RESUMEN EJECUTIVO

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

María Isabel Aguilar Del Pozo*

*Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Ingeniería en Biotecnología, Quito, Ecuador.

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, anthropogenic intervention, Ecuador, DGGE.

Introducción

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 cerca del 30% 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).

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).

La Reserva Ecológica Mache-Chindul (REMACH), con una extensión de 121376 ha entre las Provincias de Manabí y Esmeraldas, cubre uno de los pocos bosques húmedos remanentes y secos tropicales del Ecuador. En su territorio se han inventariado 1434 especies de flora, distribuidas en 624 géneros y 149 familias; de estos registros, el 8% (111 especies) corresponde a especies endémicas, sin embargo, la mayoría presenta alguna categoría de amenaza.

En cuanto 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.

La Reserva es una de las 33 áreas naturales que conforman el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP). 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 distintas provincias, de principalmente Manabí) continúan de 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.

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.

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 de los fragmentos de bosque y la matriz que los rodea.

Siendo el objetivo "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" mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE).

Materiales y Métodos

Muestreo

Para el muestreo se escogieron 5 fragmentos de bosque ubicados al sureste de la REMACH y territorio en la Estación Biológica Bilsa (bosque no fragmentado), los cuales se delimitaron previamente mediante fotografía satelital de la cobertura vegetal de la zona en estudio.

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 se colecten solamente nueve muestras en total.

Extracción del ADN microbiano

Para extraer el ADN microbiano de las muestras de suelo se usó el PowerSoil DNA Isolation Kit de MoBio Laboratories al ser el protocolo que mejor separa compuestos fenólicos y ácidos húmicos del material genético.

Reacción de amplificación (PCR)

Para la PCR de este tipo de estudios típicamente se utilizan fragmentos del gen 16S rRNA de la subunidad ribosomal pequeña o SSU rRNA. Los primers que se usaron fueron el 338F; 5'actcctacgggaggcagcag-3'; y el 518R; 5'attaccgcggctgctgg-3' correspondientes a E. coli. Estos primers amplifican de manera eficiente un fragmento de aproximadamente 200 pb para la mayoría de taxones de bacterias (Bakke, De Schryver, Boon, & Vadstein, 2011).

Para el análisis de la amplificación de los productos de PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, el marcador que se usó fue el TrackIt 1Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen.

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 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 los rpoB1698f (5'-aacatcggtttgatcaac-3'; correspondiente a la posición 1643 en E. coli) y rpoB2041r (5'-cgttgcatgttggtacccat-3'; correspondiente a la posición 2041 en E. Una grapa de GC coli). (5' cgcccccgcgccccgcgcccggcccgcccccccccc c-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.

Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

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.

Resultados

Reacciones de amplificación PCR de la Estación Biológica Bilsa y los cinco fragmentos de bosque de la REMACH.

Figura 1: 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 2: 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 3: 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 4: 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 5: 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 6: 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.



Ensayos	propuestos	para	evitar	la
contamina	ción			

PCR con primers rpoB

Figura 7: 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.



Corrida electroforética de los primers

Figura 8: 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.



PCR sin gradiente de temperatura en el annealing

Figura 9: 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.



PCR con gradiente de temperatura en el annealing

Figura 10: 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.



PCR con diferentes temperaturas de annealing

Tabla 5: Temperaturas de annealing paracada muestra

Elaborado por: Aguilar, 2016

Muestra	Temperatura
	(°C)
12-01; C- 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

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



Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Estación Biológica Bilsa

Figura 12: 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



Fragmento 58

Figura 13: 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



Fragmento 79

Figura 14: 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



Discusión

PCR y electroforesis en gel de agarosa

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.

Figura 15: 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, Palmer, Kennedy, & Noller, 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.

	↓518
<i>Escherichia</i> (Poteobacteria)	cgtg <i>ccagcagccgcggtaat</i> acg
<i>Microsporidium</i> (Fungi)	gc
<i>Gadus</i> (Metazoa)	gt.c
<i>Homo sapiens</i> (Eukarya)	ggtgtcc

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.

Ensayos propuestos para evitar la contaminación

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, insectos e incluso al ser humano. El control negativo solo presenta banda de 100bp 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. *Electroforesis en gel con gradientes desnaturalizante (DGGE)*

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 sido expuesto actividades ha a 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 requieren de condiciones tropical, ambientales estrictas para su sobrevivencia, cuales pueden las no se 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.

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.

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 bandas, embargo, sin presenta 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.

Conclusiones

Los primers no son específicos para bacterias, son universales 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 338F secuencia del primer es 5'actcctacgggaggcacg- 3', sin embargo según varios estudios de distintos autores: (Bakke et al., 2011); (Lucretia, Tamara, & Roshini, 2014); (Muyzer, De Waal, & Uitterlinden, 1993); (Piterina, Bartlett, & Pembroke, 2010); (DeJournett, Arnold, & LaPara, 2007) secuencia del 338F es la 5'actcctacgggaggcagcag- 3'. Los primers se sintetizaron bajo pedido de acuerdo al protocolo de (Raymond et al., 2008), lo que afectar а las reacciones pudo de amplificación.

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.

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.

Bibliografía

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 coamplification of eukaryotic DNA. *Journal of Microbiological Methods*, 84(2), 349–351. http://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.12. 015

- 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
- 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
- FAO. (2010). Extensión de los recursos forestales (pp. 11–36).
- 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-articleid: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., Elao, R., & Ecocostas. (2007). Análisis de Amenazas a la Biodiversidad en el Estuario de Cojimies (Ecuador). Universidad de Rhode Island, Narragansett.
- 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

- 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. Appl Environ Microbiol, 59(3), 695–700.
- 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/S0031182001001 305