



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE COMUNIDADES BACTERIANAS  
DEL SUELO PRESENTES EN UNA MUESTRA DEL CORREDOR MONOS  
(FILANDIA-QUINDÍO)**

PROYECTO DE GRADO

LYNA XIMENA BEJARANO BONILLA

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
BIOLOGÍA  
CALI  
2014**

**IDENTIFICACION MOLECULAR DE COMUNIDADES BACTERIANAS  
DEL SUELO PRESENTES EN UNA MUESTRA DEL CORREDOR MONOS  
(FILANDIA-QUINDÍO)**

Proyecto de grado

LYNA XIMENA BEJARANO BONILLA

Tutor

Edgar Barrera Sabogal

Co-tutor

William Vargas

Profesor y Director de Programa de Biología

UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
BIOLOGÍA  
CALI  
2014

## Tabla de Contenido

	Pg.
1. Introducción	10
2. Problema de investigación	12
2.1. Planteamiento de la pregunta de investigación	13
3. Marco de referencia	14
3.1. Antecedentes	14
3.2. Marco teórico	15
3.2.1. Restauración ecológica	15
3.2.2. Corredores Biológicos	16
3.2.3. Suelo y Microorganismos	17
3.2.4. Bioindicadores	18
3.2.5. Gen <i>rrs</i>	18
3.2.6. Metagenómica	19
3.2.7. PCR-DGGE (Reacción en Cadena de la Polimerasa- Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización)	20
4. Objetivo General	21
4.1. Objetivos Específicos	21
5. Metodología	22
5.1. Preparación de soluciones stock y otros reactivos	22
5.2. Recolección de muestras de suelo	22
5.3. Extracción de ADN	24
5.4. Amplificación por PCR	24
5.4.1. Selección de cebadores	24
5.5. DGGE	28
5.6. Clonación y Construcción de librería	28
5.6.1. Selección por alfa-complementación	29
5.7. Purificación de ADN plasmídico	29
5.8. Digestión enzimática y amplificación con los cebadores M13	30
5.9. Secuenciación y análisis bioinformático	30
5.10. Construcción de árbol filogenético	31
6. Resultados	32
6.1. Extracción de ADN y Amplificación por PCR	32

6.2. DGGE	36
6.3. Clonación, alfa complementación y Construcción de librería genómica	38
6.4. Purificación de ADN plasmídico	39
6.5. Digestión enzimática y amplificación	39
6.6. Secuenciación y análisis bioinformático	40
7. Discusión	41
8. Conclusiones	44
9. Recomendaciones	45
10. Referencias	46
11. Anexos	53

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de los cebadores universales seleccionados.....	25
<b>Tabla 2.</b> Condiciones finales para el coctel de PCR.....	26
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de termociclador.....	27
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de termociclador para la reamplificación de la región V3....	27
<b>Tabla 5.</b> Condiciones para una reacción de clonación.....	28
<b>Tabla 6.</b> Componentes de digestión enzimática para dos tratamientos.....	30
<b>Tabla 7.</b> Cuantificación de ADN en el NanoDrop 2000.....	35
<b>Tabla 8.</b> Conteo de colonias recombinantes.....	38

## Índice de Figuras

<b>Figura 1 .</b> Esquema del gen <i>rrs</i> .....	19
<b>Figura 2.</b> Ubicación del área de estudio.....	23
<b>Figura 3.</b> Representacion de la ubicación de las submuestras.....	23
<b>Figura 4.</b> Pasos para la recoleccion y almacenamiento de la muestra.....	23
<b>Figura 5.</b> Extracción sin modificaciones en el protocolo.....	32
<b>Figura 6.</b> Amplificación por PCR de las regiones V1-V9 y V3.....	33
<b>Figura 7.</b> PCR control de reactivos y ADN.....	33
<b>Figura 8.</b> Modificaciones en la extracción de ADN metagenómico.....	34
<b>Figura 9.</b> Amplificación de la región V3 del gen <i>rrs</i> y purificacion.....	35
<b>Figura 10.</b> PCR empleando los cebadores 518-GCF/800R.....	36
<b>Figura 11.</b> DGGE teñido con plata.....	37
<b>Figura 12.</b> Sistema de alfa-complementación para la identificación de clones bacterianos recombinantes.....	38
<b>Figura 13.</b> Purificación de ADN plasmídico de las colonias recombinantes cultivadas.....	39
<b>Figura 14.</b> Digestión enzimática con EcoR I y Hind III.....	39
<b>Figura 15.</b> Cromatograma de la muestra de Monos (V3).....	40

## Índice de Anexos

<b>Anexo 1.</b> Primera amplificación por PCR con los cebadores (27F/1492R y 518F/800R).....	53
<b>Anexo 2.</b> Proceso de estandarización de PCR.....	54
<b>Anexo 3.</b> Amplificación fallida con M13F/M13R.....	54
<b>Anexo 4.</b> DGGE corrido durante 14 horas.....	54

## Resumen

El corredor biológico Barbas-Bremen, es una Herramienta de Manejo del Paisaje (HMP) implementada en Filandia, Quindío en el año 2004, por el Instituto Alexander von Humboldt, para recuperar la conectividad entre dos fragmentos de bosque. Este corredor está compuesto por cuatro conexiones entre el cañón del río Barbas y la Reserva Forestal de Bremen. Para evaluar la eficacia biológica de ésta estrategia de restauración se han utilizado bioindicadores a escala macro (flora y fauna), pero hasta el momento no se han utilizado microorganismos de suelo. Dado que los microorganismos son uno de los principales constituyentes del suelo participando activamente en la formación de su estructura y en la descomposición de la materia orgánica; es necesario incluirlos como potenciales bioindicadores en la evaluación de los procesos de restauración de suelos. Como un alto porcentaje de microorganismos requiere condiciones específicas para su crecimiento en el laboratorio y muchos de ellos no son cultivables, es necesario hacer uso de herramientas moleculares como la metagenómica, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE). Para ello se tomaron muestras de suelo de dos zonas conectoras (corredores Monos y Pavas), una muestra de cada Bosque maduro (Barbas y Bremen) y una muestra del potrero junto al corredor Monos.

