UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y AMBIENTALES

Trabajo de fin de carrera titulado:

"DIVERSIDAD BACTERIANA EN FRAGMENTOS DE BOSQUE DE LA RESERVA ECOLÓGICA MACHE CHINDUL"

Realizado por:

MARÍA ISABEL AGUILAR DEL POZO

Director del proyecto:

Ph.D. PABLO CASTILLEJO PONS

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 09 de agosto de 2016

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, MARÍA ISABEL AGUILAR DEL POZO, con cédula de identidad #172210391-6, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

María Isabel Aguilar Del Pozo

C.C.: 172210391-6

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

"DIVERSIDAD BACTERIANA EN FRAGMENTOS DE BOSQUE DE LA RESERVA ECOLÓGICA MACHE-CHINDUL

Realizado por:

MARÍA ISABEL AGUILAR DEL POZO

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

PABLO CASTILLEJO PONS

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

Pablo Castillejo Pons

DIRECTOR

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

GRACIELA UZCANGA

SUSANA CHAMORRO

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador

Graciela Uzcanga **Susana Chamorro**

Quito, 25 de julio de 2016

DEDICATORIA

A Dios,

a mis padres Margarita y Luis Antonio y a mi hermano Luis Martín por ser mi soporte diario y brindarme todo su cariño y paciencia.

Abuelo Rafael, por ti comenzó este gran sueño. Ahora estoy aquí.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por todas las bendiciones que ha puesto en mi vida.

A mi familia por su preocupación, sacrificio, paciencia, comprensión y sobre todo su amor.

A mis amigos Luis y Juan Sebastián.
Los buenos momentos hicieron más llevadero el trabajo. Gracias por hacer de mí una mejor persona.

Un especial agradecimiento a todos los profesores que tomaron parte en mi formación académica, me llevo algo de cada uno.

Finalmente, agradezco de manera grande a Alfonso Molina, al Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) y a todo su personal. Mi formación profesional creció enormemente gracias a su apoyo y colaboración.

A todos ellos, gracias de corazón.

Índice de contenido

Resumen xiii
Abstract xiv
Símbolos y abreviaturas xv

Capítulo I 1
Introducción 1
1.1. Descripción del tema a desarrollar 1
1.2. Antecedentes 4
1.3. Importancia del estudio 5
1.4. Objetivos 6
1.4.1. Objetivo General 6
1.4.2. Objetivos específicos 6
1.5. Características del sitio del proyecto 7

Capítulo II 10
Marco teórico 10
2.1. Estado actual del conocimiento científico 10
2.1.1. Efectos de la fragmentación sobre los factores abióticos del ecosistema 13
2.1.2. Efectos de la fragmentación sobre los factores bióticos del ecosistema 13
2.2. Marco legal 17
2.3. Marco conceptual 18

Capítulo III 20
Metodología 20
3.1. Metodología de campo 20
3.1.1. Zona de estudio 20
3.1.2. Muestreo 22
3.1.3. Técnica de muestreo 24
3.2. Metodología de laboratorio 25
3.2.1. Extracción del ADN total bacteriano 25
3.2.2. Cuantificación del material genético 27

3.2.3. Amplificación del material genético mediante PCR 28
3.2.4. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) 34

Capítulo IV 38
Resultados y Discusión 38
4.1. Resultados 38
4.1.1. Muestreo 38
4.1.2. Extracción y cuantificación del ADN total bacteriano 42
4.1.3. Amplificación del material genético mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa 42
4.1.4. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) 52
4.2. Discusión 54
4.2.1. Amplificación del material genético y electroforesis en gel de agarosa 54
4.2.2. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) 59

Capítulo V 62
Conclusiones y Recomendaciones 62
5.1. Conclusiones 62
5.2. Recomendaciones 64

Capítulo VI 66
Referencias 66

Anexos 71
Anexo A: Cuantificación del ADN extraído con el protocolo de MoBio Laboratories 71
Anexo B: Cuantificación del material genético posterior a la amplificación 74
Anexo C: Imágenes originales de las reacciones de amplificación 74
Anexo D: PCR y Electroforesis en gel de agarosa 79
Anexo E: DGGE 80

Índice de tablas

Tabla 1. Tamaño de los fragmentos muestreados de la REMACH…….. 24
Tabla 2. Preparación de las soluciones stock para el gel de poliacrilamida para DGGE.... 35
Tabla 3. Datos de las muestras de los fragmentos de la REMACH……..... 39
Tabla 4. Volúmenes y concentraciones de los reactivos para PCR……... 43
Tabla 5. Temperaturas de annealing para cada muestra del fragmento 12…… 50
Tabla 6. Cuantificación material genético Estación Biológica Bilsa……..... 71
Tabla 7. Cuantificación material genético fragmento 12…….. 71
Tabla 8. Cuantificación material genético fragmento 58…….. 72
Tabla 9. Cuantificación material genético fragmento 63…….. 72
Tabla 10. Cuantificación material genético fragmento 77…… 73
Tabla 11. Cuantificación material genético fragmento 79……..... 73
Tabla 12. Cuantificación material genético posterior a la amplificación fragmento 63… 74

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de la ubicación de la REMACH en la costa ecuatoriana..... 7
Figura 2. Características de los fragmentos de un ecosistema intervenido..... 11
Figura 3. Ubicación de la Estación Biológica Bilsa dentro de la REMACH..... 21
Figura 4. Mapa de fragmentos muestreados de la REMACH..... 22
Figura 5. Transectos de 1 km, muestreo hacia dentro y fuera de los fragmentos..... 23
Figura 6. Extracción del DNA microbiano de las muestras de suelo..... 26
Figura 7. Diagrama de la reacción de amplificación (PCR) del gen 16s rRNA..... 29
Figura 8. PCR con dos pares de primers del gen 16S rRNA (febrero y julio)..... 44
Figura 9. Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento Bilsa..... 44
Figura 10. Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 12..... 45
Figura 11. Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 58..... 45
Figura 12. Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 63..... 46
Figura 13. Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 77..... 46
Figura 14. Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 79..... 47
Figura 15. PCR con los primers rpoB..... 48
Figura 16. Corrida electroforética de los tres pares de primers..... 48
Figura 17. PCR nuevos primers gen 16S rRNA sin gradiente de temperatura en el annealing..... 49
Figura 18. PCR nuevos primers gen 16S rRNA con gradiente de temperatura en el annealing..... 49
Figura 19. PCR nuevos primers gen 16S rRNA con diferente temperatura de annealing por muestra..... 51
Figura 20. DGGE Estación Biológica Bilsa..... 52
Figura 21. DGGE fragmento 58..... 53
Figura 22. DGGE fragmento 79..... 54
Figura 23. Secuencia de la alineación de las regiones conservadas del gen SSU rRNA para diversos organismos (bacterias y Eukarya)..... 55
Figura 24. Estación Biológica Bilsa..... 74
Figura 25. Fragmento 12..... 75
Figura 26. Fragmento 58..... 75
Figura 27. Fragmento 63..... 76
Figura 28.Fragmento 77..... 76
Figura 29. Fragmento 79..... 77
Figura 30. DGGE Estación Biológica Bilsa..... 77
Figura 31. DGGE Fragmento 58..... 78

Figura 32. DGGE Fragmento 79……... 78
Figura 33. Cargamiento de muestras en el gel……... 79
Figura 34. Primers 338F y 518R……... 79
Figura 35. Muestras cargadas para el DGGE…… 80
Figura 36. Corrida electroforética DGGE……. 80

Resumen

Actualmente, la deforestación es la principal causa de la pérdida de biodiversidad de los ecosistemas. En el Ecuador se pierden cerca de 137000 ha de bosque cada año por esta razón. La Reserva Ecológica Mache-Chindul (REMACH), uno de los *hotspots* del planeta (territorio con alta biodiversidad pero que se encuentra amenazada) fue establecida con poblaciones ancestrales que hasta el día de hoy la habitan, subsistiendo a través de la producción maderera, la agricultura y la caza, lo que provoca la fragmentación del bosque. Este trabajo estuvo enmarcado en "conocer y comparar la composición de las comunidades bacterianas del suelo de fragmentos de bosque de la Reserva Ecológica Mache-Chindul con diferente grado de intervención antropogénica". Se aplicaron técnicas moleculares y *fingerprinting* que permitieron la amplificación del material genético y su posterior análisis para la obtención de la huella genética de los microorganismos presentes en la muestra. La pertinencia de este estudio se basa en que la biósfera está dominada por microorganismos, los cuales constituyen el 60% de la biomasa terrestre, por lo que aportan significativamente a la cadena trófica y la diversidad; y ejercen un rol crítico en el control de los ciclos biogeoquímicos globales influyendo de manera directa o indirecta en todas las formas de vida sobre la Tierra.

Palabras clave: Reserva Ecológica Mache-Chindul, comunidades bacterianas, suelo, intervención antropogénica, Ecuador, DGGE.

Abstract

Currently, deforestation is the main cause of loss of ecosystems' biodiversity. In Ecuador, about 137000 forest hectares are lost every year for this reason. Mache-Chindul Ecological Reserve (REMACH), one of the hotspots of the planet (territory with high biodiversity but under threat) was established with ancestral populations that live there until today, subsisting through timber production, agriculture and hunting, causing forest fragmentation. This study focused in "know and compare the composition of soil bacterial communities from Mache-Chindul Ecological Reserve's forest fragments". Molecular and fingerprinting techniques were applied to amplify the genetic material and its further analysis to obtain the genetic fingerprint of the entire sample. The relevance of this study is based on that the biosphere is dominated by microorganisms, they constitute the 60% of the earth's biomass, thus significantly contribute to the trophic chain and diversity; and play a critical role controlling global biogeochemical cycles, which influence directly or indirectly in all forms of life on Earth.

Key words: Mache-Chindul Ecological Reserve, bacterial communities, soil, anthropogenic intervention, Ecuador, DGGE.

Símbolos y abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APS	Ammonium Persulfate
ARN	Ácido Ribonucleico
EBB	Estación Biológica Bilsa
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
MPM	Marcador de Peso Molecular
PCR	Polymerase Chain Reaction
RBL	Reserva Biológica Limoncocha
REMACH	Reserva Ecológica Mache – Chindul
rpoB1698f	Primer rpoB1698 forward
rpoB2041r	Primer rpoB2041 reverse
rRNA	Ribosomal Ribonucleic acid
SSU	Small Subunit
TAE	Tris, Ácido acético, EDTA
TBE	Tris, Ácido bórico, EDTA
338F	Primer 338 Forward
518R	Primer 518 Reverse

Capítulo I

Introducción

1.1. Descripción del tema a desarrollar

La deforestación es hoy en día la principal causa que pone en riesgo la conservación de los hábitats y se relaciona directamente con la pérdida de diversidad biológica a grandes escalas. Según la FAO (2010), los bosques cubren el 31% de la superficie terrestre (4000 millones de hectáreas), sin embargo, anualmente desaparecen 13 millones de hectáreas en todo el mundo y cerca de 4,3 millones en Sudamérica (González, Tapia, & Valdivieso, 2009).

La zona biogeográfica del Chocó en América es un *hotspot* o punto caliente de biodiversidad del planeta (territorio con alta biodiversidad pero que se encuentra amenazada), constituido por bosque húmedo tropical que combina niveles excepcionalmente altos de diversidad, endemismo y amenazas para la mayoría de especies que lo habitan. Se extiende desde la costa del Pacífico colombiana y el suroeste de Panamá hasta el noroeste de Ecuador (Jongsma, Hedley, Durães, & Karubian, 2014).

Si bien el Ecuador posee un territorio pequeño comparado con otros países de América del Sur, la gran diversidad biológica existente lo ha convertido en uno de los países más ricos en lo que a ecosistemas diversos, especies y recursos genéticos se refiere. Estas razones han contribuido para que forme parte de un grupo de naciones denominadas mega diversas, por poseer el 70% de las especies animales y vegetales del planeta (Herrera, Elao & Ecocostas, 2007).

Las áreas con mayor número de especies endémicas de flora y fauna dentro del país, son los bosques húmedos del Chocó y los bosques secos de la región de Tumbes-Manabí. Esta diversidad se ve influenciada por la corriente fría de Humboldt y la Corriente Cálida Tropical (Jongsma et al., 2014).

Dentro del Chocó, se encuentra la cordillera Mache-Chindul; buena parte de esta cordillera se ubica en la Reserva Ecológica Mache-Chindul (REMACH). Con una extensión de 121376 ha entre las Provincias de Manabí y Esmeraldas, la REMACH cubre uno de los pocos bosques húmedos remanentes y secos tropicales del Ecuador. Dentro de la Reserva, se encuentra la Estación Biológica Bilsa (EBB) que abarca 3000 ha y es manejada por la Fundación Jatun Sacha (Carrasco, Cook, & Karubian, 2008; Herrera & Elao, 2007).

La Reserva es una de las 33 áreas naturales que conforman el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), administrado por el Estado Ecuatoriano a través del Ministerio del Ambiente (MAE) (Herrera et al., 2007).

El área protegida se estableció en 1996, año en el que el entorno económico del país no facilitó la resolución, teniendo en consecuencia el total rechazo de la población a la administración del territorio. Los pueblos ancestrales como los Chachi, el pueblo afroecuatoriano y los colonos (grupo de personas de distintas provincias, principalmente de Manabí) continúan viviendo en la REMACH hasta el día de hoy.

Estas poblaciones viven de la agricultura de subsistencia y de la caza, aunque existen también, grupos interesados en la tala de los bosques para comercializar la madera; por lo que la mayor parte de la cobertura vegetal original ha sido modificada y sólo quedan remanentes de bosque natural que ocupan el 46,86% del total del territorio.

> En el Ecuador, la cobertura vegetal se estima en 11,5 millones de hectáreas, hasta el año 1962 el 58% de la superficie del país se encontraba cubierta por bosques naturales (15,6 millones de hectáreas). No obstante, cuando se habla de deforestación, nuestro país ostenta la tasa más alta a nivel de Sudamérica, pues cada año se pierden cerca de 137000 hectáreas (equivalentes al 1,2%) (González et al., 2009).

Estas acciones provocan la fragmentación del ecosistema. Como resultado, los flujos de radiación, viento, agua y nutrientes son alterados significativamente; afectando a la biota y microbiota del lugar, especialmente en los bordes de la matriz o cerca de ellos. Estos efectos varían con el tiempo desde que se registra la fragmentación, por la distancia respecto a otros fragmentos y el grado de conectividad entre sí (Saunders, Hobbs & Margules, 1991).

Debido a estas razones, el presente trabajo investigó los impactos causados por la actividad antropogénica sobre la biodiversidad de la microbiota de la REMACH, llevando a cabo un estudio comparativo de las comunidades de bacterias que habitan el suelo del bosque, de los fragmentos de bosque y la matriz que los rodea.

Estudios del gen 16S rDNA de muestras ambientales mostraron que el 99% de todas las especies de bacterias de diferentes ecosistemas no son cultivables (Bunge, Willis, & Walsh, 2014). Ésto se evidencia desde la perspectiva de las limitaciones actuales que el conocimiento humano tiene sobre estos microorganismos. El principal problema se debe a que la microscopía y los medios de cultivo tienen una utilidad limitada: las especies bacterianas tienen morfologías similares simples, algunas son tan pequeñas que no se las distingue al microscopio y los medios de cultivo no logran recrear las condiciones adecuadas para el crecimiento de todas las especies presentes en la muestra.

La técnica de PCR-DGGE, una técnica independiente de los medios de cultivo, permitió amplificar las secuencias de DNA y establecer diferencias entre comunidades bacterianas en términos de bandas (presencia/ausencia), ya que usa marcadores moleculares, separa fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos y crea un gradiente desnaturalizante de urea-formamida en el gel (Fernández & Le Borgne, 1987).

Uno de estos marcadores moleculares es el gen 16S rRNA. El gen 16S rRNA es una sección del material genético procarionte que por lo tanto, está presente en todas las bacterias y arqueas. Este gen codifica rRNA que forma parte del ribosoma. El ribosoma está constituido de dos subunidades: la subunidad larga (LSU) 50S y la subunidad pequeña (SSU) 30S. Estas dos subunidades rodean al mRNA durante el proceso de traducción del material genético.

Dicho gen es un componente de la subunidad 30S del ribosoma procariota. Su uso en estudios de filogenia bacteriana y taxonomía ha sido de lejos el más común debido a que está presente en todas las bacterias, es una secuencia que se ha mantenido bastante uniforme a lo largo de la evolución, viéndose claramente las diferencias entre los distintos microorganismos y a que es suficientemente largo (1500pb) para propósitos informáticos (Janda & Abbott, 2007).

La secuenciación del rRNA es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas debido a que el gen 16S rRNA contiene regiones altamente variables además de las altamente conservadas; usualmente es posible encontrar secuencias de 20 a 30 pares de bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias (Herrera, n.d.).

1.2. Antecedentes

Según la Guía del Patrimonio de Áreas Naturales Protegidas del Ecuador (2007), la Reserva Ecológica Mache-Chindul protege uno de los últimos remanentes de bosque húmedo y seco tropical de la costa ecuatoriana, y tal vez del mundo. Además, una de sus lagunas, la laguna de Cube, fue declarada como un humedal de importancia mundial en 2001. En cuanto a su flora, se han inventariado 1434 especies, distribuidas en 624 géneros y 149 familias. De estos registros, el 8% (111 especies) corresponde a especies endémicas; la mayoría presenta alguna categoría de amenaza.

Respecto a su fauna, el Programa de Evaluaciones Biológicas Rápidas (1992 y 2003), determinó la existencia de 136 especies de mamíferos, 491 de aves, 54 de anfibios y 38 de reptiles. Un hecho sobresaliente es que la Reserva reúne aves del subtrópico, de los bosques montanos húmedos y de la ecorregión del Chocó.

Todo el territorio de la REMACH se encuentra en propiedad privada. Según el Plan de Manejo de la Reserva (2010), existen 6466 habitantes dentro de este territorio entre afroesmeraldeños, chachis y colonos. Fue establecida con un gran número de centros poblados que ya se encontraban al interior de la misma y otros en proceso de consolidación. En consecuencia, y con el pasar del tiempo, ha habido una progresiva ampliación de la frontera agrícola, disminución de la productividad y aumento de la extracción ilegal de la madera, haciendo que sus bosques estén entre los más amenazados del Ecuador occidental.

Un caso parecido se presentó en la Amazonía brasileña, donde Borneman & Triplett (1997), analizaron las comunidades microbianas de un suelo de bosque y un suelo de pastizal de esta región a través de la secuencia SSU rDNA.

Nusslein & Tiedje (1999), analizaron las comunidades microbianas de los suelos fragmentados de Hawaii mediante tres métodos.

En 2007; Fierer, Bradford, & Jackson analizaron seis *phyla* de bacterias en suelos a lo largo de Estados Unidos, con el objetivo de llegar a conocer la ecología del grupo de microorganismos en cuestión.

Ecuador no tiene estudios a profundidad de sus comunidades de bacterias en suelos. Veintimilla (2014), realizó el estudio de la estructura de comunidades bacterianas de los ecosistemas prístinos de la Reserva Biológica Limoncocha (RBL), mientras que Torres (2014),

realizó el estudio de la estructura de las comunidades bacterianas de los ecosistemas con intervención antropogénica de la RBL.

1.3. Importancia del estudio

Los ecosistemas son el eje que soporta la vida en la Tierra; desde sus más pequeños y menos desarrollados seres vivos, hasta los más grandes y desarrollados, como es el caso del ser humano, dependen de su equilibrio y sostenibilidad.

La biósfera está dominada por microorganismos, constituyen el 60% de la biomasa terrestre. Actúan como componentes esenciales de la biota de la Tierra y representan una gran reserva, aún inexplorada, de diversidad genética.

Son piezas clave dentro de los procesos ecológicos ya que desempeñan un papel fundamental en el ciclo de desarrollo, conservación y regeneración de los ecosistemas. Su aporte a la cadena trófica y a la diversidad a través de la fijación de nitrógeno, carbono, fósforo, azufre; producción y reciclaje de nutrientes; formación de la estructura del suelo; descomposición de la materia orgánica y xenobióticos, ha hecho de estos organismos microscópicos la base de la estructura evolutiva de la vida sobre la Tierra.

Es por ello, que ejercen un rol crítico en el control de los ciclos biogeoquímicos globales e influyen de manera directa o indirecta en todas las formas de vida existentes en el planeta (Nusslein & Tiedje, 1999).

Cuando un ecosistema es intervenido por acción humana, su diversidad depende de las adaptaciones que desarrollen cada uno de los organismos que lo habitan para adecuarse a las condiciones ambientales particulares que se presenten.

La intervención antropogénica puede tener potenciales efectos directos e indirectos sobre las comunidades de bacterias que habitan el suelo, sin embargo, la dirección y magnitud de la respuesta es incierta (Castro, Classen, Austin, Norby, & Schadt, 2010).

No obstante, el estudiar y comparar las especies de flora y fauna de los lugares más diversos de la Tierra ha sido una situación recurrente en las últimas décadas a nivel mundial, mientras que, el conocimiento e interés de cada país acerca de las comunidades de bacterias que habitan su territorio es nulo, como es el caso de Ecuador.

Finalmente, el entendimiento de las dinámicas microbianas y su interacción con los factores bióticos y abióticos del sistema es indispensable para la mejora de técnicas de bioremediación, generación de energía y el avance de industrias biotecnológicas como la farmacéutica, alimenticia y química.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- 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.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar el cambio en la composición de las comunidades bacterianas de acuerdo con el efecto de borde en fragmentos de bosque de la Reserva Ecológica Mache-Chindul con diferente grado de intervención antropogénica.

- Identificar molecularmente los taxones más representativos de fragmentos de bosque de la Reserva Ecológica Mache-Chindul con diferente grado de intervención antropogénica.

- Determinar la relación entre la composición de las comunidades bacterianas de fragmentos de bosque de la Reserva Ecológica Mache-Chindul con diferente grado de intervención antropogénica y los factores fisicoquímicos del suelo.

1.5. Características del sitio del proyecto

La Reserva Ecológica Mache-Chindul es un área protegida ubicada en la costa Pacífica norte de Ecuador, que se extiende entre las provincias de Esmeraldas (Quinindé, Atacames, Muisne y Esmeraldas) y Manabí (Pedernales) (Herrera et al., 2007).

Figura 1. Mapa de la ubicación de la REMACH en la costa ecuatoriana

Fuente: Rivera, 2007

Es una de las regiones más húmedas de la Tierra, con precipitaciones y temperaturas que varían poco durante el año. Recibe en promedio 2000-3000mm de lluvia al año (9 meses de lluvia al año), la temperatura varía en un rango de 18°C a 36°C (MAE, 2012). La estación seca comienza en julio y termina en diciembre, y la estación húmeda se extiende desde enero hasta junio. La altura mínima que alcanza es 200 msnm y la máxima es 800 msnm (Jongsma et al., 2014).

En el área montañosa de la REMACH, el clima es tropical húmedo con un verano predominante; en las partes más bajas o zonas de influencia como Chindul-Cojimíes, se distinguen dos ecosistemas: el bosque manglar y el bosque húmedo tropical (Herrera et al., 2007).

En la cordillera costanera nacen numerosas quebradas y esteros que alimentan importantes redes hidrográficas de la Reserva, como: Dógola, Teaone, Muisne y Cojimíes, las cuales sirven de sustento a las poblaciones en la zona de amortiguamiento (Rivera, 2007).

Si se consideran las diferencias de temperatura y pluviosidad de cada área se distinguen dos zonas bioclimáticas: 1) Bosque siempre verde y 2) Bosque seco (Herrera et al., 2007).

Aproximadamente dos tercios de la Estación Biológica Bilsa son bosque primario y un tercio es bosque secundario, el cual fue talado 20-30 años atrás; desde entonces se ha estado regenerando (Jongsma et al., 2014).

