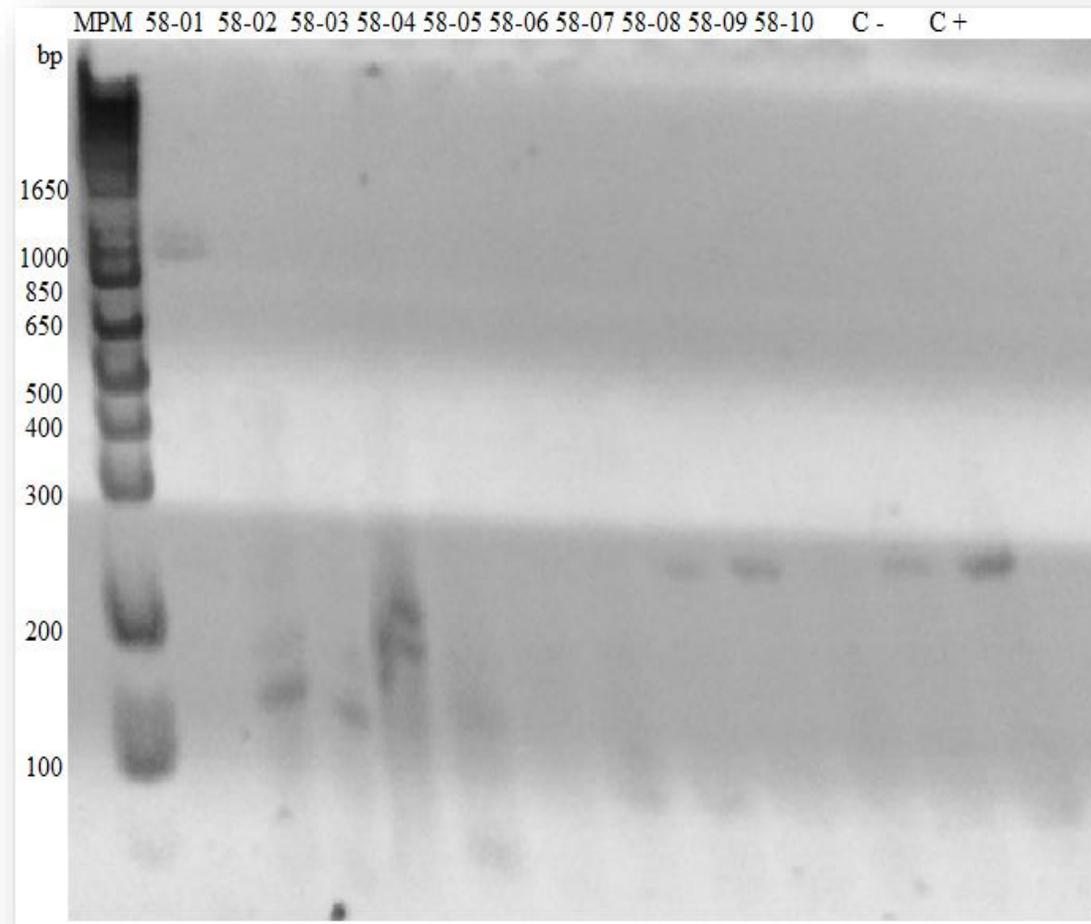
Gel de poliacrilamida (10%), gradiente 40% low, 60% high. DGGE del fragmento Bilsa. MPM (1kb), 1) Bosque, 2) Bosque, 3) Bosque, 4) Bosque, 5) Bosque, 6) Pastizal, 7) Pastizal, 8) Pastizal, 9) Pastizal, 10) Pastizal, 11) Control negativo, 12) Control positivo