La Reserva encierra una extensa zona de bosque que ha sido tradicionalmente el hogar de comunidades Chachi, afroesmeraldeñas y colonos (Rivera, 2007). Los remanentes más importantes, por superficie y estado de conservación, se encuentran en territorio Chachi, en la Estación Biológica Bilsa y en la zona de Muisne y Galeras (Herrera et al., 2007).

Las comunidades indígenas Chachi, localizadas en el área central de la Reserva, llegaron entre los años 30 y 40 del siglo pasado con el auge de la explotación del caucho, provenientes de la provincia de Esmeraldas, mientras que los colonos llegaron a la Reserva con la primera reforma agraria en los años setenta (Herrera et al., 2007).

La población afroecuatoriana es considerada parte de la población ancestral de la Reserva. Los pueblos negros de cada zona forman gremios junto con la población colona.

Actualmente, la actividad que sostiene la economía familiar de toda la Reserva sigue siendo la forestal, debido a que otras actividades como la agrícola o la pecuaria representan ganancias menores. Tras la declaración de la Reserva, la explotación maderera ha disminuido en algunas

zonas, sin embargo la tala continúa dándose ilegalmente en las áreas de Muisne y Pedernales (Morcillo, Intriago, & Pincay, 2010).

La actividad agrícola es la segunda en orden de importancia. Aunque los suelos de la mayor parte de la Reserva no son aptos para la agricultura, en todas las zonas se mantienen cultivos destinados al consumo familiar y mercado local. Los usos del suelo más importantes son: 38% bosque, 32% pastos, 22% cacao, 4% banano, 1,4% maíz, 1,3% palma africana, 0,6% plátano y 0,3% arroz. La actividad pecuaria está representada por la crianza de ganado menor (cerdos y aves), y constituye también un importante rubro en la economía familiar (Morcillo et al., 2010).

Capítulo II

Marco teórico

2.1. Estado actual del conocimiento científico

Las bacterias constituyen el 60% de la biomasa terrestre, son los organismos más abundantes del planeta. Son ubicuas ya que habitan todos los ecosistemas terrestres y acuáticos, incluyendo ambientes extremos como fuentes hidrotermales, ambientes ácidos, desechos radioactivos, las profundidades del mar y la corteza terrestre, por lo que son ricos depósitos de genes de interés potencial para el ser humano.

Los avances recientes en ciencia y tecnología han hecho que la identificación de los microbios no cultivables y la explotación de sus compuestos metabólicos, sean propuestas más asequibles. Vectores de expresión mejorados y la metagenómica, un conjunto de técnicas *fingerprinting*, hacen más fácil identificar dichos genes (Santero, Floriano, & Govantes, 2016).

Es así que, desde que la técnica PCR-DGGE fue adoptada por los ecólogos microbianos para el análisis de la estructura y dinámica de las comunidades bacterianas, se han realizado una amplia gama de estudios sobre bacterias del suelo.

El suelo es, probablemente, el más difícil de todos los entornos naturales para los microbiólogos, con respecto al tamaño de la comunidad microbiana y la diversidad de especies presentes. Un gramo de suelo forestal contiene un estimado de $4x10^7$ células procariotas, mientras que un gramo de suelos y praderas cultivadas contiene un estimado de $2x10^9$ células procariotas (Daniel, 2005).

Según Bustamante & Grez (1995), los bosques nativos son los ecosistemas que han sufrido un mayor grado de fragmentación. La fragmentación es la transformación de un bosque continuo en unidades más pequeñas y aisladas entre sí, cuya área resultante es mucho menor que la del

bosque original. Esta fragmentación se da debido a actividades antropogénicas como la tala de los bosques para la crianza de ganado y pastoreo, agricultura de subsistencia y mercado, interés comercial en la madera, entre otras. Por lo tanto, es un fenómeno que ha congregado gran atención por sus implicaciones en la conservación de la biodiversidad.

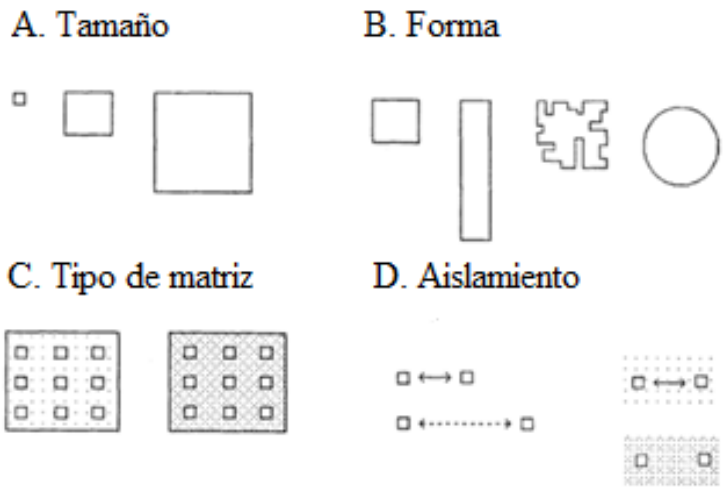
Un bosque fragmentado puede ser descrito por atributos como número de fragmentos, tamaño, forma y grado de aislamiento. El tipo de matriz que los rodea también es un factor importante a considerar. Los fragmentos pueden estar rodeados de vegetación secundaria, cultivos, asentamientos humanos y vías de acceso. Fragmentos pequeños tienen una relación perímetro/área mayor que fragmentos grandes, lo cual significa una mayor influencia de la matriz circundante.

El conjunto de efectos de la matriz sobre un fragmento se conoce como efecto de borde, el cual se puede manifestar con cambios en los factores bióticos y abióticos al interior de un fragmento, principalmente en su perímetro. Este efecto puede llegar a ser drástico si los fragmentos son alargados o con formas irregulares. Esto se debe a que independientemente de su tamaño, los fragmentos irregulares también poseen una relación perímetro/área mayor que los fragmentos más regulares.

Figura 2. Características de los fragmentos de un ecosistema intervenido

Fuente: (Bustamante & Grez, 1995).

Las matrices indicadas con fondo suave en C y D muestran una diferencia ambiental menor entre la matriz y el fragmento. Las matrices indicadas con fondo oscuro en C y D muestran una diferencia ambiental mayor entre la matriz y el fragmento.



Una matriz con estructura similar a la de un fragmento de bosque tendrá una influencia menor en el fragmento que una matriz con estructura muy diferente. Es decir, un fragmento de bosque que está rodeado por otro tipo de vegetación boscosa, sufrirá un efecto de borde menor que otro rodeado por una pradera. En efecto, dos fragmentos pueden estar cercanos en términos de distancia, pero estar funcionalmente aislados si están rodeados por una matriz que impide el intercambio de organismos.

Todos estos atributos en su conjunto conforman el patrón de fragmentación del bosque. Sus efectos sobre la flora y fauna nativa van a depender, además, de las características biológicas de los organismos que habitan los fragmentos. Es así como organismos con una gran capacidad de dispersión, generalistas en el uso de recursos o de hábitats pequeños, se verán menos afectados por la fragmentación que organismos más sedentarios, especialistas o de hábitats grandes.

Por ejemplo, el estudio según Carrasco, Berg, Litz, Cook, & Karubian (2013), acerca de la avifauna en fragmentos de bosque de la Reserva Ecológica Mache-Chindul, registró un total de 360 especies de aves, agrupadas en 263 géneros y 51 familias, siendo la distribución de dichas familias similar a la de los bosques húmedos del neotrópico.

Dentro de este registro, en la Estación Biológica Bilsa, 10 de las 12 aves más comúnmente capturadas en redes de neblina (redes de nylon o poliéster usadas por ornitólogos que se colocan en los distintos ecosistemas para capturar aves con el fin de estudiarlas) fueron colibríes y pequeños frugívoros, mientras que en los fragmentos de bosque alrededor de la EBB, las aves que se alimentan de insectos fueron más comunes (7 de las 12 especies más comunes).

De las 186 especies capturadas en total en las redes de neblina en la REMACH durante este estudio, solo 12 (6,5%) fueron exclusivas de las áreas fuera de la Estación Biológica Bilsa; lo que sugiere que la avifauna de la Reserva fuera de Bilsa, puede ser en gran parte un sub-conjunto de la avifauna que se encuentra anidada en la EBB.

En contraste con estos resultados, el estudio de Cisneros, Delia, Yánez, & Ortega (2010), en la Reserva Ecológica Mache-Chindul, acerca de la rana de cristal *Cochranella mache*, endémica de Ecuador, demostró que esta especie se encuentra en peligro crítico debido a la pérdida de su hábitat natural por intervención antropogénica, siendo prácticamente imposible encontrar estos anfibios en la matriz que rodea los fragmentos, es decir, en los pastizales o cultivos.

Encuestas recientes sobre especies de ranas de cristal simpátricas con *C. mache* indicaron abundancias relativas bajas en comparación con las encuestas realizadas en los años 1970 y 1980.

Estos autores proponen que la disminución de las poblaciones de ranas de cristal en la REMACH, puede ser causada por los cambios de clima locales como consecuencia de la destrucción del bosque.

Al ser las aves animales con más facilidad para migrar, sus poblaciones dentro de la Reserva no se han visto directamente afectadas por la fragmentación de su ecosistema, sin embargo, animales más sedentarios como las ranas sufren el impacto de manera directa, lo que provoca un descenso significativo de sus poblaciones en las zonas afectadas.

En cuanto a microorganismos, la falta de información acerca de bacterias del suelo de la REMACH, y en general de Ecuador, impide tener una idea sobre si las comunidades microbianas son afectadas por la actividad antropogénica o no, y si lo son, de qué manera.

2.1.1. Efectos de la fragmentación sobre los factores abióticos del ecosistema

Los cambios microclimáticos son los efectos más evidentes de la fragmentación de bosques. La existencia de dos tipos de parches ambientales bosque vs matriz, con características microclimáticas contrastantes, produce un gradiente ambiental desde el borde hacia el interior del fragmento. Generalmente, la luminosidad, la evapotranspiración, la temperatura y la velocidad del viento disminuyen, mientras la humedad del suelo aumenta hacia el interior del fragmento. Este efecto de borde puede, en algunos casos, penetrar varias decenas de metros hacia el interior del fragmento y su importancia dependerá del tamaño del mismo: en un fragmento pequeño, este efecto es comparativamente más significativo que en un fragmento grande.

2.1.2. Efectos de la fragmentación sobre los factores bióticos del ecosistema

Las consecuencias directas de la fragmentación son los cambios en la composición y abundancia de especies. Por una parte, la reducción y aislamiento del bosque remanente lleva a una reducción de la población de las especies que habitan el fragmento, ya sea por un aumento de la

mortalidad o las emigraciones de los individuos. Igualmente, las poblaciones pequeñas tienen una mayor probabilidad de extinción local por variaciones aleatorias en su composición genética o bien, por una pérdida de variabilidad genética debida a cruzamientos entre individuos del mismo grupo.

Otro aspecto importante es la facilidad que nuevas especies poseen para invadir el fragmento desde la matriz debido a los cambios microclimáticos que la fragmentación produce. Esta fragmentación afecta, también, aunque indirectamente la intensidad y calidad de las interacciones biológicas como: la polinización, depredación, crecimiento de las plantas, mutualismo y competencia.

Un efecto adicional es la modificación de algunos procesos ecosistémicos. La disminución de la humedad del suelo reduce la actividad microbiana y por ende, la descomposición de la materia orgánica, lo que se traduce a su vez en una reducción de nutrientes en el suelo.

La vegetación es el factor ambiental que se piensa es uno de los determinantes principales de la composición de la comunidad microbiana del suelo, ya que proporciona la fuente principal de componentes para el crecimiento de organismos heterótrofos (Nusslein & Tiedje, 1999).

Debido a que las especies de plantas se componen de diferentes compuestos de carbono, podría esperarse que distintos microorganismos crezcan en el suelo bajo diferentes comunidades vegetales (Nusslein & Tiedje, 1999).

Dentro de los ecosistemas terrestres el principal factor a considerar es el clima, el cual varía de acuerdo a la latitud y altitud de la zona en estudio. Esta variación podría determinar la distribución de los organismos en el territorio, ya que la vegetación, al depender directamente del clima, influye fuertemente en la biota y microbiota del suelo (Odum, 2007).

La REMACH es una zona atravesada por la línea ecuatorial, está limitada por el Océano Pacífico al oeste, donde la corriente fría del Perú desde el sur y la corriente cálida ecuatorial desde el norte se encuentran; y por la cordillera de Los Andes hacia el este. Por todo ello posee características geográficas y oceanográficas responsables de los cambios abruptos en las precipitaciones y temperatura a lo largo de los gradientes latitudinales (norte-sur) y longitudinales (este-oeste) (Carrasco et al., 2013).

Por otro lado, según Lozupone & Knight (2007), la salinidad del suelo es el factor ambiental que más influye en la composición de las comunidades microbianas, en lugar de otras variables como temperatura, pH y demás parámetros fisicoquímicos.

Nusslein & Tiedje (1999), proporcionaron evidencia de que la vegetación tiene una fuerte influencia en la composición de la comunidad microbiana del suelo. Analizaron el cambio en la cobertura vegetal de un suelo de Hawaii desde el bosque a los pastos mediante tres métodos: comparación del contenido de G+C, análisis de la abundancia de filotipos del DNA de la subunidad ribosomal pequeña (SSU rDNA) amplificados a partir de muestras con 35% y 63% de G+C, y análisis filogenético de los amplicones (productos de la PCR) rDNA dominantes en la fracción con 63% de G+C. Los tres métodos demostraron que la vegetación actúa sobre las bacterias del suelo.

El DNA del suelo del bosque mostró un pico de 61% en el contenido de G+C, mientras que el DNA del pastizal mostró un pico de 67%. Ninguno de los filotipos dominantes encontrados en el suelo del bosque, fue detectado en el suelo del pastizal. Demostraron que los géneros más abundantes presentes en el bosque: *Fibrobacter* y *Syntrophomonas* cambiaron a *Burkholderia* y *Rhizobium–Agrobacterium* en el pastizal.

Otro estudio llevado a cabo en la Amazonía brasileña por Borneman & Triplett (1997), analizó las comunidades microbianas de un suelo de bosque y un suelo de pastizal de esta región a través de la secuencia SSU rDNA, ilustrando el impacto que la deforestación causa en esta microbiota y por lo tanto, en el metagenoma. Los resultados indicaron que el 98% de los amplicones fueron de origen bacteriano: el 78% pertenecen al filo bacteria *Planctomyces, Clostridium,* gram positivas con alto porcentaje de G+C, *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides, Fibrobacterium,* y *Proteobacteria.* El 2% de los amplicones pertenecieron al dominio *Archaea, Crenarchaeota*.

La diversidad microbiana encontrada en el suelo de bosque maduro y los pastizales de la Amazonía brasileña fue inmensa. Esta afirmación se soportó en el hecho de que ningún amplicón SSU rDNA se duplicó y ninguno había sido descrito previamente. La deforestación de los bosques tropicales altera muchas propiedades del suelo: causa un incremento en el pH, en el contenido de NH_4^+ (amonio) y en la densidad aparente; así como un decremento en el contenido de NO_3 (nitratos) y la porosidad.

La comparación entre los amplicones SSU rDNA obtenidos de los suelos del bosque y los pastizales muestra diferencias entre los dos lugares. Un número significativo de microorganismos no clasificados se encontraron en el bosque a diferencia del pastizal, además, 18% de las secuencias de los productos de PCR del bosque están relacionadas al género *Clostridium*, mientras que ninguna del pastizal.

Por otro lado, se encontró cuatro veces más secuencias en el pastizal que en el bosque, que fueron relacionadas con el género *Bacillus.* Secuencias de G+C gram positivas fueron encontradas solo en el pastizal.

En 2007; Fierer, Bradford, & Jackson analizaron seis *phyla* de bacterias: Acidobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, α-Proteobacteria, y β-Proteobacteria en suelos a lo largo de Estados Unidos. Su objetivo fue entender la presencia de estos *phyla* en un contexto ecológico: cuáles son los más abundantes y por qué. Fueron escogidos debido a que la mayoría de los taxones de bacterias del suelo, incluso los que son numéricamente dominantes, no han sido ampliamente estudiados y sus características ecológicas se mantienen en gran parte desconocidas.

De las 10 características de suelo y sitio examinadas, la tasa de mineralización con carbono fue el dato que mejor predijo la abundancia de cada grupo. Así, los tres grupos que respondieron a este dato fueron Acidobacteria, β-Proteobacteria y Bacteroidetes. Con el aumento de carbono en el suelo, la abundancia de Acidobacteria disminuyó mientras que la de β-Proteobacteria y Bacteroidetes aumentó. La abundancia de los tres grupos restantes: Firmicutes, Actinobacteria y α-Proteobacteria no pudo ser predicha adecuadamente por la mineralización con carbono, ni por ninguna de las demás variables evaluadas en dicho estudio.

En el Ecuador, Veintimilla (2014) realizó el estudio de la estructura de comunidades bacterianas de los ecosistemas prístinos de la Reserva Biológica Limoncocha, usando como marcador molecular el gen 16S rRNA. Sus resultados mostraron, mediante una comparación gráfica y numérica de las muestras, que dos de las bandas estuvieron presentes en todos los ecosistemas, tanto terrestres como acuáticos; por lo que se las caracterizó como los taxones más representativos de los ecosistemas prístinos de la RBL, con un total de sesenta y cuatro presencias en sesenta y cuatro aislamientos.

Torres (2014), analizó las comunidades de bacterias del suelo de los ecosistemas de bosque secundario, cultivos y bosque cerca de la zona de extracción petrolera; y para los ecosistemas acuáticos, analizó la zona de la laguna cerca de la zona de extracción petrolera en la RBL. Los resultados indicaron la presencia de una banda en todos los ecosistemas tanto acuáticos como terrestres.

Solo una banda apareció en todos los ecosistemas intervenidos antropogénicamente.

Los análisis estadísticos aplicados permitieron sustentar la hipótesis de que las comunidades bacterianas están fuertemente influenciadas por el ecosistema al que pertenecen.

2.2. Marco legal

Considerando que el artículo 14 de la Constitución de la República del Ecuador, señala que se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, sumak kawsay y, se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados, el artículo 405 de la Constitución de la República del Ecuador declara que El Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) garantizará la conservación de la biodiversidad y el mantenimiento de las funciones ecológicas. El Estado asignará los recursos económicos necesarios para la sostenibilidad financiera del sistema y fomentará la participación de las comunidades, pueblos y nacionalidades que han habitado ancestralmente las áreas protegidas en su administración y gestión (MAE, 2012).

La República del Ecuador suscribió, aprobó y ratificó el Convenio de las Naciones Unidas sobre la Diversidad Biológica, según consta en los Registros Oficiales Nos. 28 y 48 del 12 de febrero y 16 de marzo de 1993 (MAE, 2012).

> Conscientes del valor intrínseco de la diversidad biológica y de los valores ecológicos, genéticos, sociales, económicos, científicos, educativos, culturales, recreativos y estéticos de la diversidad biológica y sus componentes, este convenio busca conservar y utilizar de manera sostenible la diversidad biológica en beneficio de las generaciones actuales y futuras (ONU, 1992).

La Ley de Gestión Ambiental del Ecuador (Ley No. 37. RO/ 245 de 30 de Julio de 1999) introdujo de manera oficial la aplicación del concepto de gestión al ámbito de lo ambiental. La gestión de un área protegida constituye el conjunto de políticas, normas, actividades operativas y administrativas de planeamiento, financiamiento y control estrechamente vinculadas, que deben ser ejecutadas por el Estado y la sociedad para garantizar el aprovechamiento sostenible de un área protegida, asegurando su permanencia a largo plazo y dando cumplimiento a los objetivos de su creación (Morcillo et al., 2010).

El Ecuador empezó a trabajar con la Convención RAMSAR desde 1991 con el objetivo de realizar esfuerzos de conservación y manejo de los humedales. Dentro del país existen 13 sitios RAMSAR, que comprenden un total de 201126 hectáreas; esto significa un 0,78% del territorio nacional (MAE, 2012). Dentro de la REMACH, la laguna de Cube fue declarada sitio RAMSAR por la UNESCO en 2002, debido a que posee dos tipos de ecosistemas en una superficie total de 159,7 ha: el ecosistema léntico o zona cubierta con aguas dulces permanentes y el ecosistema del humedal constituido por la zona inundable.

Por la importancia estratégica de estos ecosistemas, RAMSAR declaró prioritario iniciar acciones de conservación en el marco de tres obligaciones específicas: (1) Mantener las condiciones ecológicas de la laguna de Cube, (2) promover el uso racional del humedal y (3) establecer zonas intangibles que aseguren su conservación (Morcillo et al., 2010).

La misión de la Convención es "la conservación y el uso racional de los humedales mediante acciones locales y nacionales y gracias a la cooperación internacional, como contribución al logro de un desarrollo sostenible en todo el mundo" (Convención RAMSAR, 2014).

2.3. Marco conceptual

Técnicas *fingerprinting:* Técnicas moleculares mediante las cuales se obtiene la huella genética de una población.

Metagenómica: Conjunto de técnicas *fingerprinting* independientes del cultivo y medios de cultivo, que se encargan del estudio del material genético de las comunidades microbianas. Envuelve el aislamiento y análisis directo del DNA de muestras ambientales (Santero et al., 2016).

Metagenoma: Colección de genes secuenciados de toda la comunidad bacteriana de una muestra ambiental.

Efecto de borde: Conjunto de cambios que ocurren en los márgenes entre el ecosistema natural y las áreas intervenidas por el hombre (Nava-Cruz, Maass-Moreno, Briones-Villareal, & Mendez-Ramirez, 2007). Se produce cuando hay fragmentación de los ecosistemas.

Fragmentación de ecosistemas: Proceso dinámico por el cual un determinado hábitat se va reduciendo a parches o islas de menor tamaño, formando una matriz de hábitats diferentes al original.

Capítulo III

Metodología

Es preciso mencionar que el presente trabajo de titulación forma parte de un proyecto general entre la Fundación para la Conservación de los Andes Tropicales (FCAT), Ecuador; y la Universidad de Tulane, EEUU; en colaboración con universidades nacionales como la Universidad Central del Ecuador y la Universidad Internacional SEK, Quito.

Dicho proyecto investiga la diversidad de aves, mamíferos terrestres y de dosel, murciélagos, anfibios, coleópteros, abejas de orquídeas, palmas y bacterias del suelo en la Reserva Ecológica Mache - Chindul, con el objetivo de proveer información y capacidad técnica requerida para la apreciación y conservación de sus fragmentos de bosque.

Estas son las razones por las que el muestreo para el análisis de la diversidad de las bacterias del suelo lo realizó Mike Darkes (Universidad de Manchester).

3.1. Metodología de campo

3.1.1. Zona de estudio

El trabajo de campo fue llevado a cabo en la Reserva Ecológica Mache – Chindul, con coordenadas 0°22’N, 79°45’O; ubicada en Ecuador: al suroccidente de la provincia de Esmeraldas y al norte de la provincia de Manabí, sobre la Cordillera Occidental.

Para escoger los fragmentos de bosque a analizar, se delimitó previamente la cobertura vegetal de la REMACH mediante fotografía satelital. Este método mostró diferentes densidades de bosque.

Se escogieron cinco fragmentos ubicados al sureste de la Reserva, debido a que esta parte fue la que mostró un bosque mayormente fragmentado en las fotografías, y uno dentro de la Estación Biológica Bilsa (ubicada también al sureste de la REMACH), para establecer comparaciones con el bosque no fragmentado.

Estos fragmentos fueron nombrados: Bilsa, 12, 58, 63, 77 y 79.

Figura 3. Ubicación de la Estación Biológica Bilsa dentro de la REMACH.

Fuente: Jongsma et al., 2014

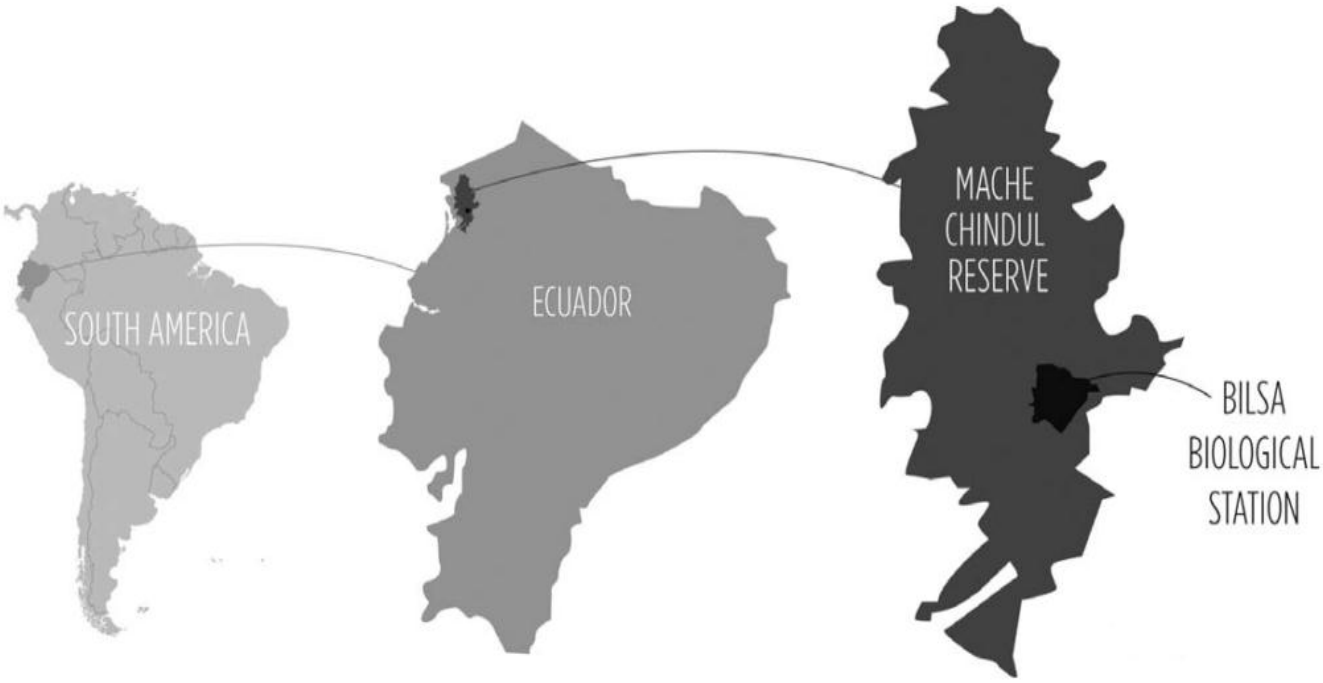
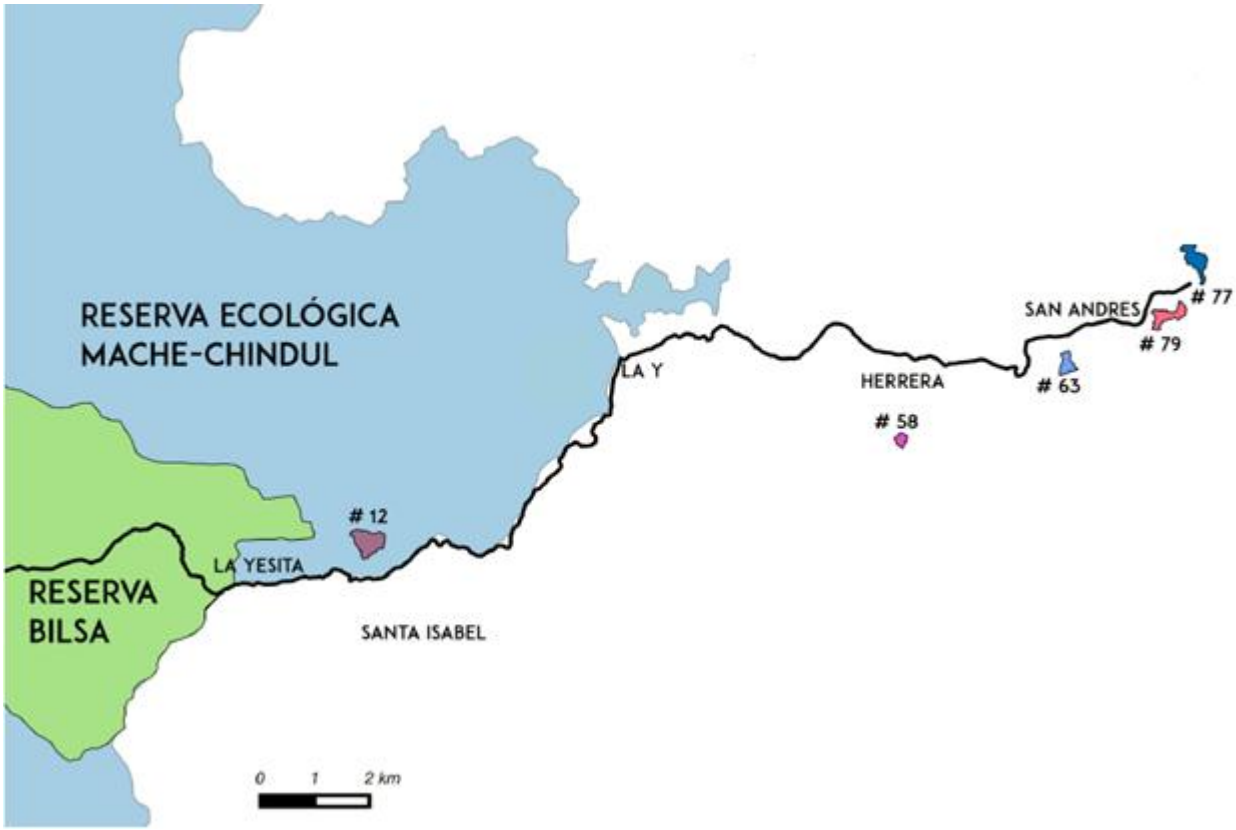


Figura 4. Mapa de fragmentos muestreados de la REMACH

Fuente: Jarrín, 2014

La Estación Biológica Bilsa representa bosque no fragmentado, el fragmento 12 representa bosque conservado. Los fragmentos 58 y 63 representan bosque medianamente conservado y los fragmentos 77 y 79 representan bosque no conservado.



3.1.2. Muestreo

La recolección se realizó en la estación seca, durante los meses de agosto a diciembre de 2014. Se recolectaron 10 muestras por cada fragmento de bosque, haciendo transectos de 1 km, con 500 m fuera del fragmento (es decir en la matriz o pastizal) y 500 m dentro del fragmento, colectando así muestras cada 100 m. Sin embargo, existieron algunas dificultades en el fragmento 63 debido a la posesión del terreno correspondiente a los pobladores de la Reserva, lo que llevó a

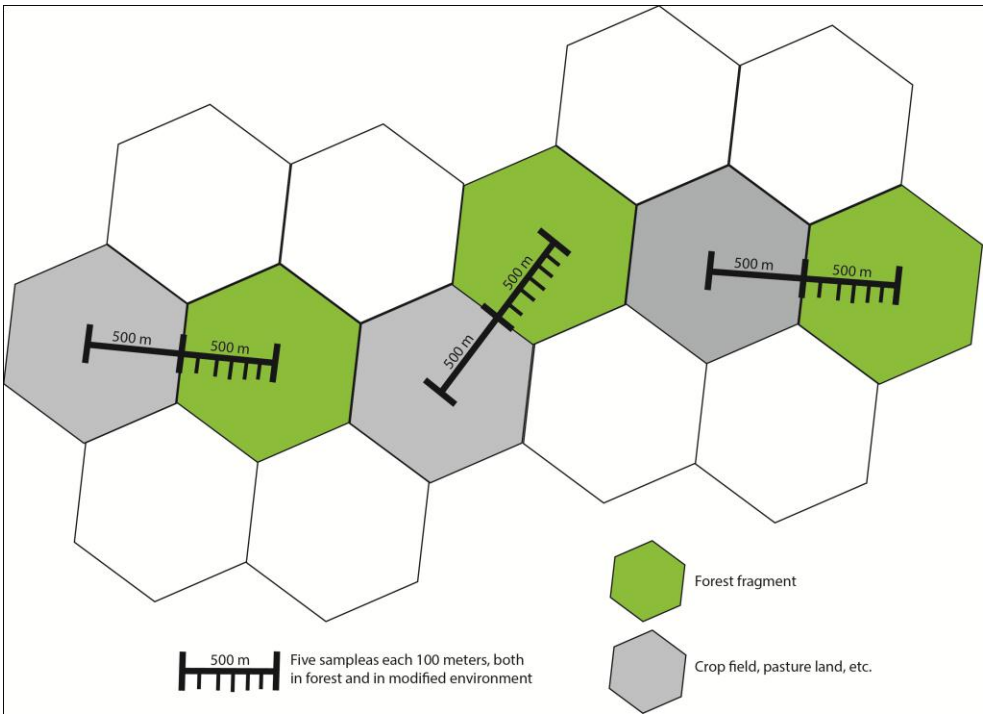
que en dicho fragmento solo se colecten 9 muestras. El total de muestras con las que se trabajó fue 59.

El desarrollo de un esquema de muestreo que represente la variabilidad inherente y el valor verdadero de la media de la población en la química del suelo del bosque puede requerir muchos puntos de muestreo. El cálculo del tamaño de la muestra es importante porque un tamaño de muestra que es demasiado grande conduce a una pérdida de tiempo, de recursos humanos y de dinero; mientras que un tamaño de muestra que es demasiado pequeño conduce a un análisis estadístico erróneo (Bélanger & Van Rees, 2006).

La regla general para el muestreo de suelo de bosques según Bélanger & Van Rees (2006), menciona que cuanto mayor sea la superficie muestreada, mayores son las oportunidades de reducir la variabilidad de la muestra una vez que esté seca por acción del viento; limpia de raíces y material leñoso; y mezclada en el laboratorio. Por consiguiente, se recomienda aplicar un muestreo que cubra al menos $200\ cm^2$ de terreno.

Figura 5: Transectos de 1 km, muestreo hacia dentro y fuera de los fragmentos

Fuente: Jarrín, 2014



3.1.3. Técnica de muestreo

Existen dos técnicas generalmente aceptadas para la toma de muestras de suelo de bosque: nucleadores y cuadrículas (Bélanger & Van Rees, 2006).

Para el muestreo que se realizó en la REMACH se usó la técnica de los nucleadores.

En neplos de 10 a 15 cm con tapa rosca autoclavados y con un martillo esterilizado, se recogió la tierra superficial de los fragmentos después de retirar la hojarasca del sitio de interés, introduciendo el neplo de forma perpendicular al suelo y golpeándolo una vez con el martillo. Se recogieron muestras superficiales debido a que en las primeras capas de suelo existe materia orgánica en proceso de degradación, proporcionando una alta cantidad de nutrientes. Consecuentemente, la mayor actividad bacteriana se encuentra en los primeros 15 cm de suelo (Alef & Nannipieri, 2007).

Una vez tomadas las muestras, se taparon los neplos, se etiquetaron con su respectivo nombre y número, se almacenaron en fundas *ziploc* y se mantuvieron a 4°C. Al llegar al laboratorio se las guardó a -20°C para preservar el ADN.

El tamaño de los fragmentos se definió de la siguiente manera:

Tabla 1. Tamaño de los fragmentos muestreados de la REMACH

Fuente: Olivo, González, Browne, Walter, & Karubian, 2015

Tamaño del fragmento	Hectáreas
Pequeño	2 a 10
Mediano	10 a 25
Grande	> 25

3.2. Metodología de laboratorio

3.2.1. Extracción del ADN total bacteriano

La extracción del ADN total bacteriano se realizó por medio del protocolo de extracción de ADN genómico del PowerSoil® DNA Isolation Kit de MoBio Laboratories para muestras ambientales. El procedimiento se detalla a continuación:

Se añadieron 0,25g de la muestra a los *Powerbead tubes* y se homogenizó durante tres segundos. Estos tubos contienen buffer que ayuda a disolver los ácidos húmicos del suelo y protege a los ácidos nucleicos de la degradación. Se añadieron 60 μL de solución C1 y se homogenizó brevemente. Se colocaron los tubos en sentido horizontal sobre la almohadilla del vortex con cinta adhesiva y se los homogenizó a máxima velocidad durante 10 minutos. La solución C1 contiene SDS y otros agentes disruptores que ayudan al proceso de lisis celular.

Se centrifugaron los tubos a 10000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a los tubos de 2 mL proporcionados por el kit. Se añadieron 250 μL de solución C2, la cual contiene agentes que precipitan todo material orgánico e inorgánico que no sea ADN, y se homogenizaron los tubos durante cinco segundos. Se incubaron estas muestras a 4°C por cinco minutos. Se centrifugaron los tubos a 10000 g durante un minuto a temperatura ambiente, y evitando el pellet, se transfirieron 600 μL de sobrenadante a otro tubo de 2 mL (nuevo). Se añadieron 200 μL de solución C3 y se homogenizó brevemente, se incubaron los tubos a 4°C por cinco minutos y se centrifugaron a 10000 g durante un minuto a temperatura ambiente, se transfirieron 750 μL de sobrenadante a un tubo de 2 mL (nuevo). Se añadió 1,2 mL de solución C4 y se homogenizó durante cinco segundos. Esta solución tiene una alta concentración de sales, lo que permitirá que el ADN se una a la membrana de sílice en el siguiente paso.

Se cargaron 675 μL en un *spin filter* y se centrifugó a 10000 g durante un minuto a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante que traspasó el filtro o membrana y se añadió otros 675 μL de sobrenadante al *spin filter* para centrifugar a 10000 g durante un minuto a temperatura ambiente. Se cargó el sobrenadante restante en el *spin filter* y se centrifugó bajo las mismas condiciones.

Se añadieron 500 μL de solución C5 para lavar el ADN unido a la membrana y se centrifugó a 10000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Inmediatamente se descartó el sobrenadante que atravesó la membrana y se centrifugó a 10000 g durante un minuto a temperatura ambiente. Se colocó cuidadosamente el *spin filter* en un tubo de 2 mL (nuevo) y se añadió 100 μL de solución C6 al centro del filtro para eluir el ADN y se centrifugó a 10000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Finalmente se descartó el *spin filter* y el ADN en el tubo estuvo listo para usarse en procesos downstream.

Los tubos con el material genético se almacenaron a -20°C.

Figura 6. Extracción del ADN microbiano de las muestras de suelo

Fuente: MoBio Laboratories, 2015

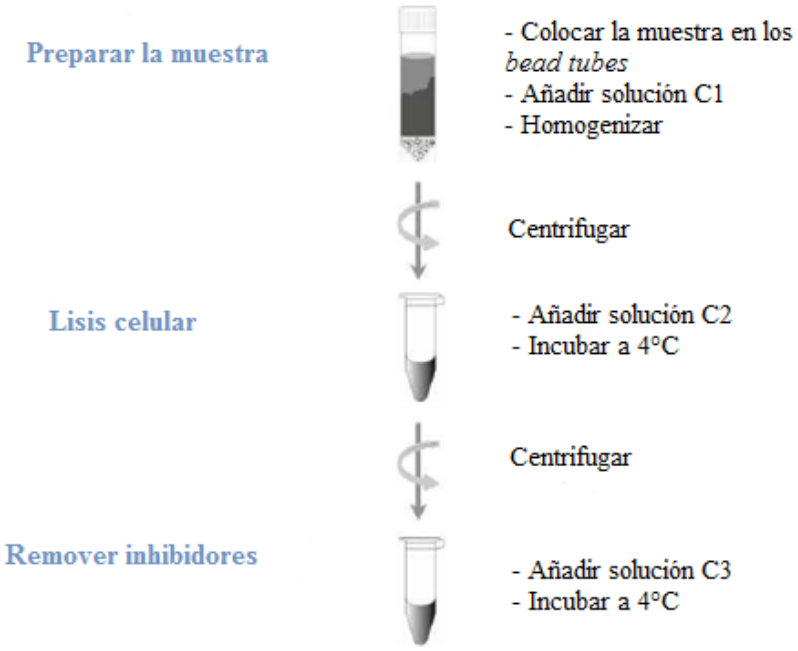
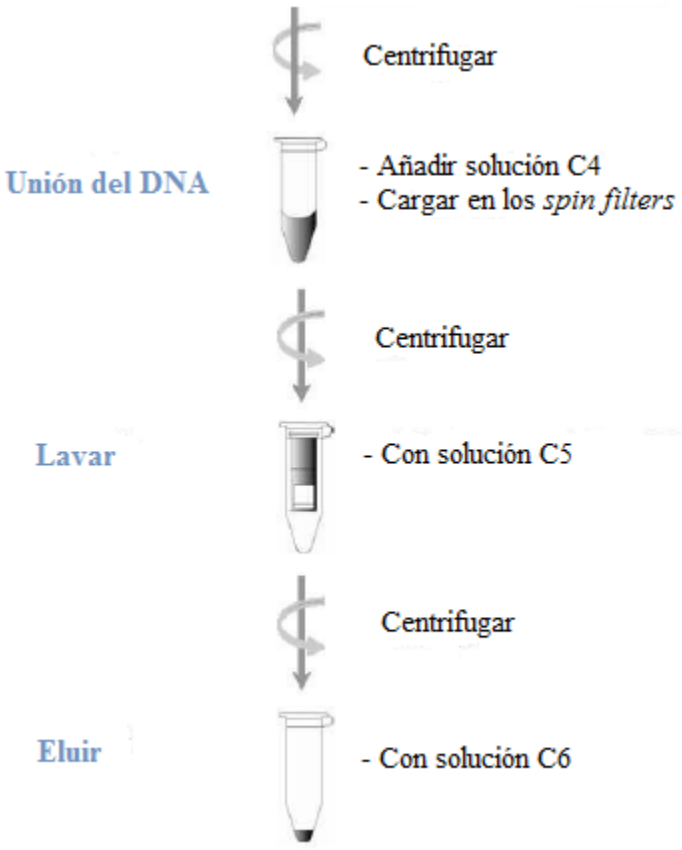


Figura 6. (Cont.)

Fuente: MoBio Laboratories, 2015



3.2.2. Cuantificación del material genético

Para comprobar la existencia de material genético posterior a su extracción, se cuantificó el ADN mediante espectrofotometría utilizando el NanoDrop 2000 de Thermo Scientific.

Se inició el programa del Nanodrop 2000 en la computadora y se limpió el brazo del equipo y la base donde se asienta dicho brazo con papel absorbente seco. Para dejar en blanco al equipo, se cogió 2 µL de agua ultrapura, se colocaron en la base limpia y se bajó el brazo. Una vez en blanco, se repitió el proceso de limpieza y se cogió 1 µL de la muestra de ADN, se colocó en la

base limpia, se bajó el brazo y se realizó la cuantificación. Este proceso se repitió para las 59 muestras.

3.2.3. Amplificación del material genético mediante PCR

Los primers para la amplificación del ADN de este tipo de estudios idealmente deben apuntar a la mayoría de taxones de bacterias. Además, los amplicones resultantes necesitan tener una longitud adecuada para posteriores análisis, y la secuencia de ADN de la región amplificada debe proveer información filogenética y de diversidad microbiana (Bakke, De Schryver, Boon, & Vadstein, 2011).

Típicamente se utilizan fragmentos del gen 16S rRNA de la subunidad ribosomal pequeña o SSU rRNA. En dicho gen, dos regiones conservadas alrededor de las posiciones 320-355 (primer 338F; 5′-actcctacgggaggcagcag-3′); y 505-535 (primer 518R; 5′-attaccgcggctgctgg-3′) correspondientes a *Escherichia coli*, se han usado extensamente para generar productos de PCR para el análisis mediante DGGE. Estos primers amplifican de manera eficiente un fragmento de aproximadamente 200 pb para la mayoría de taxones de bacterias (Bakke *et al.*, 2011).

Los genes bacterianos del 16S rRNA contienen nueve regiones hipervariables (V1 – V9), las que demuestran diversidad considerable entre las especies de bacterias.

Según Chakravorty, Helb, Burday, Connell, & Alland (2007), las regiones V2 y V3 son las más adecuadas para distinguir todas las especies bacterianas a nivel de género. Los primers 338F y 518R amplifican la región V3 del 16S rRNA (Park & Crowley, 2005).

El primer 338F tuvo una grapa GC para evitar que las moléculas de ADN se desnaturalicen por completo, con el objetivo de obtener una resolución óptima en el gel de poliacrilamida resultante del DGGE.

Para el presente trabajo existieron dos pares de primers del gen 16S rRNA (338F y 518R), el primer par sintetizado por Invitrogen en febrero de 2013 y el segundo sintetizado por Invitrogen en julio de 2013, por lo que se hizo una primera PCR como prueba usando los dos pares de primers con el objetivo de determinar cuáles serían los más adecuados para el estudio.

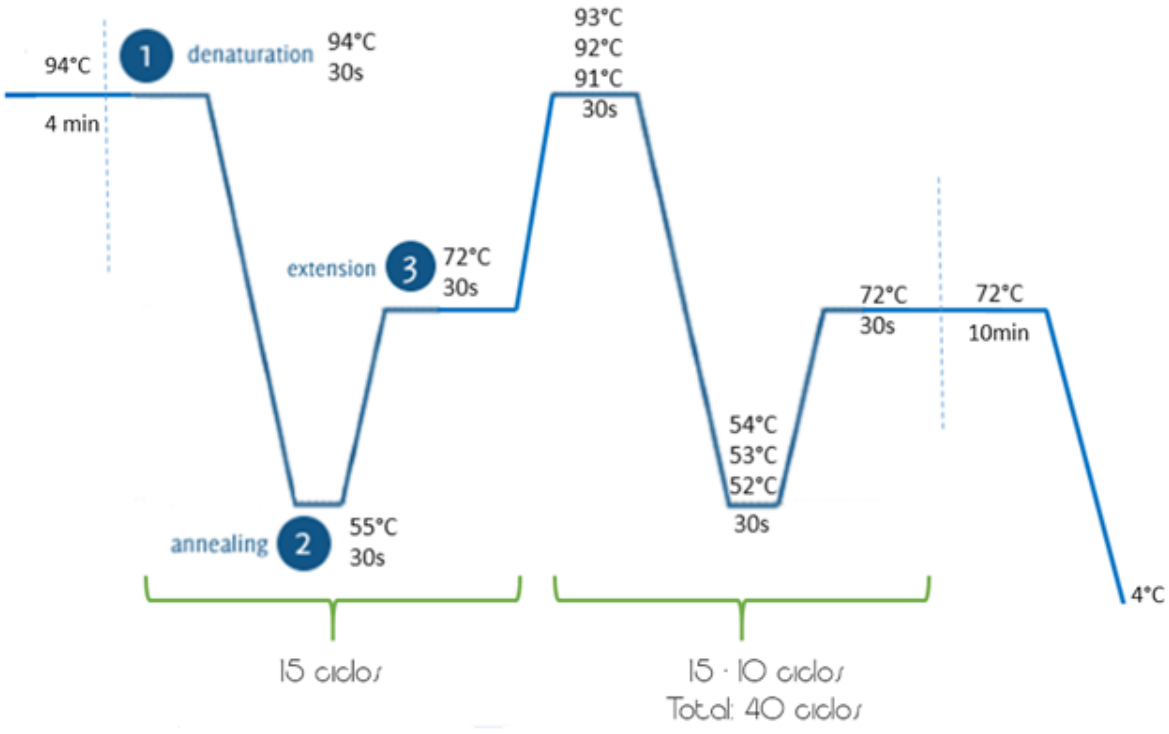
El protocolo de amplificación se detalla a continuación:

A 2 µL de ADN de cada muestra se le añadieron 15,75 µL de agua libre de nucleasas; 1 µL de BSA; 2 µL de $MgCl_2$; 2,5 µL de tampón 10x; 1 µL de dNTPs 10mM; 0,25 µL de Taq Pol (Platinum Taq); 0,25 µL del primer 518R 100µM y 0,25 µL del primer GC-338F 100µM.