Resultados: DGGE

Fragmento 58

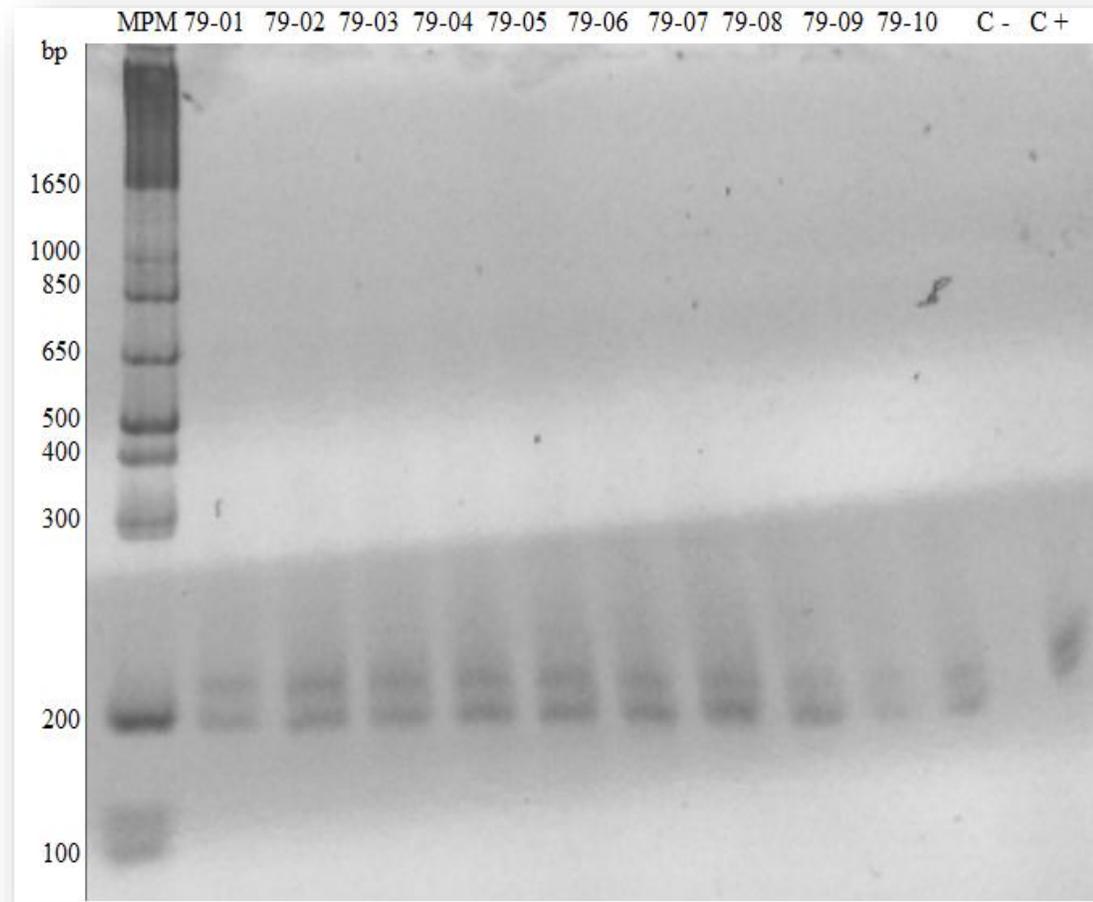
Gel de poliacrilamida (10%), gradiente 40% low, 60% high. DGGE del fragmento 58. MPM (1kb), 1) Bosque, 2) Bosque, 3) Bosque, 4) Bosque, 5) Bosque, 6) Pastizal, 7) Pastizal, 8) Pastizal, 9) Pastizal, 10) Pastizal, 11) Control negativo, 12) Control positivo



Resultados: DGGE

Fragmento 79

Gel de poliacrilamida (10%), gradiente 40% low, 60% high. DGGE del fragmento 79. MPM (1kb), 1) Bosque, 2) Bosque, 3) Bosque, 4) Bosque, 5) Bosque, 6) Pastizal, 7) Pastizal, 8) Pastizal, 9) Pastizal, 10) Pastizal, 11) Control negativo, 12) Control positivo



Conclusiones

- ❖ Los primers no son específicos para bacterias, son universales (procariotas) y presentan similitud con regiones conservadas de los genes SSU rRNA de los eucariotas, con un 100% de homología para el primer 518R a una de las regiones del gen 18S SSU rRNA de estos organismos, lo que provoca la aparición de bandas inespecíficas en los geles de agarosa.
- ❖ El protocolo de PCR no fue el adecuado para el tipo de muestras con las que se trabajó.
- ❖ La secuencia del primer 338F con el que se trabajó estuvo cambiada en dos nucleótidos.
- ❖ La diversidad microbiana del suelo de la Reserva Ecológica Mache - Chindul es mayor en el bosque no fragmentado y en los fragmentos de bosque conservados.