El programa de PCR consistió en una etapa de desnaturalización a 94ºC durante 4 minutos, seguido por 4 segmentos. El primero de ellos consistió en 15 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94ºC, annealing durante 30 segundos a 55°C y una extensión de 30 segundos a 72°C. El segundo segmento consistió en 15 ciclos en los cuales se bajó la temperatura en 1ºC a la etapa de desnaturalización y annealing. Es decir, desnaturalización durante 30 segundos a 93ºC, annealing durante 30 segundos a 54°C y una extensión de 30 segundos a 72°C. El tercer segmento estuvo conformado de 15 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 92ºC, annealing durante 30 segundos a 53°C y una extensión de 30 segundos a 72°C. El cuarto segmento estuvo conformado por 10 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 91ºC, annealing durante 30 segundos a 52°C y una extensión de 30 segundos a 72°C. A continuación, se realizó una extensión final durante 10 minutos a 72°C.

Figura 7: Diagrama de la reacción de amplificación (PCR) del gen 16S rRNA

Elaborado por: Aguilar, 2016.



3.2.3.1. Secuencia del gen 16S rRNA y sus sitios de solapamiento con los primers

atggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgaacggtaacaggaagaagc
ttgcttctttgctgacgagtggcggacgggtgagtaatgtctgggaaactgcctgatggagggggg
ataactactggaaacggtagctaataccgcataacgtcgcaagaccaaagaggggtaccttcggg
cctcttgccatcggatgtgcccagatgggattagctagtaggtggggtaacggctcacctaggcg
acgatccctagctggtctgagaggatgaccagccacactggaactgagacacggtccag**actcct**
acgggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgcaagcctgatgcagccatgccgcgtgta
tgaagaaggccttcgggttgtaaagtactttcagcggggaggaagggagtaaagttaataccttt
gctcattgacgttacccgcagaagaagcaccggctaactccgtg**ccagcagccgcggtaat**acgg
agggtgcaagcgttaatcggaattactgggcgtaaagcgcacgcaggcggtttgttaagtcagat
gtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcatctgatactggcaagcttgagtctcgtagaggg
gggtagaattccaggtgtagcggtgaaatgcgtagagatctggaggaataccggtggcgaaggcg
gccccctggacgaagactgacgctcaggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccct
ggtagtccacgccgtaaacgatgtcgacttggaggttgtgcccttgaggcgtggcttccggagct
aacgcgttaagtcgaccgcctggggagtacggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacgggg
gcccgcacaagcggtggagcatgtggtttaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctggtcttg
acatccacggaagttttcagagatgagaatgtgccttcgggaaccgtgagacaggtgctgcatgg
ctgtcgtcagctcgtgttgtgaaatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttatccttt
gttgccagcggtccggccgggaactcaaaggagactgccagtgataaactggaggaaggtgggga
tgacgtcaagtcatcatggcccttacgaccagggctacacacgtgctacaatggcgcatacaaag
agaagcgacctcgcgagagcaagcggacctcataaagtgcgtcgtagtccggattggagtctgca
actcgactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgtggatcagaatgccacggtgaatacgttcc
cgggccttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagtgggttgcaaaagaagtaggtagcttaac
cttcgggagggcgcttaccactttgtgattcatgactggggtgaagtcgtaacaaggtaaccgta
g

La secuencia de color celeste es el sitio de solapamiento del primer 338F, el cual se unirá a la secuencia 3’- 5’ del gen 16S rRNA.

La secuencia de color verde es el sitio de solapamiento del primer 518R, el cual se unirá a la secuencia 5’- 3’ del gen 16S rRNA.

3.2.3.2. Ensayos propuestos para evitar la contaminación de las muestras

Las reacciones de amplificación con los primers 338F y 518R presentaron banda en todos los controles negativos, lo que indicó una contaminación de las muestras.

Los métodos usados para evitar dicha contaminación fueron realizar amplificaciones con gradiente de temperatura no solo en la etapa de desnaturalización como el protocolo de Raymond, Lijek, Griffiths, & Bonsall (2008) lo indica, sino también en la etapa de annealing.

Se menciona el protocolo usado por estos autores debido a que las reacciones de PCR del presente trabajo de titulación se basaron en sus resultados.

Se realizaron amplificaciones cambiando los primers del gen 16S rRNA a primers que amplifican la subunidad β de la RNA polimerasa de las bacterias. Estos primers fueron rpoB1698f (5'-aacatcggtttgatcaac-3'; correspondiente a la posición 1643 en *E. coli*) y rpoB2041r (5'-cgttgcatgttggtacccat-3'; correspondiente a la posición 2041 en *E. coli*). Una grapa de GC (5'-cgccccccgcgccccgcgcccggcccgccgccccgcccc-3') fue añadida al primer forward.

Con el fin de comprobar la existencia y el estado de los cebadores, se corrió un gel con los tres pares de primers: 338F y 518R de febrero de 2013, 338F y 518R de julio de 2013, rpoB2041r y rpoB1698f.

Finalmente, se realizaron las reacciones de amplificación con gradiente de temperatura durante la desnaturalización y el annealing con los primers del 16S rRNA, 338F y 518R nuevos.

3.2.3.3. Cuantificación del material genético posterior a la amplificación

Para comprobar la cantidad de material genético obtenido posterior a la PCR con el fin de tener suficiente ADN para la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE), se cuantificaron las muestras mediante espectrofotometría utilizando el NanoDrop 2000 de Thermo Scientific, siguiendo el procedimiento descrito en el punto 3.2.2 del presente documento.

3.2.3.4. Electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis de la amplificación de los productos de PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. En cada pocillo del gel se colocaron 5 µL del amplicón y 1 µL de loading buffer 6x.

El marcador que se usó fue el TrackIt 1Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen, el cual ayuda a diferenciar secuencias de ADN de 100pb hasta 12000pb. Se colocó 4 µL de este marcador en el primer pocillo de cada gel.

Una vez cargados los productos de PCR con el loading buffer en el gel, se realizó la corrida electroforética durante 30 minutos a 100 v.

Buffers para electroforesis en gel de agarosa

TAE 50x	**1L**
Tris base	242,2g
Ácido acético glacial	57,1mL
EDTA 0,5M (pH 8)	100mL

Disolver el Tris base en 600mL de agua destilada, añadir lentamente el ácido acético glacial y colocar el EDTA. Ajustar el volumen final a 1L con agua destilada.

Una vez hecho el TAE 50x, se realiza una dilución para preparar TAE 1x.

$$C1V1 = C2V2$$

$$V1 = \frac{C2 * V2}{C1} = \frac{1x * 1L}{50x} = 0{,}02\,L = 20mL$$

Donde, C = concentración; y V = volumen.

$20\,mL$ de TAE 50x se deben colocar en 980mL de agua destilada para obtener 1L de TAE 1x.

TBE 10x **1L**

Tris base	108g
Ácido bórico	55g
EDTA 0,5M	40mL

Disolver el Tris base en 960mL de agua destilada, añadir el ácido bórico y colocar el EDTA. Ajustar el volumen final a 1L con agua destilada.

Para preparar TBE 1x, se debe realizar una dilución siguiendo el proceso que se indica en la preparación del TAE.

ADN Loading buffer 6x **100mL**

Glicerol 100%	60mL
Tris-HCl 1M (pH 8)	6mL
EDTA 0,5M (pH 8)	1,2mL
Azul de bromofenol	60mg

Añadir 32,8mL de agua grado biología molecular.

Gel de agarosa 1,5%

Agarosa	0,6g
TAE 1x	40mL
Bromuro de etidio	0,8µL (10mg/mL)

Se calentó la mezcla de agarosa y TAE 1x en el microondas durante 30 segundos hasta que la agarosa estuvo completamente disuelta, se dejó enfriar durante cinco minutos y se añadió 0,8µL de bromuro de etidio. Se vertió la mezcla en la bandeja con el peine donde se formó el gel y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos hasta que se solidificó completamente. Se retiró el peine cuidadosamente.

3.2.4. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) permitió establecer diferencias entre comunidades en términos de bandas (presencia/ausencia), ya que usa marcadores moleculares como el gen 16S rRNA, separa fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos (Fernández & Le Borgne, 1987) y crea un gradiente desnaturalizante de urea-formamida en el gel. El grado de desnaturalización que sufrirá la molécula depende de su secuencia de nucleótidos, así, las cadenas que poseen mayor cantidad de guanina y citosina en su estructura, necesitarán mayor concentración de agentes desnaturalizantes para separarse.

Los productos de PCR (20µL por muestra) se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10%, 0,75mm de grosor en un gradiente desnaturalizante al 40% (Low) 60% (High) para un volumen de 13mL utilizando el sistema DGGE-2001-110 (CBS Scientific Company, Del Mar, CA). Las imágenes digitalizadas de los geles se utilizaron para comparar la presencia / ausencia de bandas y generar agrupaciones de las comunidades más representativas de los fragmentos de bosque y la matriz que los rodea.

El procedimiento de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) se detalla a continuación:

Se lavaron los cristales con agua y jabón y posteriormente con alcohol sin que queden manchas. Se colocó la goma amarilla alrededor del cristal con esquinas circulares haciendo que coincidan las muecas de la goma con las esquinas del cristal. A continuación se ubicaron los separadores a ambos lados del cristal de forma que quedaron totalmente pegados a la goma. Se colocó el otro cristal encima y se apretó fuertemente. Se sujetaron los dos cristales con las pinzas (pinzas cristales): tres en la base y tres en cada lado para colocar la estructura en forma vertical. Seguidamente se llenó con agua la cubeta de gradiente y se puso en marcha la bomba, de modo que se rellenaron los cristales hasta que rebosaron con el objetivo de comprobar que no exista liqueo. Se vaciaron los cristales y se secó muy bien el interior con papel filtro.

Para el funcionamiento de la cubeta de gradiente se debe comprobar el funcionamiento de la bomba peristáltica y del agitador con los imanes.

A continuación se realizó el gradiente del gel 40% (Low) y 60% (High) para un volumen de 13mL.

La tabla 2 indica la preparación de las soluciones stock a diferentes gradientes.

Tabla 2: Preparación de las soluciones stock para el gel de poliacrilamida para DGGE

Fuente: Instruction Manual DGGE C.B.S. Scientific, 2013.

For 100ml use:

	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
40% Acrylamide/Bis (ml)	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8
50x TAE Buffer (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Formamide (ml)	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
Urea (g)	4.2	8.4	12.6	16.8	21	25.2	29.4	33.6	37.8	42

Add dH_20 to 100ml

Store denaturant stock solutions at 4º C in amber bottles

Para preparar la solución de 40% acrilamida/bisacrilamida se pesaron 38,93g de acrilamida y 1,07g de bisacrilamida, mezclándolos en 100mL de agua destilada.

El persulfato de amonio al 10% se preparó colocando 0,1g de APS en 1mL de agua destilada.

En la cámara de flujo laminar se prepararon las dos concentraciones, una en un tubo rotulado L (low) y la otra en un tubo rotulado H (high).

Se añadió en el tubo L:

- 11,5mL de solución stock 40%
- 80µL de APS (10%)
- 5µL de TEMED

Se añadió en el tubo H:

- 11,5mL de solución stock 60%
- 80µL de APS (10%)
- 5µL de TEMED

Es importante tener todo preparado para el siguiente paso, ya que el APS y el TEMED son polimerizantes. Se debe comprobar que las válvulas de gradiente y de la cubeta estén cerradas (posición vertical y perpendicular respectivamente).

Una vez colocadas las mezclas en la cubeta y con el agitador funcionando, se abrieron las válvulas en el siguiente orden: válvula de gradiente y válvula de la cubeta, se puso en marcha la bomba peristáltica. Inmediatamente después se colocó la aguja entre los dos cristales para que caiga la mezcla dentro. Cuando el espacio entre los cristales estuvo lleno, se retiró la aguja y se pasó agua destilada por el sistema de gradiente para evitar que polimericen los restos de mezcla en las mangueras. Se colocó el peine formador de pocillos.

Se esperó treinta minutos hasta que el gel polimerice. Una vez polimerizado, se retiró el peine despacio y se limpiaron los cristales y los pocillos con agua destilada ultrapura sin dejar restos de gel.

Consecutivamente se llenó la cubeta de DGGE con 21L de TAE 1x. Cuando el gel estuvo listo, se puso a calentar la cubeta hasta los 60°C (54°C en el equipo equivalen a 60°C). Mientras tanto se montó el gel sin las pinzas (pinzas cristales) en el soporte quitando la parte de abajo de la goma amarilla para que esté en contacto con el buffer. Se sujetó con las pinzas de soporte.

Se apagó todo el baño se y puso el gel en la cubeta de forma que las conexiones del soporte quedaron en la parte derecha.

Se limpiaron bien los pocillos del gel con una pipeta cogiendo TAE 1x de la cubeta.

Para cargar las muestras se añadieron 8µL de loading buffer 6x a los 20µL de amplicón. Una vez cargadas se conectó el soporte, se encendió nuevamente el calentador y se encendió la fuente de alimentación programándola a 80v durante 5 horas.

Para visualizar las bandas se apagó la fuente de alimentación y el calentador, esperando hasta que llegue a 0°C. Se sacó el soporte escurriendo bien el TAE y se retiró el gel. Es importante lavar con agua destilada los electrodos del soporte y de la cubeta del DGGE para no tener problemas al momento de la corrida electroforética.

Para separar los cristales, se los lavó con agua destilada y se introdujo una espátula entre ellos con cuidado. La tinción se realizó colocando el cristal plano con el gel en una bandeja con 500mL

de agua destilada + 60µL de bromuro de etidio en concentración de 10mg/mL durante 20 minutos. Para desteñirlo se dejó el gel en agua destilada por 20 minutos. Finalmente, se observaron las bandas en el transiluminador.

Capítulo IV

Resultados y Discusión

4.1. Resultados

4.1.1. Muestreo

Se colectaron 59 muestras en total, de los cinco fragmentos de bosque del sureste de la Reserva Ecológica Mache – Chindul y del bosque no fragmentado de la Estación Biológica Bilsa (EBB). La muestra de la EBB fue recolectada con el objetivo de comparar las comunidades de bacterias del suelo del bosque no fragmentado con el fragmentado.

En cada fragmento se hizo un transecto de 1km, con 500m hacia fuera (pastizal) y dentro del fragmento, tomando muestras cada 100m.

Se escogieron los cinco fragmentos ubicados al sureste de la Reserva debido a que fue el área que mostró menor densidad de bosque en las fotografías satelitales.

En la REMACH existen varios tipos de actividades desarrolladas por el ser humano, entre ellas está la tala de los bosques para la comercialización de la madera, la agricultura, el pastoreo y crianza de ganado. Es por esto que los cinco fragmentos de bosque y las muestras de la EBB poseen diferente grado de intervención antropogénica.

La recolección de las muestras se realizó en 2014 y su procesamiento comenzó en 2015. La flora bacteriana puede experimentar variaciones durante un año, provocando que las muestras de 2014 no se correspondan con las de 2015.

La tabla 3 muestra el resumen de los datos de las muestras colectadas en la REMACH.

Tabla 3. Datos de las muestras de los fragmentos de la REMACH

Fuente: Darkes, 2014.

Número del fragmento	Tamaño del fragmento (ha)	Número de muestra	Tipo de hábitat	Fuera/dentro del fragmento	Distancia desde el borde (m)	Coordenadas UTM N	Coordenadas UTM W	Elevación (m)
77	15,76	77-01	Bosque	Dentro	500	661881	44410	188
77	15,76	77-02	Bosque	Dentro	400	661537	44324	186
77	15,76	77-03	Bosque	Dentro	300	661984	44243	182
77	15,76	77-04	Bosque	Dentro	200	662058	44182	153
77	15,76	77-05	Bosque	Dentro	100	662136	44126	130
77	15,76	77-06	Cultivo	Fuera	40	662203	44014	152
77	15,76	77-07	Cultivo	Fuera	80	662238	43995	155
77	15,76	77-08	Cultivo	Fuera	120	662266	43961	165
77	15,76	77-09	Cultivo	Fuera	160	662293	43933	165
77	15,76	77-10	Cultivo	Fuera	200	662315	43906	164
79	13,75	79-01	Bosque	Dentro	500	661337	43145	242
79	13,75	79-02	Bosque	Dentro	400	661451	43173	232
79	13,75	79-03	Bosque	Dentro	300	661539	43173	216
79	13,75	79-04	Bosque	Dentro	200	661634	43176	225
79	13,75	79-05	Bosque	Dentro	100	661726	43208	223
79	13,75	79-06	Pastizal	Fuera	40	661680	43494	212
79	13,75	79-07	Pastizal	Fuera	80	661645	43514	210
79	13,75	79-08	Pastizal	Fuera	120	661622	43546	195
79	13,75	79-09	Pastizal	Fuera	160	661636	43580	188
79	13,75	79-10	Pastizal	Fuera	200	661657	43617	181
12	21,69	12-01	Bosque	Dentro	500	646821	39117	484
12	21,69	12-02	Bosque	Dentro	400	646828	39030	509
12	21,69	12-03	Bosque	Dentro	300	646850	38936	495
12	21,69	12-04	Bosque	Dentro	200	646817	38861	519

Tabla 3. (Cont.)

Fuente: Darkes, 2014.

12	*21,69*	*12-05*	*Bosque*	*Dentro*	*100*	*646782*	*38769*	*556*
12	21,69	12-06	Pastizal	Fuera	24	646714	38672	576
12	21,69	12-07	Pastizal	Fuera	48	646688	38657	574
12	21,69	12-08	Pastizal	Fuera	72	646679	38615	586
12	21,69	12-09	Pastizal	Fuera	96	646678	38583	592
12	21,69	12-10	Pastizal	Fuera	120	646672	38565	594
Bilsa	*	Bilsa-01	Bosque	Dentro	500	642925	37307	535
Bilsa	*	Bilsa-02	Bosque	Dentro	400	642943	37223	535
Bilsa	*	Bilsa-03	Bosque	Dentro	300	642986	37142	522
Bilsa	*	Bilsa-04	Bosque	Dentro	200	642966	37054	527
Bilsa	*	Bilsa-05	Bosque	Dentro	100	642994	36954	542
Bilsa	*	Bilsa-06	Pastizal	Fuera	25	643042	36811	565
Bilsa	*	Bilsa-07	Pastizal	Fuera	50	643063	36802	565
Bilsa	*	Bilsa-08	Pastizal	Fuera	75	643085	36792	562
Bilsa	*	Bilsa-09	Pastizal	Fuera	100	643109	36781	558
Bilsa	*	Bilsa-10	Pastizal	Fuera	125	643129	36767	553
58	4,29	58-01	Bosque	Dentro	500	656595	40949	186
58	4,29	58-02	Bosque	Dentro	400	656624	40911	203
58	4,29	58-03	Bosque	Dentro	300	656571	40825	206
58	4,29	58-04	Bosque	Dentro	200	656604	40804	227
58	4,29	58-05	Bosque	Dentro	100	656658	40867	226
58	4,29	58-06	Pastizal	Fuera	60	656741	41007	221
58	4,29	58-07	Pastizal	Fuera	120	656760	41069	212
58	4,29	58-08	Pastizal	Fuera	180	656767	41126	202

Tabla 3. (Cont.)

Fuente: Darkes, 2014.

58	4,29	58-09	Pastizal	Fuera	240	656750	41183	185
58	4,29	58-10	Pastizal	Fuera	300	656638	41235	150
63	8,42	63-01	Bosque	Dentro	500	659666	42440	201
63	8,42	63-02	Bosque	Dentro	400	659673	42344	200
63	8,42	63-03	Bosque	Dentro	300	659664	42259	184
63	8,42	63-04	Bosque	Dentro	200	659662	42192	177
63	8,42	63-05	Bosque	Dentro	100	659588	42132	173
63	8,42	63-06	Pastizal	Fuera	100	659499	42157	130
63	8,42	63-07	Pastizal	Fuera	200	659339	42146	131
63	8,42	63-08	Pastizal	Fuera	300	659224	42131	134
63	8,42	63-09	Cultivo	Fuera	400	659121	42127	153

* La casilla tamaño del fragmento (ha) está vacía en las muestras de la Estación Biológica Bilsa debido a que dentro de la EBB el bosque no se encuentra fragmentado.

4.1.2. Extracción y cuantificación del ADN total bacteriano

La purificación del ADN microbiano del suelo es un paso complejo debido a la co-extracción de ácidos húmicos y compuestos fenólicos asociados a este medio, ya que inhiben la posterior clonación, amplificación y/o secuenciación de esta molécula (Engel, Pinnell, Cheng, Charles, & Neufeld, 2012).

El PowerSoil® DNA Isolation Kit de MoBio Laboratories está diseñado para usarse con muestras ambientales que poseen un alto contenido de ácidos húmicos, incluyendo tipos de suelo donde se dificulta retirar estos compuestos por la presencia de compost, sedimentos y estiércol. El material genético aislado tiene un alto nivel de pureza, permitiendo una amplificación satisfactoria del ADN de los organismos presentes en la muestra (MoBio Laboratories, 2015).

Por estas razones, se usó el PowerSoil® DNA Isolation Kit para obtener el ADN genómico total bacteriano de las muestras de suelo de bosque fragmentado y no fragmentado de la Reserva Ecológica Mache-Chindul.

La cuantificación del material genético obtenido se realizó con el objetivo de determinar la concentración de ADN en cada muestra y su calidad (Anexo A: Cuantificación del ADN extraído con el protocolo de MoBio Laboratories).

4.1.3. Amplificación del material genético mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa

Para la amplificación de las secuencias del gen 16S rRNA se utilizaron los primers 338F-GC (5’actcctacgggaggcagcag3’) y 518R (5’attaccgcggctgctgg3’). El primer 338F-GC incluye una cola de GC en el extremo 5´ (5'-cgcccgccgcgcgcggcgggcggggcgggggcacgggggg-3') (Brosius, Palmer, Kennedy, & Noller, 1978).

La reacción de amplificación se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Raymond et al., (2008), con una modificación en la etapa de annealing al ir bajando 1°C en cada segmento. El volumen utilizado para la PCR se detalla a continuación en la tabla 4.

Tabla 4: Volúmenes y concentraciones de los reactivos para PCR

Elaborado por: Aguilar, 2016.

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
Agua libre de nucleasas	15,75	N.A.
BSA	1	-
Tampón	2,5	10x
MgCl2	2	25mM
dNTPs	1	10mM
Taq Pol	0,25	N.A.
DNA	2	<100ng
GC-338F	0,25	100µM
518R	0,25	100µM
TOTAL	25	

Los controles positivos se cargaron con DNA de *Brucella abortus* y los controles negativos con agua ultrapura.

Las condiciones del programa de amplificación PCR consistieron en una etapa de desnaturalización a 94ºC durante 4 minutos, seguido por 4 segmentos con distintas etapas de desnaturalización, annealing y extensión, seguidas de una extensión final durante 10 minutos a 72°C. Estas condiciones se describen detalladamente en la metodología.

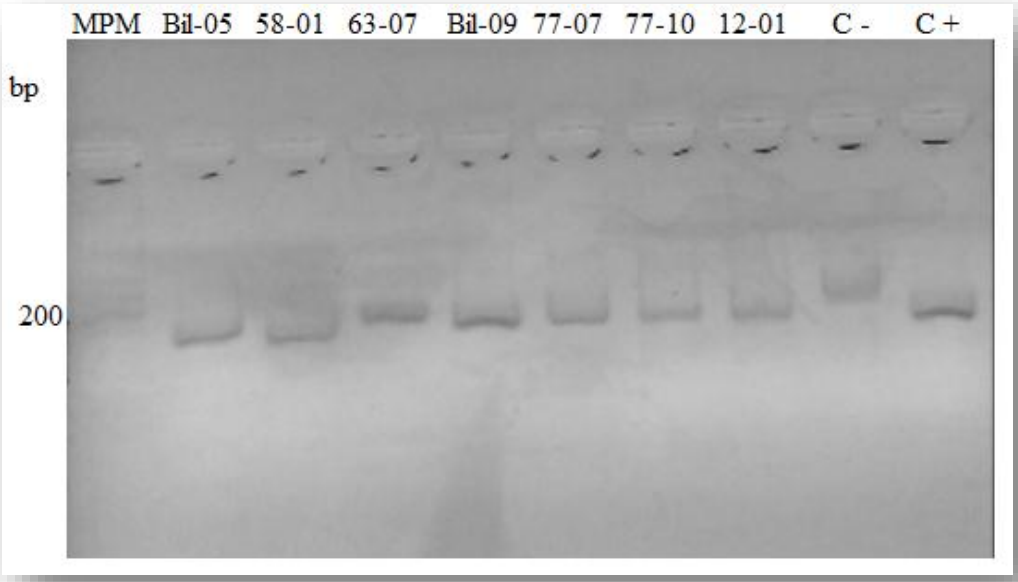
Se comprobó el éxito de la extracción de ADN, el funcionamiento de los primers y la amplificación del gen 16S rRNA mediante la visualización de los fragmentos amplificados por PCR en gel de agarosa al 1,5%, producto de una corrida electroforética usando bromuro de etidio como intercalante. La presencia/ausencia y tamaño de bandas fueron comparadas con marcador de peso molecular de 1 kb.

La figura 8 muestra el resultado de la PCR con los dos pares de primers del gen 16S rRNA (febrero y julio). Se corrieron muestras de diferentes fragmentos.

Figura 8: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16S rRNA de los fragmentos Bilsa, 12, 58, 63 y 77. MPM (50pb – 10kb), 1) Bosque, 2) Bosque, 3) Pastizal, 4) Pastizal, 5) Pastizal, 6) Pastizal, 7) Bosque, 8) Control negativo, 9) Control positivo.

Los carriles con las muestras de Bil-05, 58-01, 63-07, Bil-09 y 77-07 fueron amplificados con los primers de febrero de 2013.

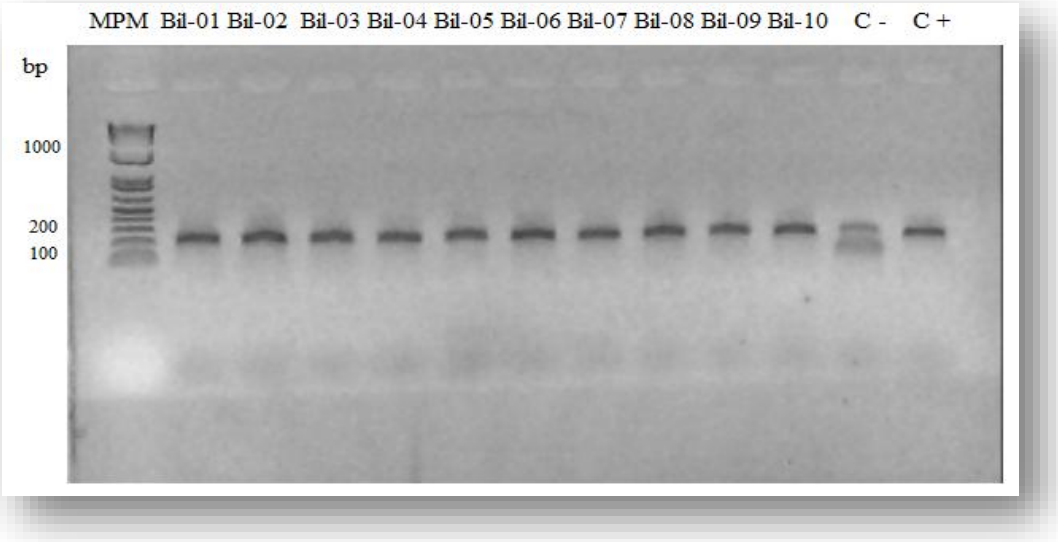
Los carriles con las muestras 77-10, 12-01, C – y C + fueron amplificados con los primers de julio de 2013.



Al observar que los primeros cinco pocillos mostraron bandas más intensas y claras, se decidió realizar las demás reacciones de amplificación con los primers de febrero de 2013.

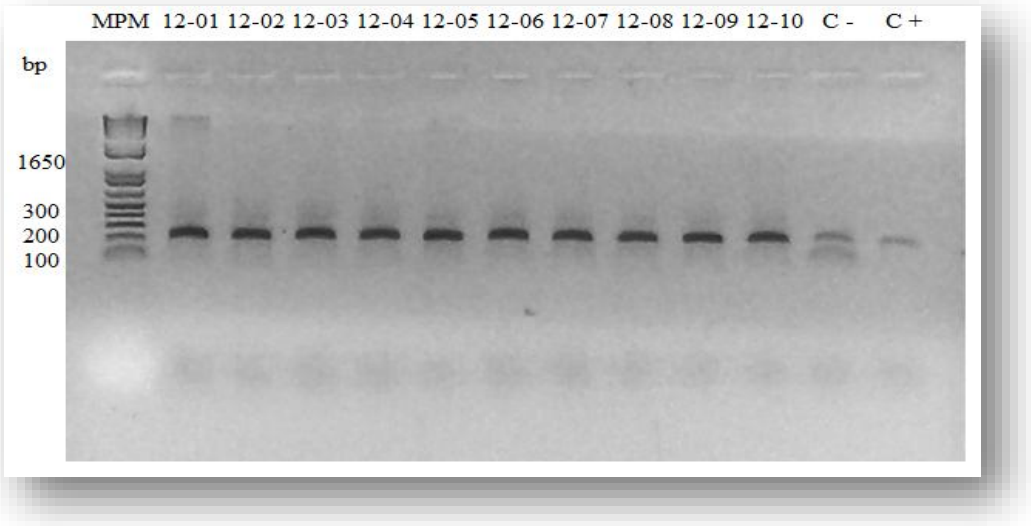
La figura 9 muestra el resultado de la extracción y amplificación de ADN de las muestras de suelo de la Estación Biológica Bilsa.

Figura 9: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA 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.



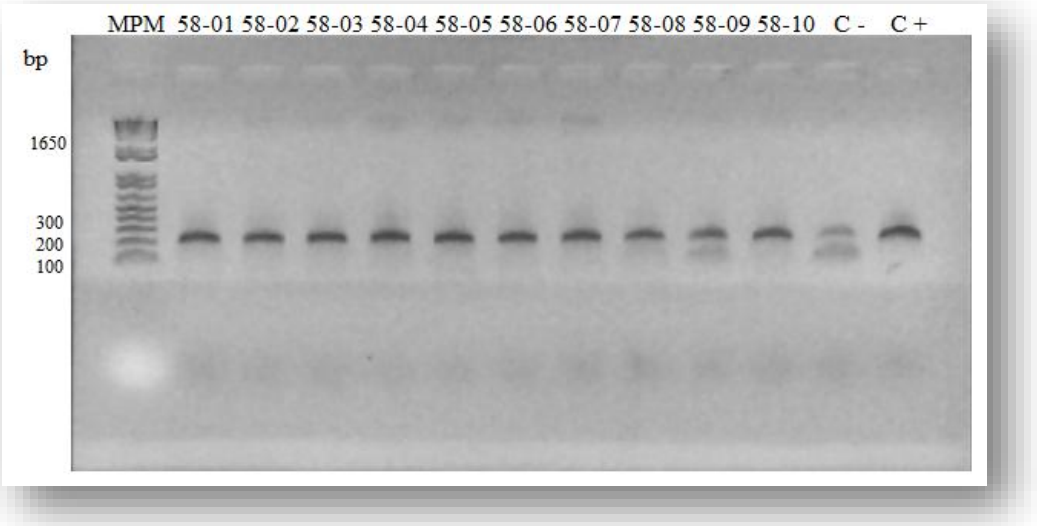
La figura 10 muestra el resultado de la extracción y amplificación de ADN de las muestras de suelo del fragmento 12.

Figura 10: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 12. 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.



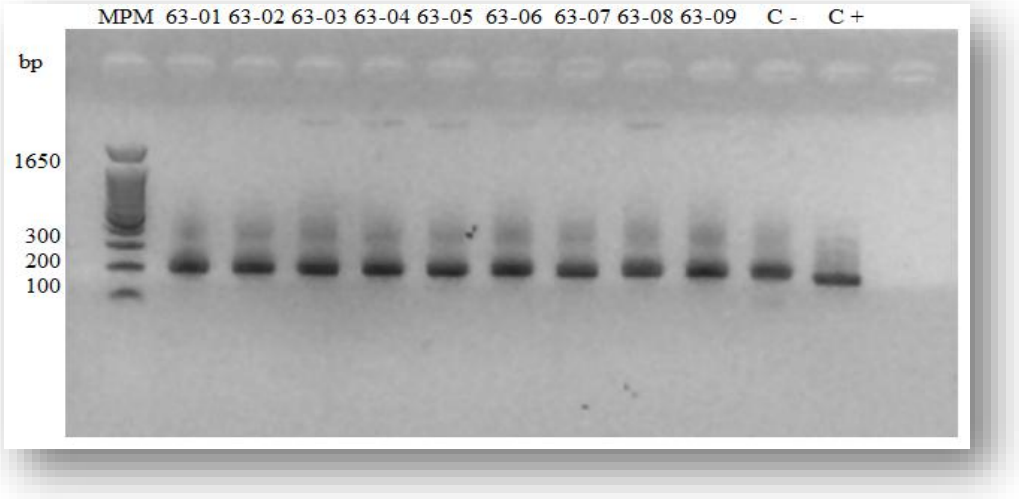
La figura 11 muestra el resultado de la extracción y amplificación de ADN de las muestras de suelo del fragmento 58.

Figura 11: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA 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.



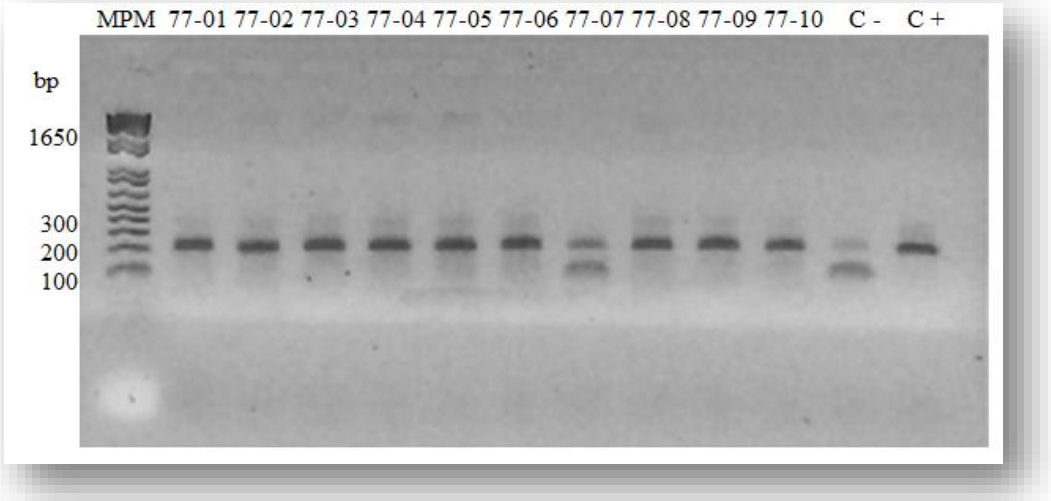
La figura 12 muestra el resultado de la extracción y amplificación de ADN de las muestras de suelo del fragmento 63.

Figura 12: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 63. MPM (1kb), 1) Bosque, 2) Bosque, 3) Bosque, 4) Bosque, 5) Bosque, 6) Pastizal, 7) Pastizal, 8) Pastizal, 9) Cultivo, 10) Control negativo, 11) Control positivo.



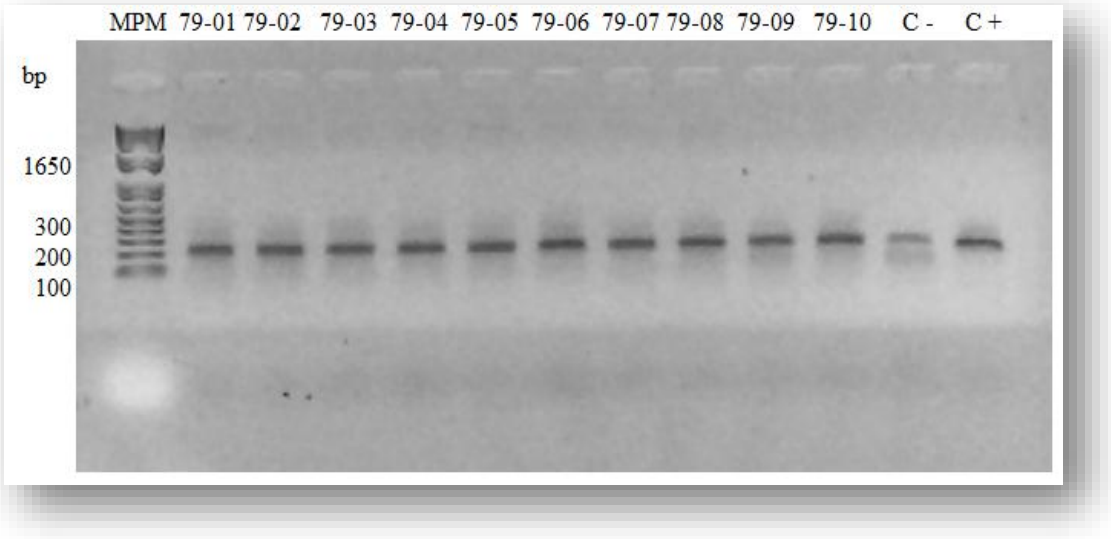
La figura 13 muestra el resultado de la extracción y amplificación de ADN de las muestras de suelo del fragmento 77.

Figura 13: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 77. MPM (1kb), 1) Bosque, 2) Bosque, 3) Bosque, 4) Bosque, 5) Bosque, 6) Cultivo, 7) Cultivo, 8) Cultivo, 9) Cultivo, 10) Cultivo, 11) Control negativo, 12) Control positivo.



La figura 14 muestra el resultado de la extracción y amplificación de ADN de las muestras de suelo del fragmento 79.

Figura 14: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA 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.



4.1.3.1. Ensayos propuestos para evitar la contaminación de las muestras

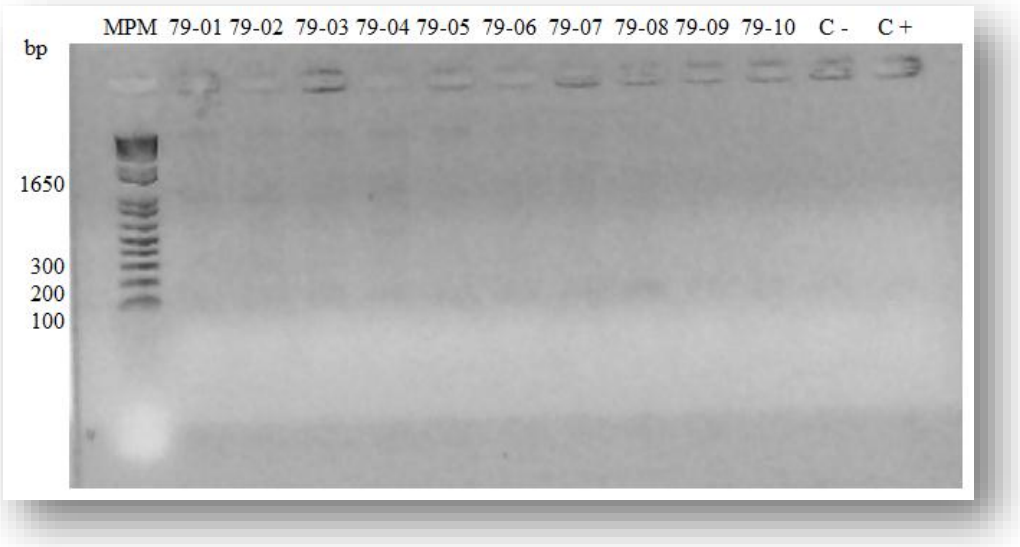
Al realizar las reacciones de amplificación de acuerdo al protocolo de Raymond et al., (2008), se obtuvieron bandas inespecíficas en la mayoría de carriles de los geles de cada fragmento. Para solucionar dicho problema se modificó el protocolo agregando un gradiente de temperatura a la etapa de annealing, donde se bajó 1°C en cada segmento.

Con esta modificación se consiguió eliminar la mayoría de las bandas inespecíficas, sin embargo la banda en los controles negativos permaneció.

Las PCRs de las figuras 8 a 13 se realizaron con dicha modificación en el protocolo.

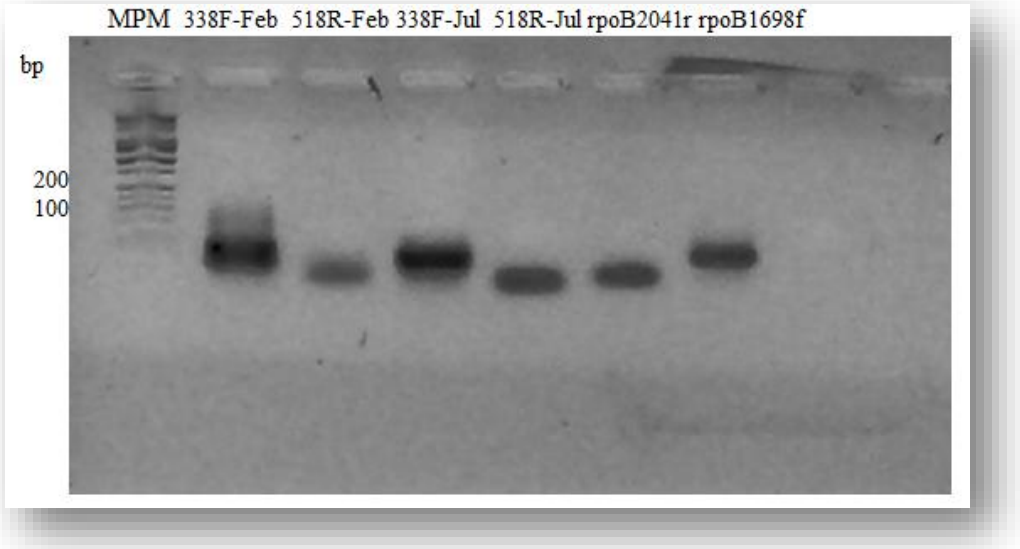
En las reacciones de amplificación con los primers rpoB1698f y rpoB2041r no se obtuvieron bandas en ninguno de los carriles. Las muestras amplificadas fueron las del fragmento 79.

Figura 15: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen de la subunidad β de la RNA polimerasa de las bacterias 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.



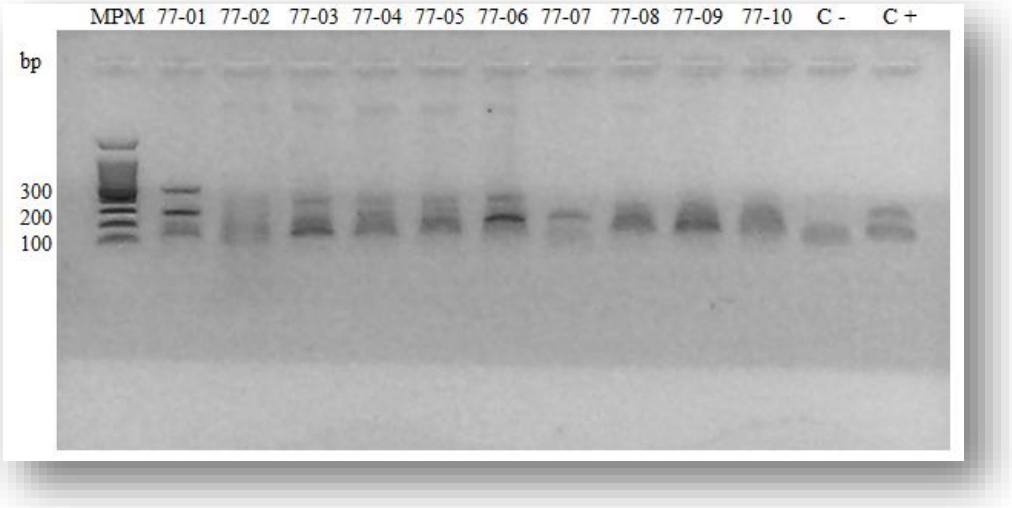
Con el objetivo de comprobar que sucedió con los cebadores, se corrió un gel con los tres pares de primers.

Figura 16: Gel de agarosa (1,5%). Corrida electroforética de los tres pares de primers. MPM (1kb), 1) 338F-Feb, 2) 518R-Feb, 3) 338F-Jul, 4) 518R-Jul, 5) rpoB2041r, 6) rpoB1698f.



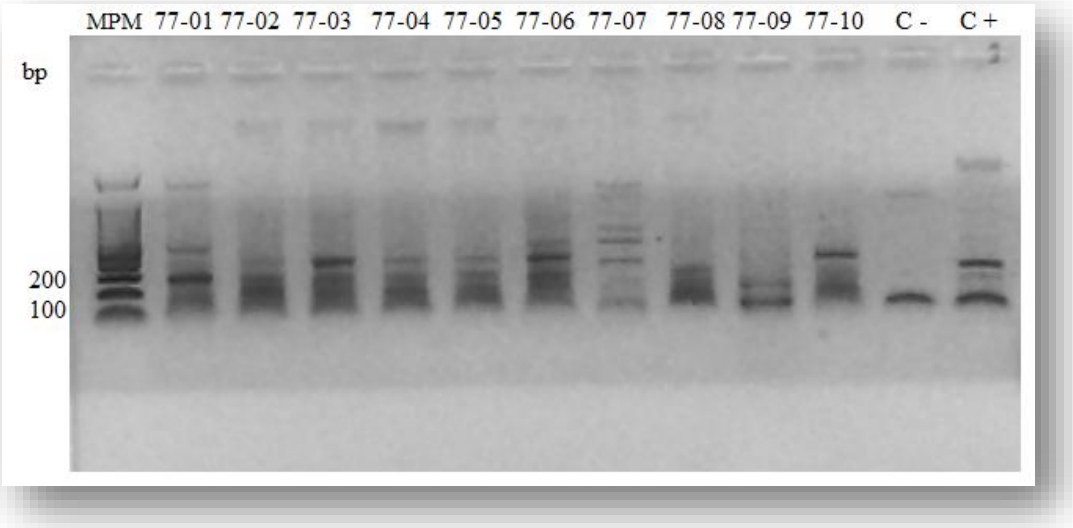
Con los primers del gen 16S rRNA nuevos se realizó una PCR de acuerdo al protocolo. La figura 16 muestra el resultado.

Figura 17: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16S rRNA (primers nuevos) del fragmento 77. 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.



Con los primers del gen 16S rRNA nuevos se realizó una PCR con la modificación en el protocolo, es decir, con gradiente de temperatura en la etapa de desnaturalización y en la etapa de annealing.

Figura 18: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16S rRNA (primers nuevos) del fragmento 77. 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.



Finalmente, se realizó una PCR con las muestras del fragmento 12, en la que cada muestra tuvo una temperatura de annealing y un control negativo con el fin de verificar a qué temperatura se eliminarían las bandas inespecíficas y la contaminación.

La tabla 5 muestra las diferentes temperaturas de annealing que se aplicaron en cada muestra.