Conclusiones

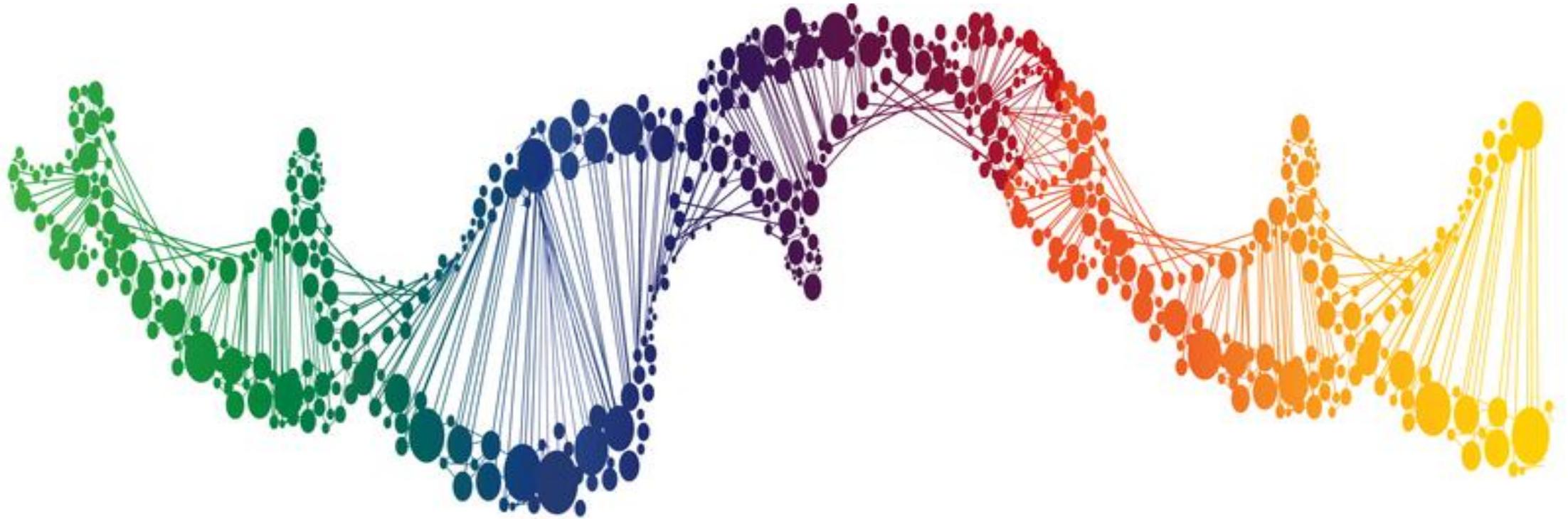
- ❖ En el fragmento de bosque del fragmento 58 las comunidades bacterianas cambian cada 100m, lo que demuestra la enorme diversidad de microorganismos que poseen los suelos de la REMACH.
- ❖ En el pastizal del fragmento 58 aparece una comunidad de bacterias en los 500m muestreados, confirmando la pérdida de especies y por lo tanto de diversidad debido a las actividades antropogénicas.
- ❖ La mayor diversidad de bacterias del fragmento 58 se concentra en el fragmento de bosque a partir de los 200m desde el borde hacia el interior.
- ❖ Las muestras del fragmento 79 evidencian la invasión de microorganismos desde el pastizal hacia el fragmento de bosque.



Recomendaciones

- Se sugiere cambiar el set de los primers 338F y 518R por primers más específicos para evitar la obtención de bandas inespecíficas y la contaminación con ADN eucariota. Una buena alternativa son los primers rpoB que amplifican la subunidad β de la RNA polimerasa de las bacterias.
- Otra alternativa es la realización de una PCR anidada con el objetivo de eliminar ADN eucariota de las muestras.
- Probar otro protocolo de PCR para los primers 338F y 518R.
- Hacer alícuotas de los reactivos para evitar la contaminación.
- Confirmar la secuencia del primer 338F.





Gracias por su atención

EXPERIMENT.
FAIL.
LEARN.
REPEAT.