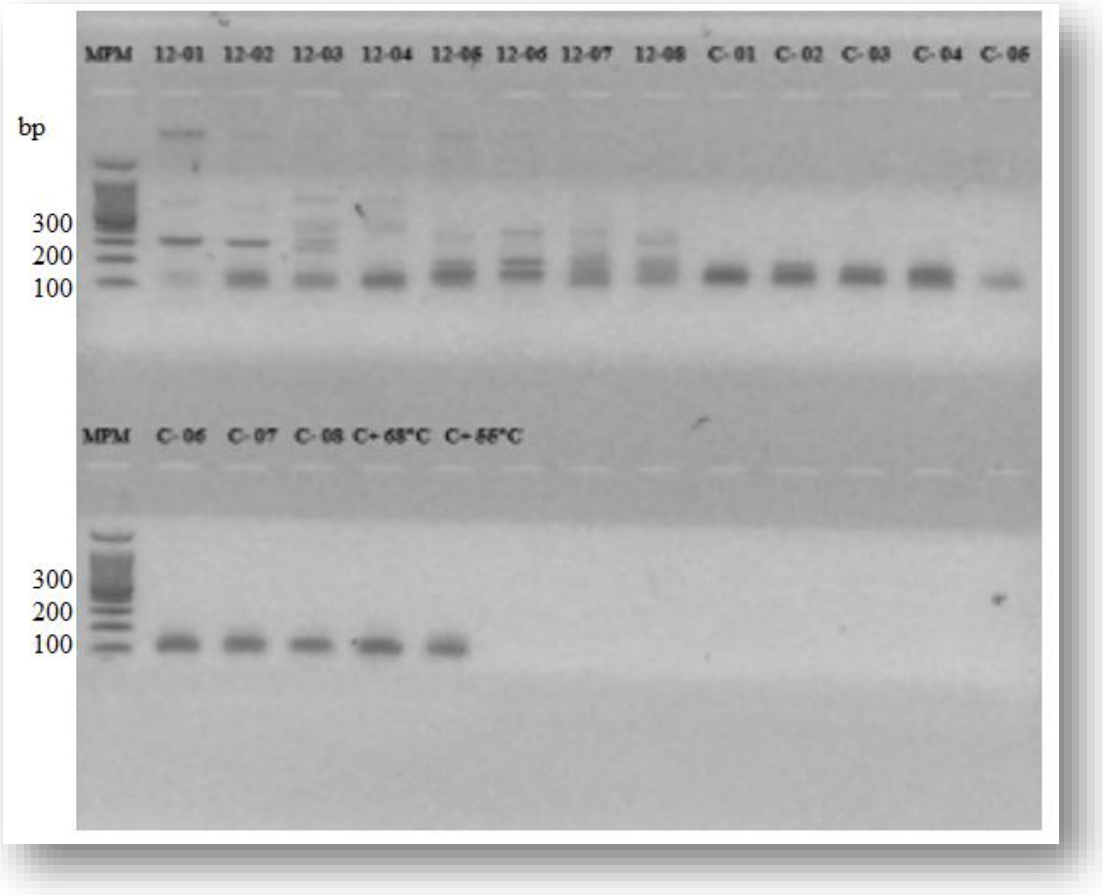
Tabla 5: Temperaturas de annealing para cada muestra del fragmento 12

Elaborado por: Aguilar, 2016

Muestra	*Temperatura (°C)*
12-01; C- 01 (Control negativo 01); C+	68
12-02; C- 02	67,3
12-03; C- 03	65,8
12-04; C- 04	63,2
12-05; C- 05	60,1
12-06; C- 06	57,6
12-07; C- 07	55,9
12-08; C- 08; C+	55

La figura 19 muestra el resultado de dicha PCR.

Figura 19: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16S rRNA (primers nuevos) con diferentes temperaturas de annealing del fragmento 12. MPM (1kb), 1) Bosque, 2) Bosque, 3) Bosque, 4) Bosque, 5) Bosque, 6) Pastizal, 7) Pastizal, 8) Pastizal, 9) Control negativo muestra 01, 10) Control negativo muestra 02, 11) Control negativo muestra 03, 12) Control negativo muestra 04, 13) Control negativo muestra 05, 14) Control negativo muestra 06, 15) Control negativo muestra 07, 16) Control negativo muestra 08, 17) Control positivo a 68°C, 18) Control positivo a 55°C.



4.1.3.2. Cuantificación del material genético posterior a la amplificación

Se cuantificaron solamente las muestras del fragmento 63 (escogido al azar) con el objetivo de adquirir una visión general de la cantidad, en masa, de ADN obtenido posterior a la reacción de amplificación en las muestras de todos los fragmentos (Anexo B: Cuantificación del material genético posterior a la amplificación).

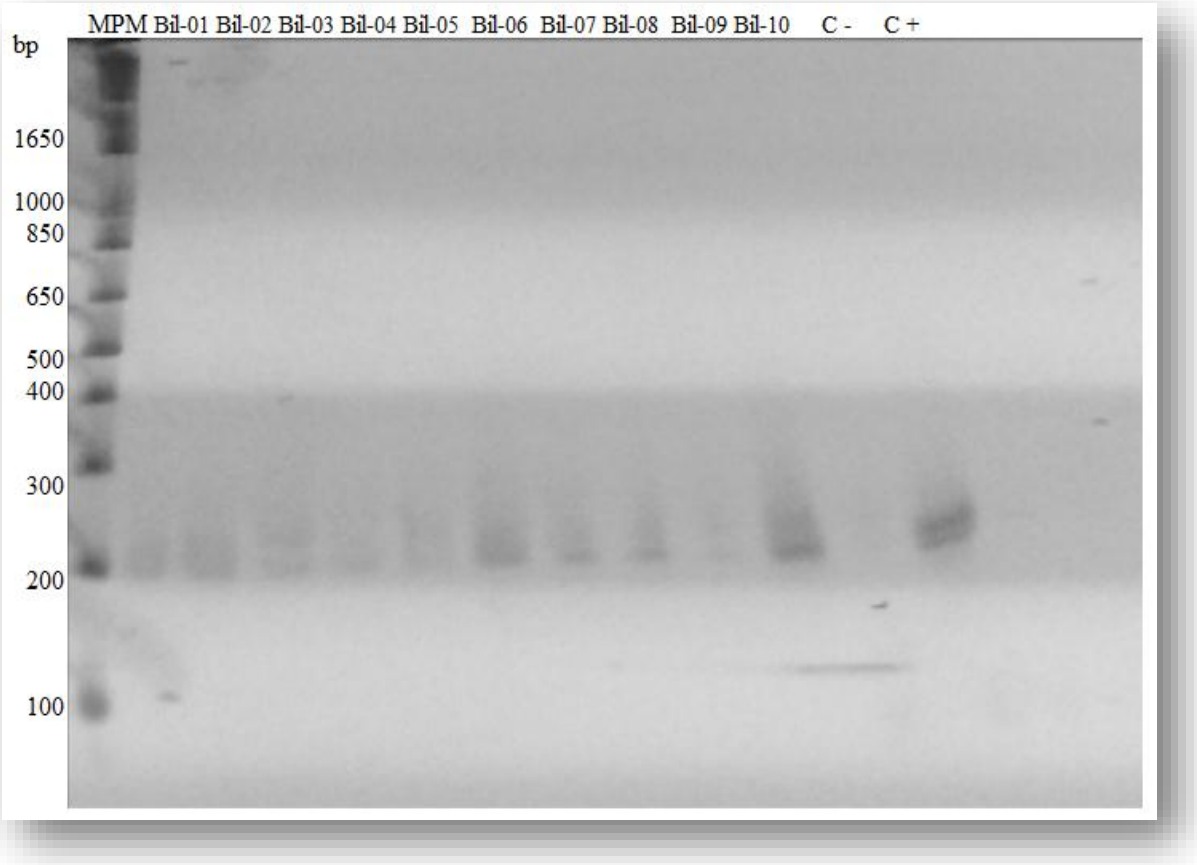
Las cuantificaciones fueron necesarias debido a que la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante requiere que se carguen de 5 a 10µg de ADN genómico en cada pocillo.

4.1.4. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

El DGGE, una técnica independiente de los medios de cultivo, es un tipo de electroforesis que permite la separación de secuencias de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello crea un gradiente creciente de agentes químicos desnaturalizantes de ácidos nucleicos, como son la urea y la formamida en un gel de poliacrilamida. La concentración a la cual las moléculas de ADN se separan depende del contenido de dobles o triples enlaces existentes entre los puentes de hidrógeno que unen las dos cadenas que forman la doble hélice.

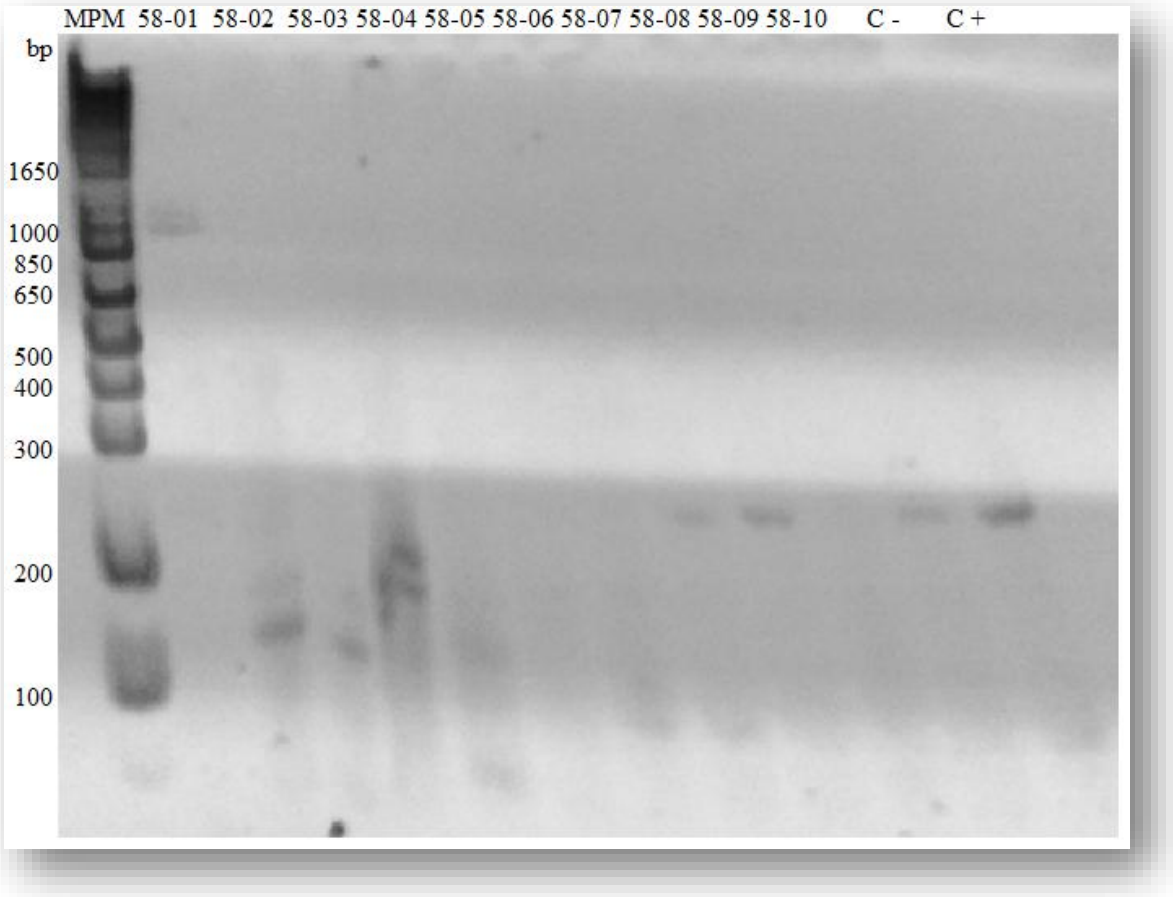
Los resultados de la aplicación de esta técnica en la Estación Biológica Bilsa se muestran en la figura 20.

Figura 20: 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



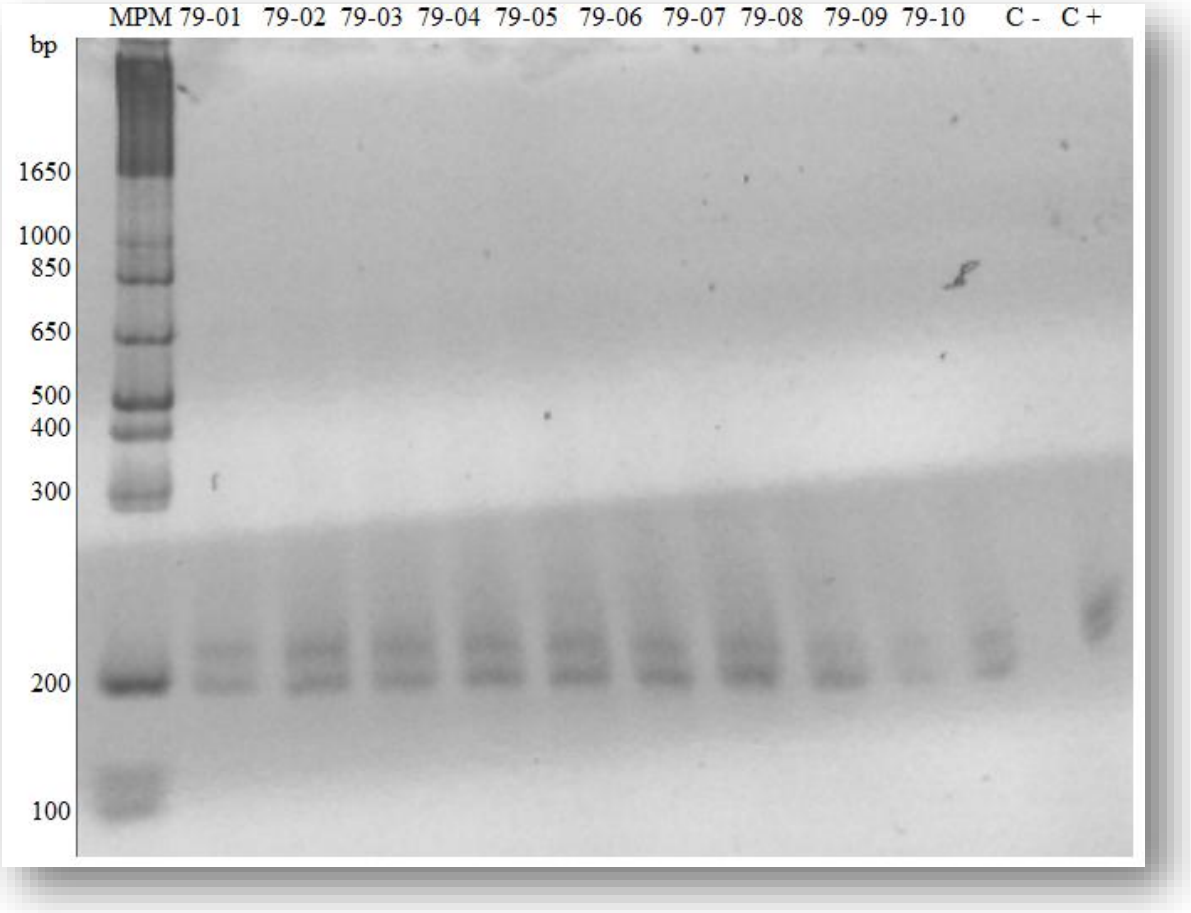
Los resultados de la aplicación de esta técnica en el fragmento 58 se muestran en la figura 21.

Figura 21: 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



Los resultados de la aplicación de esta técnica en el fragmento 79 se muestran en la figura 22.

Figura 22: 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



4.2. Discusión

4.2.1. Amplificación del material genético y electroforesis en gel de agarosa

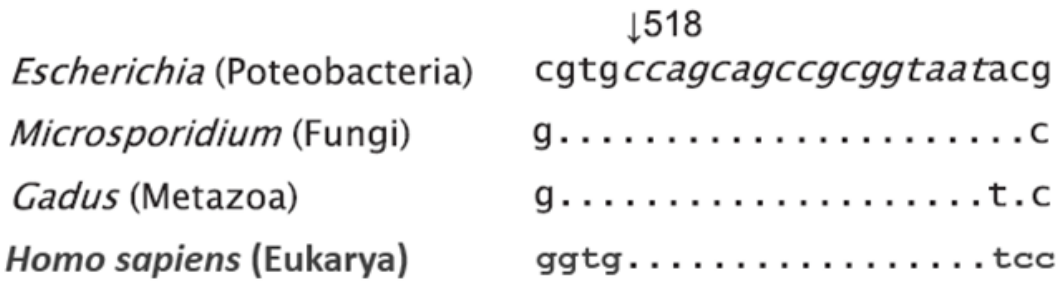
4.2.1.1. PCR con los dos pares de primers del gen 16S rRNA

Según Bakke et al., (2011), los primers 338F y 518R 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.

La figura 23 muestra dicha similitud con diferentes organismos.

Figura 23: Secuencia de la alineación de las regiones conservadas del gen SSU rRNA para diversos organismos (bacterias y Eukarya). Secuencias que se muestran: *Escherichia coli* (Brosius et al., 1978), *Microsporidium sp.* (Refardt et al., 2002), *Gadus* (Bakke et al., 2011), *Homo sapiens* (Gonzalez & Schmickel, 1986). Los puntos indican posiciones idénticas. La flecha encima del primer indica la

posición de los nucleótidos en el gen SSU rRNA de *E. coli*. La secuencia del primer se muestra en cursiva.



Al observarse en la figura 8 que dos de los carriles del gel (1 y 2) presentaron bandas de 100 pares de bases, se deduce que existió contaminación de dichas muestras con ADN de hongos o bien de *Homo sapiens*, lo que llevó a la unión inespecífica del primer 518R a la contaminación mostrando como resultado aquella banda. Como se muestra en la figura 22, el primer 518R posee mayor similitud con los organismos del reino Fungi, cabe mencionar que en el laboratorio donde se realizaron las PCRs se trabaja con distintos organismos como son levaduras, bacterias, parásitos, entre otros.

En el resto de carriles del gel los primers funcionaron correctamente uniéndose al ADN bacteriano ya que todos muestran la banda que se buscó obtener (200bp). Esto indica que en dichas muestras no existió contaminación con ADN de organismos eucariotas o que si existió, los primers se unieron al ADN predominante en cantidad, es decir, al bacteriano.

En el control negativo no se observa una banda clara, sin embargo al haber barrido se puede deducir que existe contaminación. Es importante mencionar que el control negativo solo se probó con el par de primers de julio de 2013.

Las bandas más intensas se observan en los primeros cinco pocillos (primers febrero 2013) y en el control positivo, razón por la cual se trabajó con los primers de febrero de 2013 en las demás reacciones de amplificación.

4.2.1.2. Estación Biológica Bilsa

Para tratar de eliminar las contaminaciones se cambiaron: el laboratorio donde se montó la PCR, las pipetas, los reactivos y los equipos (termocicladores).

A partir de esta reacción de amplificación, las PCRs se realizaron en el laboratorio donde se obtuvo menor cantidad de bandas inespecíficas.

Al continuar obteniendo bandas en el control negativo se llegó a la conclusión de que los primers estuvieron contaminados con ADN bacteriano por no alicuotarlos. En dicho control la presencia de la banda de 100 pares de bases se explica debido a que al no existir mayor cantidad de ADN bacteriano (bandas menos intensas), los primers se unieron inespecíficamente a la contaminación con ADN de organismos eucariotas. En los demás carriles los primers funcionaron correctamente al obtenerse bandas intensas de 200 pares de bases, dicha intensidad puede deberse en parte a la contaminación de los primers; no existieron bandas de 100 pares de bases al haber suficiente cantidad de ADN bacteriano en las muestras para que los primers se unan.

4.2.1.3. Fragmento 12

En el control negativo la presencia de la banda de 100 pares de bases se explica debido a que al no existir mayor cantidad de ADN bacteriano (bandas menos intensas), los primers se unieron inespecíficamente a la contaminación con ADN de organismos eucariotas. En los demás carriles los primers funcionaron correctamente al obtenerse bandas intensas de 200 pares de bases, dicha intensidad puede deberse en parte a la contaminación de los primers; no existieron bandas de 100 pares de bases al haber suficiente cantidad de ADN bacteriano en las muestras. La banda de 12000 pares de bases aproximadamente del carril 1 se debe a otra unión inespecífica de los primers debido a la naturaleza de la muestra. En el suelo existen millones de microorganismos y al no ser específicos los cebadores para bacterias, se obtienen dichos resultados.

4.2.1.4. Fragmento 58

En el control negativo la presencia de la banda de 100 pares de bases se explica debido a que al no existir mayor cantidad de ADN bacteriano (bandas menos intensas), los primers se unieron inespecíficamente a la contaminación con ADN de organismos eucariotas. En los demás carriles los primers funcionaron correctamente al obtenerse bandas intensas de 200 pares de bases, dicha intensidad puede deberse en parte a la contaminación de los primers; no

existieron bandas de 100 pares de bases al haber suficiente cantidad de ADN bacteriano en las muestras. La banda de 12000 pares de bases aproximadamente de los carriles 4 a 7 se debe a otra unión inespecífica de los primers debido a la naturaleza de la muestra. En el suelo existen millones de microorganismos y al no ser específicos los cebadores para bacterias, se obtienen dichos resultados.

4.2.1.5. Fragmento 63

Esta amplificación fue probablemente la más contaminada con ADN de bacterias debido a la banda (intensa) de 200 pares de bases en el control negativo y al barrido que se observa en todos los carriles. Es importante acotar que dicha PCR se realizó después que las demás reacciones que se muestran en el documento porque se perdieron las muestras de este fragmento mientras se ponía a punto la técnica del DGGE. Puede haber existido una contaminación cruzada debido a los equipos usados para todos los organismos con que se trabaja en el laboratorio. La banda de 12000 pares de bases aproximadamente de los carriles 3 a 8 se debe a otra unión inespecífica de los primers debido a la naturaleza de la muestra. En el suelo existen millones de microorganismos y al no ser específicos los cebadores para bacterias, se obtienen dichos resultados.

4.2.1.6. Fragmento 77

Al existir banda de 100 pares de bases en el carril 7 se deduce que en la muestra 77-07 hubo mayor contaminación con ADN de organismos eucariotas. En el control negativo la presencia de la banda de 100 pares de bases se explica debido a que al no existir mayor cantidad de ADN bacteriano (bandas menos intensas), los primers se unieron inespecíficamente a la contaminación con ADN de organismos eucariotas. Los demás carriles muestran bandas intensas de 200 pares de bases, dicha intensidad puede deberse en parte a la contaminación de los primers; no existieron bandas de 100 pares de bases al haber suficiente cantidad de ADN bacteriano en las muestras.

4.2.1.7. Fragmento 79

La presencia de la banda de 100 pares de bases en el control negativo se explica debido a que al no existir mayor cantidad de ADN bacteriano (bandas menos intensas), los primers se unieron inespecíficamente a la contaminación con ADN de organismos eucariotas. Los demás carriles muestran bandas intensas de 200 pares de bases, dicha intensidad puede deberse en parte a la contaminación de los primers; no existieron bandas de 100 pares de bases en estas muestras al haber suficiente cantidad de ADN bacteriano para que se unan los primers.

4.2.1.8. Ensayos propuestos para evitar la contaminación de las muestras

Al no obtenerse bandas con la amplificación de los primers rpoB, se deduce que los cebadores estuvieron dañados. Por otra parte, la corrida electroforética de los primers mostró bandas menores a 100 pares de bases bastante intensas en cada carril, sin embargo, por este método no se pudo comprobar eficazmente si los primers se encontraban desnaturalizados o dañados.

La reacción de amplificación con los primers nuevos del gen 16S rRNA sin gradiente de temperatura en el annealing evidencia la naturaleza de las muestras al ser de suelo según la cantidad de bandas que se obtienen en el gel. Es posible que dichas bandas pertenezcan a protozoarios, hongos, bacterias, arqueas, insectos e incluso al ser humano. Los primers son universales, no específicos y uno de ellos presenta 100% de homología con organismos eucariotas, por esta razón la banda de 100 pares de bases continúa apareciendo en todos los carriles del gel. El control negativo solo presenta dicha banda lo que demuestra que no existió contaminación con ADN de bacterias pero sí con ADN de eucariotas, confirmando la contaminación de los primers de febrero de 2013 con ADN bacteriano.

La reacción de amplificación con los primers nuevos del gen 16S rRNA con gradiente de temperatura en el annealing mostró una cantidad mayor de bandas inespecíficas que la PCR sin gradiente porque al cambiar la temperatura de annealing en cada segmento se da un mayor rango de unión de los primers a las secuencias nucleotídicas que no son de bacterias y que están presentes en las muestras; el control negativo confirma la contaminación de las muestras con ADN eucariota.

Al probar diferentes temperaturas de annealing con cada muestra y utilizar el protocolo sin gradiente de temperatura en esta etapa, se observó que la unión inespecífica de los primers continuó y que no existió amplificación del gen 16S rRNA, sin embargo la unión inespecífica solo estuvo presente en las muestras de la Reserva Ecológica Mache – Chindul, ya que ningún control, sea positivo o negativo mostró estas bandas inespecíficas. Esto confirma que la naturaleza de las muestras es uno de los factores que contribuye a la unión inespecífica de los cebadores. La temperatura más adecuada para obtener menos bandas inespecíficas fue 67,3°C como se observa en la amplificación de la muestra 12-02.

Todos los controles de esta PCR presentaron una banda de 100 pares de bases, lo que determina que no existió contaminación bacteriana en esta reacción de amplificación pero sí contaminación eucariota.

Debido a todo lo expuesto anteriormente, las muestras analizadas mediante DGGE fueron las amplificaciones con los primers del gen 16S rRNA de febrero de 2013.

4.2.2. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

4.2.2.1. Estación Biológica Bilsa

Al ser la Estación Biológica Bilsa territorio donde el bosque no se encuentra fragmentado, el patrón de bandas resultante de la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante o DGGE muestra similitud en todos los carriles, lo que permite deducir que las comunidades de bacterias que habitan la EBB son las mismas en todas las muestras de su territorio debido a que este bosque no ha sido expuesto a actividades antropogénicas. Es decir, la microflora nativa de los suelos de la REMACH es la presente en esta Estación Biológica. Como se observa en la figura 20, unas bandas son menos intensas que otras, lo que reconoce que dichas bacterias al ser nativas del bosque húmedo tropical, requieren de condiciones ambientales estrictas para su sobrevivencia, las cuales no se pueden recrear completamente en el laboratorio a pesar de que la técnica ayuda con este problema, por lo que se perdería una pequeña cantidad de ADN, reflejándose en la intensidad de las bandas en el gel de poliacrilamida.

Por otro lado, el control negativo no muestra bandas en este gel, sin embargo, la contaminación permanece al usar los primers contaminados y al tener banda de 100 pares de bases en el control negativo en el gel de agarosa. La razón de que no haya bandas en este carril se debe a que la cantidad de ADN necesaria para correr un gel de DGGE es de 5 a 10µg de material genético por pocillo, y, como se vio en el gel de agarosa, las bandas de este control son mucho menos intensas que las demás, indicando que contiene menor cantidad de ácidos nucleicos. Este hecho ayuda a sostener que, por lo tanto, las contaminaciones de los primers y del material genético eucariota no se están haciendo presentes en el gel producto del DGGE al tener las muestras poca cantidad de ADN contaminante.

4.2.2.2. Fragmento 58

En este gel se observa una banda en el control negativo mayor a 200 pares de bases, esta banda por lo tanto no se tomó en cuenta para el análisis de las comunidades de bacterias en este fragmento debido a que pertenecerían a la contaminación.

Las muestras 58-01 a 58-05 muestran mayor cantidad de bandas (entendiéndose a cada banda como una comunidad de bacterias) en cada carril lo que indica mayor diversidad bacteriana en el fragmento de bosque que en el pastizal adyacente a dicho fragmento. Las muestras 58-02 y 58-03 muestran dos bandas iguales, indicando dos comunidades de bacterias diferentes presentes en este suelo. Dichas muestras se encuentran ubicadas a 400m y 300m del borde del fragmento respectivamente. El carril con la muestra 58-04 presenta dos bandas diferentes a las de las demás muestras, demostrando que son otras comunidades de bacterias presentes a 200m del borde del fragmento. La muestra 58-05 presenta una única banda diferente a todas las demás, constituyendo otra comunidad de bacterias. Finalmente, las muestras 58-07 y 58-08 presentan una banda indicando la presencia de otra comunidad de bacterias.

4.2.2.3. Fragmento 79

Al ser el fragmento 79 el territorio cuyo bosque no está conservado se observa que todas las muestras, tanto las que pertenecen al fragmento de bosque como las pertenecientes al pastizal poseen las mismas comunidades de bacterias, siendo iguales las bandas de 100 pares

de bases a las bandas presentes en las muestras 07 y 08 del fragmento 58. Según Bustamante & Grez, (1995), un aspecto importante de la fragmentación de los ecosistemas es la facilidad que nuevas especies poseen para invadir el fragmento desde la matriz que lo rodea debido a los cambios microclimáticos que este fenómeno produce.

Por otra parte, el control negativo no presenta bandas, sin embargo, la contaminación permanece al usar los primers contaminados y al tener banda de 100 pares de bases en el control negativo en el gel de agarosa. La razón de que no haya bandas en este carril se debe a que la cantidad de ADN necesaria para correr un gel de DGGE es de 5 a 10µg de material genético por pocillo, y, como se vio en el gel de agarosa, las bandas de este control son mucho menos intensas que las demás, indicando que contiene menor cantidad de ácidos nucleicos. Este hecho ayuda a sostener que, por lo tanto, las contaminaciones de los primers y del material genético eucariota no se están haciendo presentes en el gel producto del DGGE de este fragmento al tener las muestras poca cantidad de ADN contaminante.

Capítulo V

Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

Menos del 1% de los microorganismos observados bajo el microscopio están cultivados y caracterizados, por lo que los ecosistemas del suelo en cuanto a bacterias son, en gran medida, desconocidos. La diversidad microbiana describe la complejidad y variabilidad de los ecosistemas a diferentes niveles de organización biológica.

- Los primers no son específicos para bacterias, son universales (procariotas) y presentan homología con regiones conservadas del gen 18S SSU rRNA de los eucariotas, 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 en esta tesis, ya que incluso con los primers nuevos se obtuvieron bandas inespecíficas y no hubo amplificación del gen 16S rRNA. Existieron problemas con la temperatura en la etapa de annealing puesto que con los primers de febrero de 2013 funcionó mejor el protocolo con gradiente de temperatura, mientras que con los primers nuevos el protocolo de PCR sin gradiente mostró menos uniones inespecíficas.
- Los primers del gen 16S rRNA de febrero de 2013 estuvieron contaminados con ADN de bacterias debido a que no se los alicuotó.
- Al realizar los controles de la PCR de prueba solo con un juego primers (julio 2013), no se pudo tener una visión clara de la contaminación desde el principio del estudio.
- Según Raymond et al., (2008), la secuencia del primer 338F es 5'-actcctacgggaggcacg-3', sin embargo según varios estudios de distintos autores: Bakke et al., (2011); Lucretia, Tamara, & Roshini, (2014); Park & Crowley, (2005); Muyzer, De Waal, & Uitterlinden, (1993); Piterina, Bartlett, & Pembroke, (2010); DeJournett, Arnold, & LaPara, (2007) la secuencia del 338F es 5'-actcctacgggaggcagcag- 3'. Los primers se sintetizaron bajo pedido de acuerdo al protocolo de Raymond et al., (2008), lo que pudo afectar a las reacciones de amplificación.

El patrón de bandas obtenido a partir del DGGE del gen 16S rRNA permitió un análisis rápido de la estructura de las comunidades bacterianas mediante un análisis de presencia/ausencia de bandas, en el cual cada banda representó una comunidad bacteriana dentro de los ecosistemas analizados de la REMACH.

- 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.
- Las bacterias del suelo de los pastizales de la REMACH son mayormente resistentes a los cambios ambientales que las bacterias nativas de su bosque al obtenerse bandas más intensas en el gel de poliacrilamida del fragmento 79 que en los geles de la Estación Biológica Bilsa y el fragmento 58.
- 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, como lo afirma la teoría.
- Las consecuencias del efecto de borde se hacen visibles en este fragmento al presentarse una sola comunidad de bacterias a 100m del borde hacia el interior del fragmento de bosque y ni una sola a 100m del borde hacia el interior del pastizal.
- Las muestras del fragmento 79 evidencian la invasión de microorganismos desde el pastizal hacia el fragmento de bosque sin la presencia de una banda parecida a los ecosistemas conservados. Existen dos comunidades de bacterias mientras que en el fragmento 58 existen cinco, lo que confirma la pérdida de diversidad microbiana.
- Una comunidad de bacterias se hizo presente tanto en el pastizal del fragmento 58 como en el fragmento 79, confirmando la invasión de comunidades microbianas desde la matriz hacia el fragmento.
- La aplicación de la técnica del DGGE permitió obtener fragmentos de ADN bacteriano a partir del gel resultante, los que posteriormente podrán ser secuenciados.
- Fue necesario reducir el tiempo de la corrida electroforética del DGGE para poder observar las bandas dentro del gel. El protocolo de Chistoserdov, (2004), menciona que se deje corriendo las muestras de 14 a 16 horas, para este trabajo se corrieron durante 5 horas.

- Al estar caducado el persulfato de amonio, se tuvo que colocar el doble de la cantidad requerida para que el gel solidifique.

5.2. Recomendaciones

- ✓ Las muestras deben ser analizadas en un tiempo corto después de ser colectadas con el objetivo de reducir posibles variaciones de la flora bacteriana.
- ✓ Para optimizar la PCR se debería realizar ensayos de prueba y error tiempo antes de comenzar el análisis de las muestras. Así, cuando llegue el momento de analizar las muestras con las que trabajará el estudio solo se debe seguir el protocolo estandarizado, evitando retrasos en la investigación.
- ✓ Es importante esterilizar siempre todos los equipos y materiales con los que se va a realizar la PCR para evitar contaminación cruzada.
- ✓ 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 alternativa son los primers rpoB que amplifican la subunidad β de la RNA polimerasa de las bacterias. Véase el artículo de Peixoto, da Costa Coutinho, Rumjanek, Macrae, & Rosado, (2002).
- ✓ Otra alternativa es la realización de una PCR anidada con el objetivo de eliminar ADN eucariota de las muestras. Véase el estudio publicado por Bakke et al., (2011).
- ✓ Probar el protocolo de PCR de Bakke et al., (2011) para los primers 338F y 518R.
- ✓ Se recomienda siempre tener alícuotas de los reactivos y componentes ya que en caso de tener problemas de contaminación cruzada entre muestras o contaminaciones con preparados anteriores de ADN, estas pueden ser desechadas sin afectar el total de reactivos o componentes.
- ✓ Si se tienen dos pares de primers es importante probarlos con controles positivos y negativos a cada uno.
- ✓ Confirmar la secuencia del primer 338F.
- ✓ El DGGE es una herramienta adecuada para el análisis de las comunidades de bacterias del suelo, sin embargo, al arrojar solamente datos de la presencia/ausencia de bandas en los geles, no es posible una comparación exacta de las comunidades de bacterias. De aquí nace la necesidad del secuenciamiento de dichas bandas para obtener datos cualitativos precisos. El secuenciamiento es el complemento de la técnica del DGGE.

- ✓ Con el fin de evitar problemas durante la corrida electroforética del DGGE, se recomienda limpiar cuidadosamente con agua destilada los electrodos de la cámara y el soporte antes y después de cada corrida.
- ✓ De igual manera es necesario establecer lugares de trabajo para cada uno de los pasos de la metodología con su respectivo material, reduciendo considerablemente el riesgo de contaminación.
- ✓ Finalmente, se recomienda revisar la fecha caducidad de todos los reactivos necesarios para cada técnica antes de empezar el estudio.

Capítulo VI

Referencias

Alef, K., & Nannipieri, P. (2007). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. *Journal of Applied Ecology* (Vol. 33). http://doi.org/10.2460/ajvr.75.7.613

Bakke, I., De Schryver, P., Boon, N., & Vadstein, O. (2011). PCR-based community structure studies of Bacteria associated with eukaryotic organisms: A simple PCR strategy to avoid co-amplification of eukaryotic DNA. *Journal of Microbiological Methods*, *84*(2), 349–351. http://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.12.015

Bélanger, N., & Van Rees, C. (2006). Soil Sampling and Methods of Analysis. In *Soil Sampling and Methods of Analysis* (Second, Vol. 44, p. 823). Saskatoon, Saskatchewan, Canada. http://doi.org/10.1017/S0014479708006546

Borneman, J., & Triplett, E. W. (1997). Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(7), 2647–2653.

Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J., & Noller, H. F. (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli (recombinant plasmids/DNA sequence analysis/rrnB cistron). *Biochemistry*, *75*(10), 4801–4805. http://doi.org/Doi 10.1073/Pnas.75.10.4801

Bunge, J., Willis, A., & Walsh, F. (2014). Estimating the Number of Species in Microbial Diversity Studies. *Annual Review of Statistics and Its Application*, *1*(1), 427–445. http://doi.org/doi:10.1146/annurev-statistics-022513-115654

Bustamante, R., & Grez, A. (1995). Consecuencias ecológicas de la fragmentación de los bosques nativos.

Carrasco, L., Berg, K., Litz, J., Cook, A., & Karubian, J. (2013). Avifauna of the Mache Chindul Ecological Reserve, Northwest Ecuador. *Ornitologia Neotropical*, *164*(1), 151–161.

http://doi.org/10.1007/s00442-010-1655-8

Carrasco, L., Cook, A., & Karubian, J. (2008). Extensión del rango de distribución de ocho especies de aves en las montañas de Mache-Chindul, Ecuador. *Cotinga*, *29*, 72–76.

Castro, H. F., Classen, A. T., Austin, E. E., Norby, R. J., & Schadt, C. W. (2010). Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(4), 999–1007. http://doi.org/10.1128/AEM.02874-09

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*, *69*(2), 330–339. http://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005.A

Chistoserdov, A. (2004). *Microbial DGGE Protocol*.

Cisneros, D., Delia, J., Yánez, M. H., & Ortega, H. M. (2010). Endemic Ecuadorian glassfrog Cochranella mache is Critically Endangered because of habitat loss. *Oryx*, *44*(01), 114. http://doi.org/10.1017/S0030605309990640

Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. *Nature Reviews. Microbiology*, *3*(6), 470–478. http://doi.org/10.1038/nrmicro1160

DeJournett, T. D., Arnold, W. A., & LaPara, T. M. (2007). The characterization and quantification of methanotrophic bacterial populations in constructed wetland sediments using PCR targeting 16S rRNA gene fragments. *Applied Soil Ecology*, *35*(3), 648–659. http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.09.006

Engel, K., Pinnell, L., Cheng, J., Charles, T. C., & Neufeld, J. D. (2012). Nonlinear electrophoresis for purification of soil DNA for metagenomics. *Journal of Microbiological Methods*, *88*(1), 35–40. http://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.10.007

FAO. (2010). Extensión de los recursos forestales (pp. 11–36).

Fernández, M., & Le Borgne, S. (1987). DGGE : electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, 149–174.

Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, *88*(6), 1354–1364. http://doi.org/10.1890/05-1839

Gonzalez, I. L., & Schmickel, R. D. (1986). The human 18S ribosomal RNA gene: evolution and stability. *American Journal of Human Genetics*, *38*(4), 419–27.

http://doi.org/citeulike-article-id:605092

González, Y., Tapia, M., & Valdivieso, M. (2009). *La Universidad Católica de Loja " Estado actual de las áreas protegidas y bosques protectores de la región sur del Ecuador y su marco jurídico a mbiental " Ximena Yadira González Rentería*. Universidad Técnica Particular de Loja.

Herrera, M. (n.d.). *Filogenia Bacteriana mediante el Análisis del rRNA 16S*.

Herrera, M., Elao, R., & Ecocostas. (2007). *Análisis de Amenazas a la Biodiversidad en el Estuario de Cojimies (Ecuador)*. Universidad de Rhode Island, Narragansett.

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(9), 2761–2764. http://doi.org/10.1128/JCM.01228-07

Jongsma, G. F., Hedley, R. W., Durães, R., & Karubian, J. (2014). Amphibian Diversity and Species Composition in Relation to Habitat Type and Alteration in the Mache – Chindul Reserve , Northwest Ecuador. *Herpetologica*, *70*(1), 34–46. http://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-12-00068

Lozupone, C., & Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *PNAS*, *104*(27), 11436–11440. Retrieved from www.pnas.org/cgi/doi/10.107/pnas.0611525104

Lucretia, R., Tamara, B., & Roshini, G. (2014). Method optimization for denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of microflora from Eucalyptus sp. wood chips intended for pulping. *African Journal of Biotechnology*, *13*(3), 356–365. http://doi.org/10.5897/AJB2013.12899

MAE. (2012). Comité de Gestión de la Reserva Ecológica Mache Chindul, (1), 1–2.

MoBio Laboratories, I. (2015). PowerSoil® DNA Isolation Kit, (12888), 1–16. Retrieved from http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/12888.pdf

Morcillo, F., Intriago, J., & Pincay, J. C. (2010). PLAN DE MANEJO Y GESTION PARTICIPATIVA DE LA RESERVA ECOLÓGICA MECHE CHINDUL.

Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*,

59(3), 695–700. http://doi.org/0099-2240/93/030695-06$02.00/0

Nava-Cruz, Y., Maass-Moreno, M., Briones-Villareal, O., & Mendez-Ramirez, I. (2007). Evaluation of the edge effect on two arboreal species of the tropical dry forest of Jalisco, Mexico. *Agrociencia*, *41*, 111–120. Retrieved from <Go to ISI>://000243547200011

Nusslein, K., & Tiedje, J. M. (1999). Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(8), 3622–3626.

Odum, E. (2007). *Fundamentos de Ecología* (Sexta edic).

Olivo, J., González, M., Browne, L., Walter, S., & Karubian, J. (2015). *Estudio de la diversidad de aves en fragmentos de bosque en la Reserva Ecológica Mache-Chindul*.

ONU. (1992). Convenio sobre la Diversidad Biológica, 30.

Park, J. W., & Crowley, D. E. (2005). Normalization of soil DNA extraction for accurate quantification real-time PCR and of target genes by DGGE. *BioTechniques*, *38*(4), 579–586. http://doi.org/10.2144/05384ST04

Peixoto, R. S., da Costa Coutinho, H. L., Rumjanek, N. G., Macrae, A., & Rosado, A. S. (2002). Use of rpoB and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Lett Appl Microbiol*, *35*(4), 316–320. http://doi.org/1183 [pii]

Piterina, A. V., Bartlett, J., & Pembroke, J. T. (2010). Molecular analysis of bacterial community DNA in sludge undergoing autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD): Pitfalls and improved methodology to enhance diversity recovery. *Diversity*, *2*(4), 505–526. http://doi.org/10.3390/d2040505

Raymond, B., Lijek, R. S., Griffiths, R. I., & Bonsall, M. B. (2008). Ecological consequences of ingestion of Bacillus cereus on Bacillus thuringiensis infections and on the gut flora of a lepidopteran host. *Journal of Invertebrate Pathology*, *99*(1), 103–111. http://doi.org/10.1016/j.jip.2008.04.007

Refardt, D., Canning, E. U., Mathis, A., Cheney, S. A., Lafranchi-Tristem, N. J., & Ebert, D. (2002). Small subunit ribosomal DNA phylogeny of microsporidia that infect *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). *Parasitology*, *124*(4), 381–389. http://doi.org/10.1017/S0031182001001305

Rivera, J. (2007). Guía del Patrimonio de Áreas Naturales Protegidas del Ecuador. ECOFUND, FAN, IGM. *ECOLAP Y MAE*. Retrieved from DarwinNet

Santero, E., Floriano, B., & Govantes, F. (2016). Harnessing the power of microbial metabolism. *Current Opinion in Microbiology*, *31*, 63–69. http://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.003

Saunders, D., Hobbs, R., & Margules, C. (1991). Biological Consequences of Ecosystem Fragmentation : A Review, *5*(1), 18–32.

Torres, C. (2014). *"Estructura de las comunidades bacterianas de los ecosistemas con intervención antropogénica de la Reserva Biológica Limoncocha."* Universidad Internacional SEK.

Veintimilla, F. (2014). *"Estructura de las comunidades bacterianas de los ecosistemas prístinos de la Reserva Biológica Limoncocha."* Universidad Internacional SEK.

Anexos

Anexo A: Cuantificación del ADN extraído con el protocolo de MoBio Laboratories

Tabla 6. Cuantificación material genético Estación Biológica Bilsa

Elaborado por: Aguilar, 2016

Bilsa	Concentración (ng/µL)	260/280
1	25,40	1,74
2	16,40	1,74
3	4,00	1,51
4	6,10	1,62
5	3,70	1,45
6	19,10	1,73
7	32,50	1,80
8	17,10	1,76
9	44,50	1,84
10	20,20	1,77

Tabla 7. Cuantificación material genético fragmento 12

Elaborado por: Aguilar, 2016

Fragmento 12	Concentración (ng/µL)	260/280
1	80,20	1,86
2	40,80	1,88
3	38,00	1,84
4	23,40	1,92
5	31,00	1,87
6	16,20	1,96
7	15,60	1,94
8	10,70	1,91
9	7,70	1,82
10	26,90	1,84

Tabla 8. Cuantificación material genético fragmento 58

Elaborado por: Aguilar, 2016

Fragmento 58	Concentración (ng/µL)	260/280
1	2,30	1,46
2	19,40	1,79
3	18,80	1,68
4	25,90	1,79
5	22,10	1,79
6	30,00	1,75
7	37,90	1,83
8	4,70	1,41
9	3,90	1,43
10	7,70	1,51

Tabla 9. Cuantificación material genético fragmento 63

Elaborado por: Aguilar, 2016

Fragmento 63	Concentración (ng/µL)	260/280
1	8,10	1,51
2	5,50	1,65
3	16,90	1,89
4	22,80	1,86
5	18,30	1,74
6	15,00	1,75
7	3,50	1,52
8	23,10	1,78
9	11,50	1,78

Tabla 10. Cuantificación material genético fragmento 77

Elaborado por: Aguilar, 2016

Fragmento 77	Concentración (ng/µL)	260/280
1	10,00	1,78
2	30,90	1,78
3	29,90	1,87
4	37,60	1,85
5	31,10	1,87
6	17,70	1,69
7	1,60	1,70
8	21,90	1,74
9	9,70	1,71
10	3,80	1,47

Tabla 11. Cuantificación material genético fragmento 79

Elaborado por: Aguilar, 2016

Fragmento 79	Concentración (ng/µL)	260/280
1	24,30	1,82
2	17,30	1,74
3	19,00	1,79
4	28,00	1,82
5	29,70	1,87
6	20,50	1,80
7	16,40	1,72
8	27,20	1,86
9	3,30	1,47
10	7,40	1,74

Anexo B: Cuantificación del material genético posterior a la amplificación

Tabla 12: Cuantificación material genético posterior a la amplificación fragmento 63

Elaborado por: Aguilar, 2016

Fragmento 63	Concentración (ng/µL)	260/280
1	1279,7	1,81
2	1417,6	1,81
3	1243,4	1,81
4	1042,2	1,80
5	1012,5	1,82
6	1278,3	1,80
7	1278,3	1,81
8	1205,9	1,79
9	1122,8	1,82

Anexo C: Imágenes originales de las reacciones de amplificación

Figura 24: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA 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.

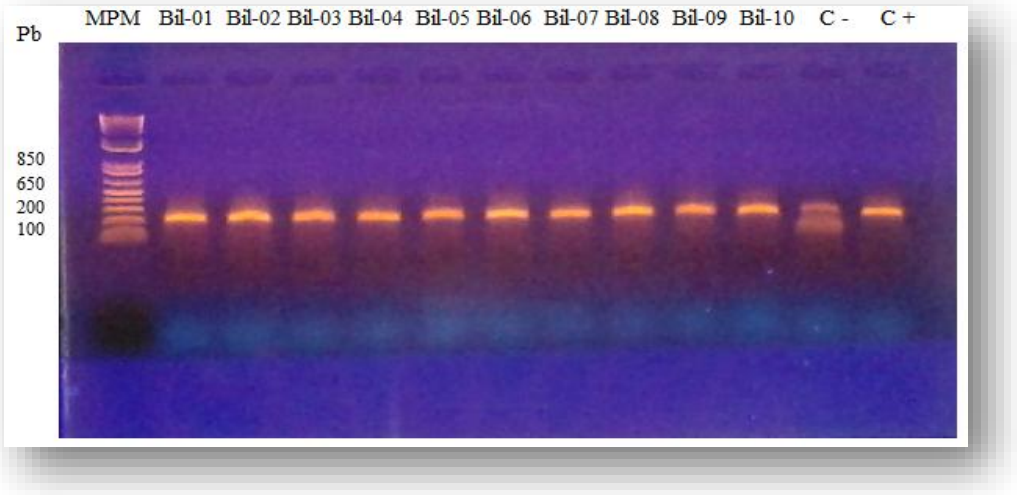


Figura 25: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 12. MPM (1kb), 1) Bosque, 2) Bosque, 3) Bosque, 4) Bosque, 5) Bosque, 6) Pastizal, 7) Pastizal, 8) Pastizal, 9) Pastizal, 10) Pastizal, 11) Control negativo, 12) Control positivo.

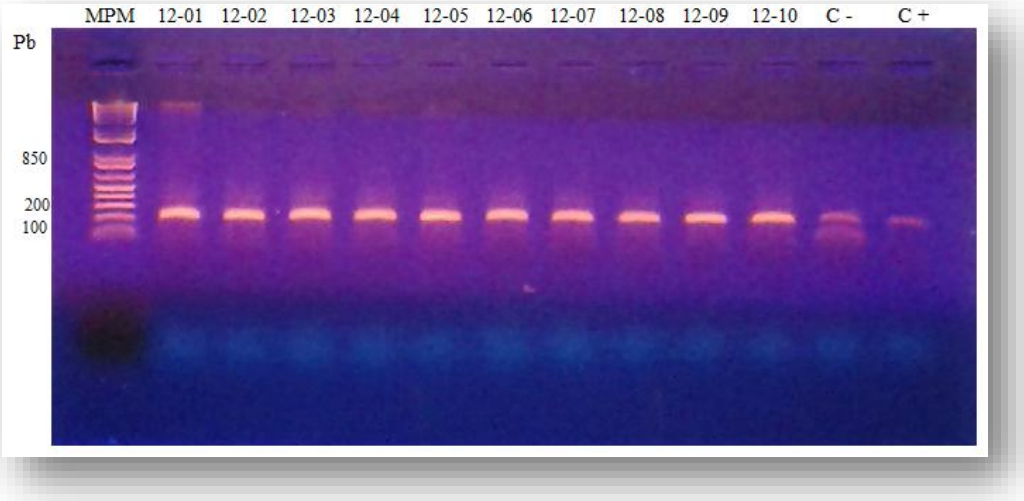


Figura 26: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 58. MPM (1kb), 1) Bosque, 2) Bosque, 3) Bosque, 4) Bosque, 5) Bosque, 6) Pastizal, 7) Pastizal, 8) Pastizal, 9) Pastizal, 10) Pastizal, 11) Control negativo, 12) Control positivo.

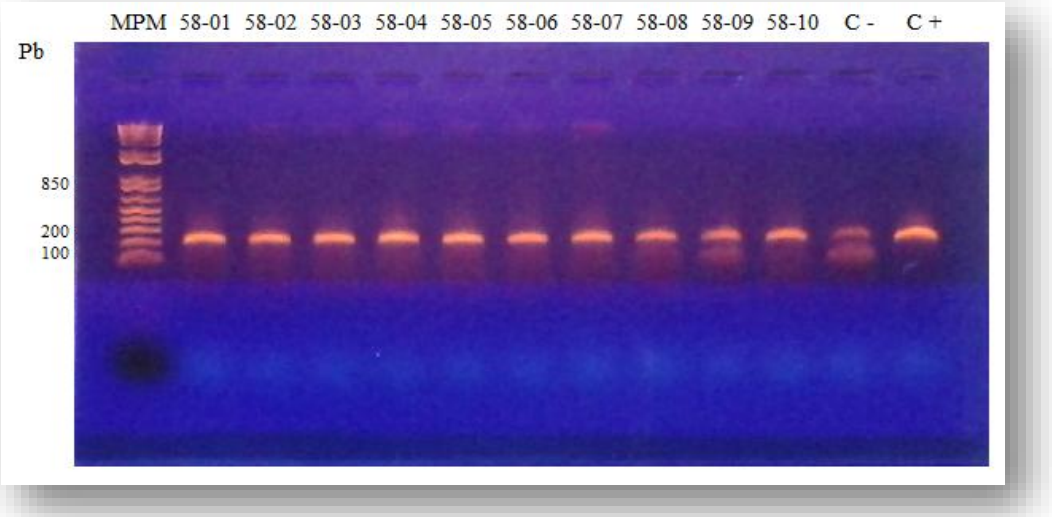


Figura 27: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 63. MPM (1kb), 1) Bosque, 2) Bosque, 3) Bosque, 4) Bosque, 5) Bosque, 6) Pastizal, 7) Pastizal, 8) Pastizal, 9) Cultivo, 10) Control negativo, 11) Control positivo.

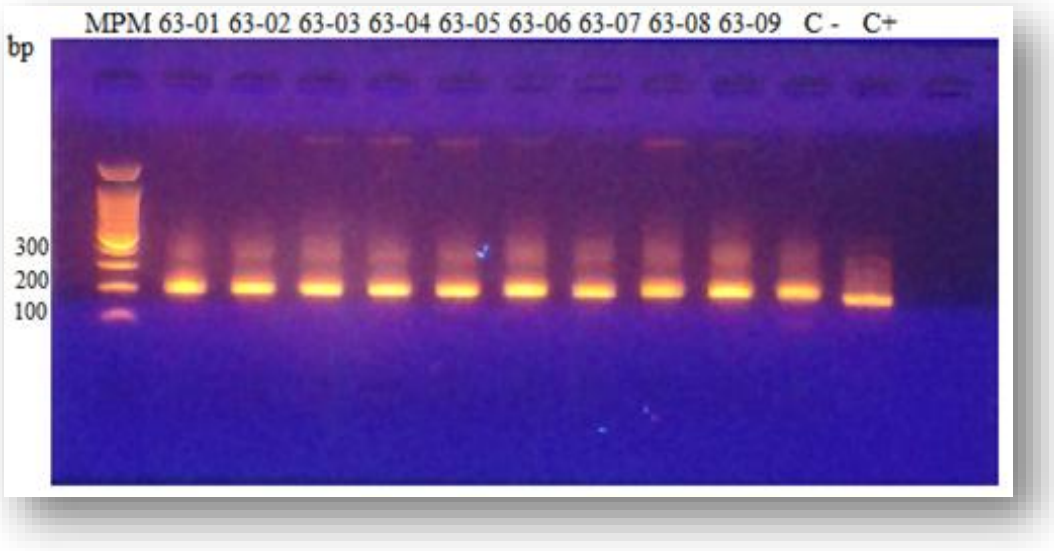


Figura 28: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 77. MPM (1kb), 1) Bosque, 2) Bosque, 3) Bosque, 4) Bosque, 5) Bosque, 6) Cultivo, 7) Cultivo, 8) Cultivo, 9) Cultivo, 10) Cultivo, 11) Control negativo, 12) Control positivo.

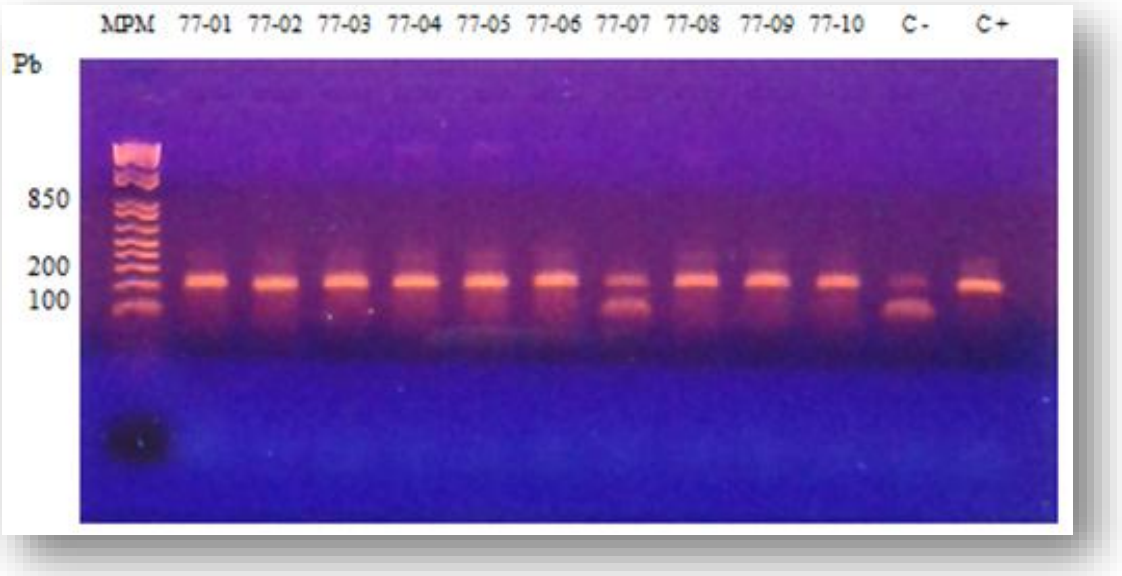


Figura 29: Gel de agarosa (1,5%). Comprobación de la amplificación del gen 16s rRNA del fragmento 79. MPM (1kb), 1) Bosque, 2) Bosque, 3) Bosque, 4) Bosque, 5) Bosque, 6) Pastizal, 7) Pastizal, 8) Pastizal, 9) Pastizal, 10) Pastizal, 11) Control negativo, 12) Control positivo.

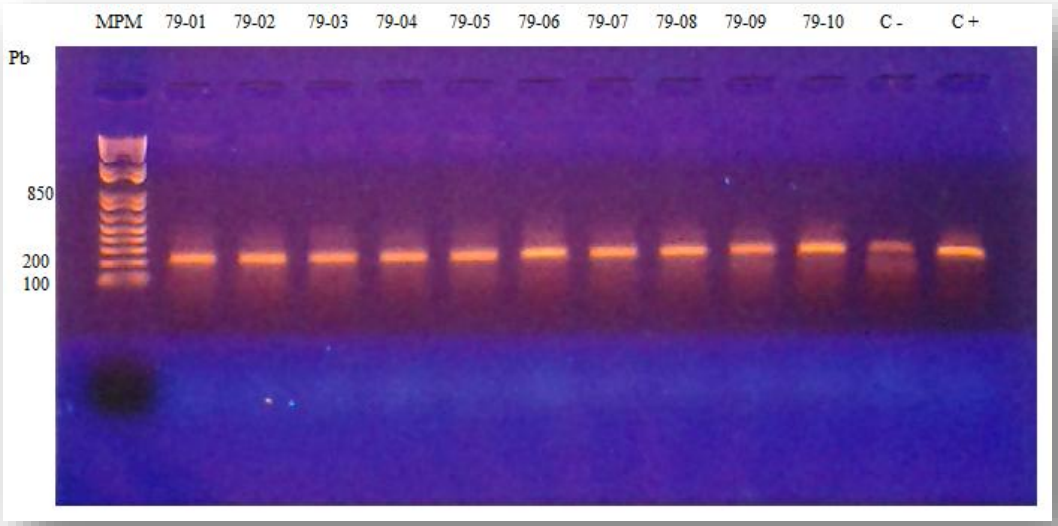


Figura 30: DGGE Estación Biológica Bilsa

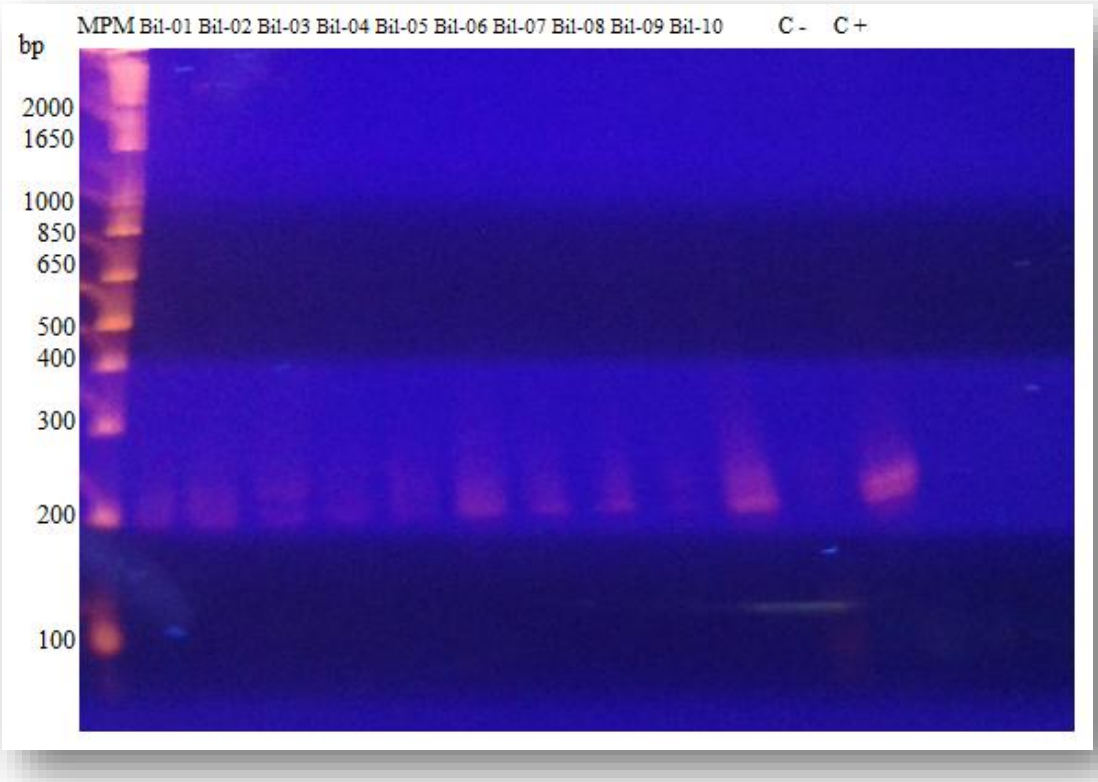


Figura 31: DGGE fragmento 58

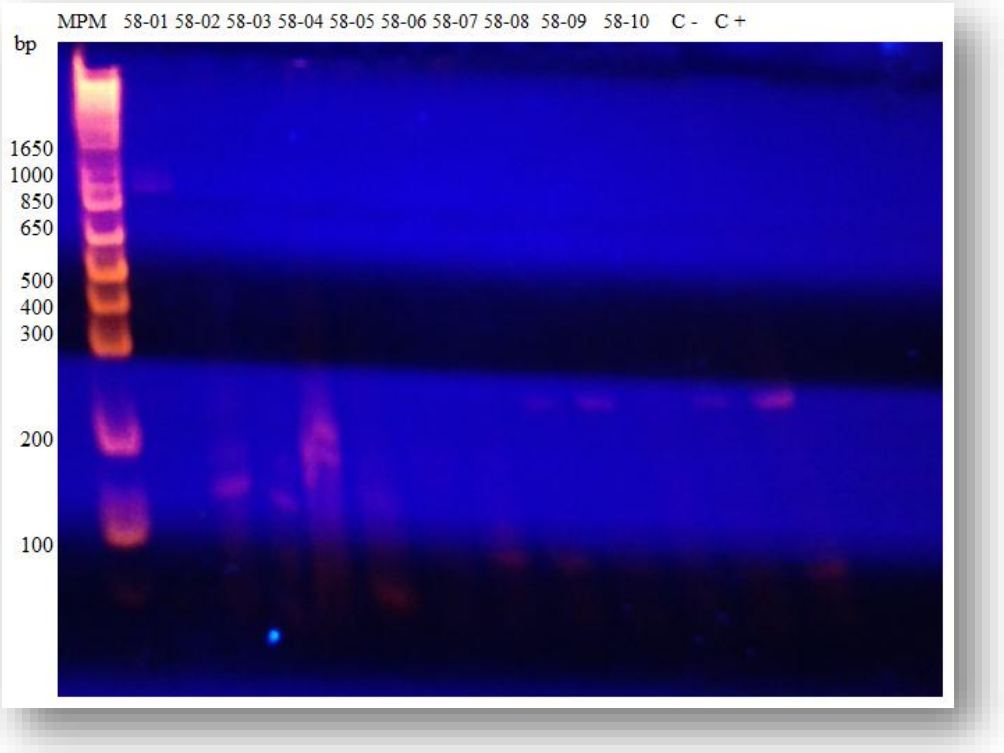
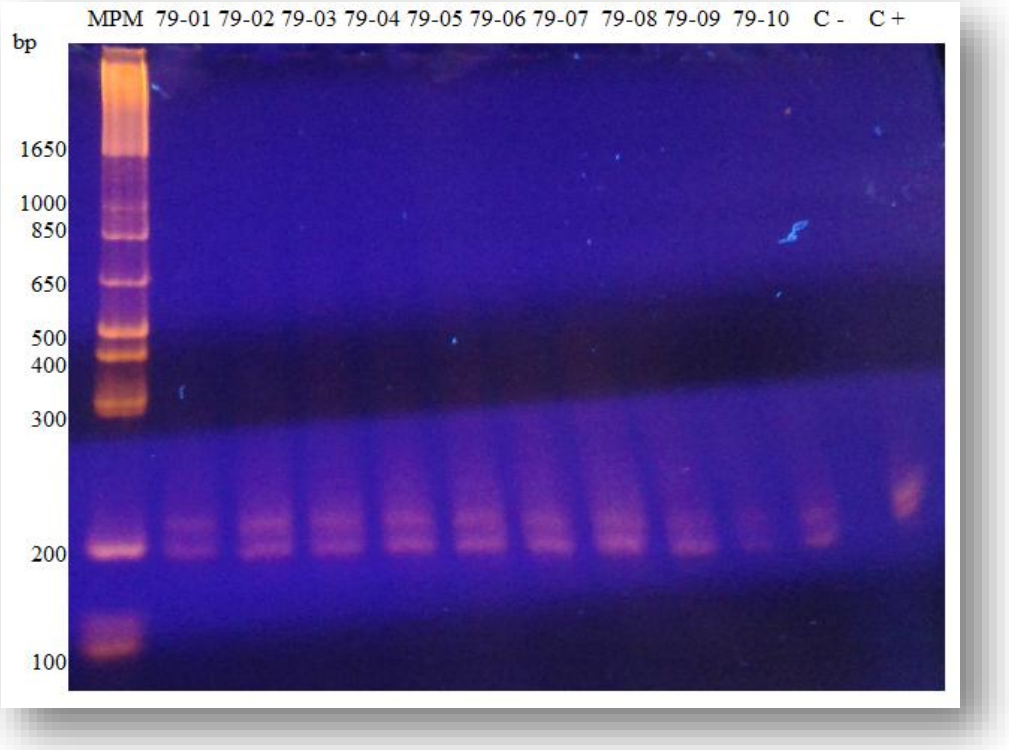


Figura 32: DGGE fragmento 79



Anexo D: PCR y Electroforesis en gel de agarosa

Figura 33: Cargamiento de muestras en el gel

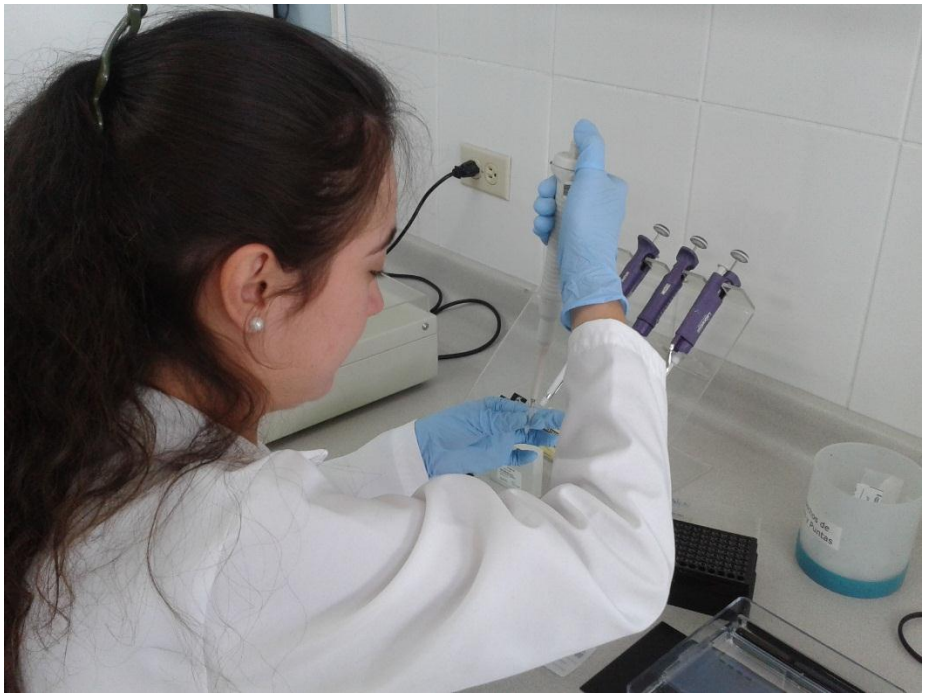


Figura 34: Primers 338F y 518R

Anexo E: DGGE

Figura 35: Muestras cargadas para el DGGE

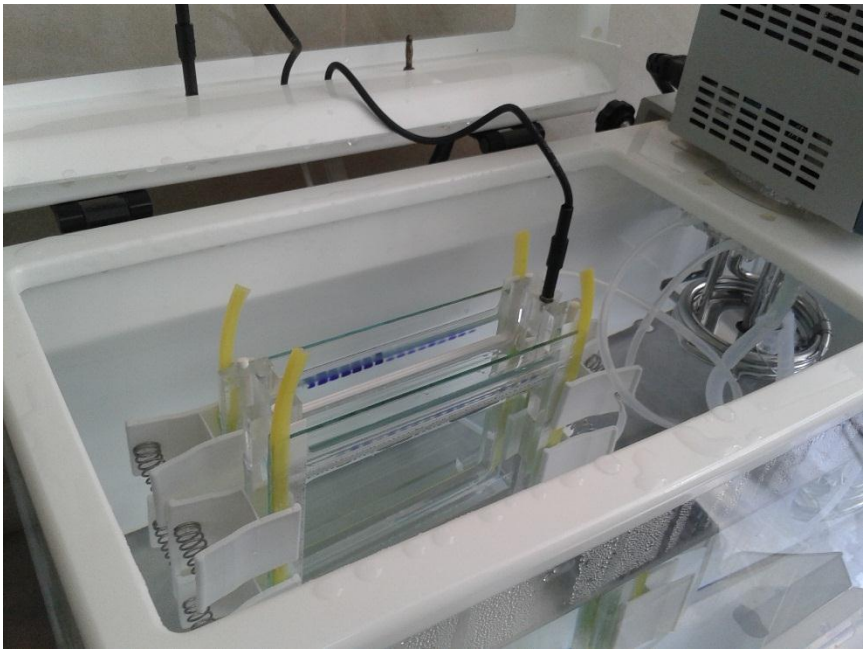


Figura 36: Corrida electroforética DGGE