Se lograron condiciones óptimas para la extracción de ADN metagenómico libre de ácidos húmicos. Se estandarizaron las condiciones para la PCR, utilizando cinco cebadores universales (27F/1492R y 518F/800R, 518-GCF) para la amplificación de dos fragmentos V3 y V1-V9 del gen *rrs* (16S rARN). El fragmento de la región V3 se sometió a DGGE en gradiente desnaturalización de 30-70% durante 16 horas, posteriormente la tinción con plata permitió visualizar patrones de bandas que representan las comunidades bacterianas. Por otra parte el producto de PCR de la amplificación de ambos fragmentos (285 y 1499 pb) se clonó empleando TA Cloning®Kit with pCR™2.1 y células competentes de la cepa *E.coli* DH5α. Mediante el sistema de alfa-complementación se diferenciaron 56 colonias transformadas con la región V3 (285pb.) y V1-V9 (1499 pb.). Los clones se cultivaron en medio líquido Luria-Bertani con ampicilina y sus plásmidos se purificaron. Los plásmidos con el inserto de la región V1-V9 fueron digeridos con las enzimas Hind III y EcoR I para evaluar el polimorfismo de los fragmentos, pero la digestión no fue exitosa. Los plásmidos con la región V3 se enviaron a MacroGen USA para su secuenciación y posterior análisis bioinformático.

**Palabras claves:** comunidades bacterianas, gen *rrs*, metagenómica, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE).

## Abstract

The biological corridor Barbas -Bremen is a Landscape Management Tool (LMT) implemented in Filandia, Quindío in 2004 by Alexander von Humboldt Institute, to restore connectivity between two forest fragments. This corridor consists of four connections between the canyon of river Barbas and the Forest Reserve of Bremen. To evaluate the biological effectiveness of this restoration strategy macroscale bioindicators have been used (flora and fauna), but so far soil microorganisms have not been used. Given that microorganisms are one of the major soil constituents, are actively involved in soil's structure formation, also participate in decomposition of organic matter, presenting variety of functions necessary for the existence of other organisms, it is necessary to include them as potential bioindicators in evaluation of soil restoration processes due to microorganisms are one of the main soil constituents actively involved in shaping its structure and decomposition of organic matter, it is necessary to include them as potential bioindicators in the evaluation of the processes of soil restoration. As a high percentage of microorganisms require specific laboratory growth conditions, and many of them are non-culturable. It is necessary to use molecular tools such as metagenomics, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). For it, soil samples were collected from two connecting areas (corridors Monos and Pavas), a sample of each mature forest (Barbas and Bremen) and a sample of pasturelands next to the corridor Monos.

Optimal conditions were achieved for the extraction of metagenomic DNA free of humic acids. PCR conditions were standardized using five universal primers (27F/1492R and 518F/800R, 518-GCF) for the amplification of two *rrs* (16S rRNA) regions V3 and V1-V9. The fragment of the V3 region was subjected to DGGE in denaturing 30-70% gradient for 16 hours, subsequently the silver staining allowed the visualization band patterns representing bacterial communities. Moreover, the product of PCR amplification of both fragments (285 and 1499 bp.) was cloned using the TA Cloning ® Kit with pCR™ 2.1 and competent cells of *E.coli* strain. DH5a. Using alpha-complementation system 56 colonies were differentiated, transformed with the V3 (285pb.) and V1-V9 (1499 bp.) regions. The clones were grown in Luria-Bertani liquid medium containing ampicillin and the plasmids were purified. The plasmids with the insert of the V1-V9 region were digested with the enzymes Hind III and EcoR I to evaluate the fragment length polymorphism, but was not a successful digestion. Plasmids with the V3 region were sent to MacroGen USA for sequencing and subsequent bioinformatic analysis.

**Keywords:** bacterial communities, *rrs* gen, metagenomics, Polymerase Chain Reaction (PCR), and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).

## 1. Introducción

En el año 2004, en el municipio de Filandia (Quindío) se inició el establecimiento de corredores biológicos como una Herramienta de Manejo del Paisaje (HMP), para recuperar la conectividad entre dos fragmentos de bosque que habían quedado aislados por las distintas actividades antropogénicas como la agricultura y ganadería (Lozano *et al.* 2006). Desde hace algunos años se han evaluado diversos bioindicadores para determinar la eficacia biológica de las HMP implementadas (Lozano 2009). Se ha realizado seguimiento biológico de poblaciones y comunidades de flora, fauna (Marin *et al.* 2009; Bedoya 2007; Lozano 2009), sin incluir aún los microorganismos del suelo como posibles bioindicadores.

Los microorganismos son uno de los principales constituyentes del suelo, participan activamente en la formación de su estructura, en la descomposición de la materia orgánica, y su presencia es indispensable para la fertilidad, desarrollo y sostenimiento del mismo (Lizarazo 2001). Se estima que en el suelo hay entre  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  bacterias/gramo (Fierer *et al.* 2007), pero la mayoría requiere condiciones específicas para su crecimiento en el laboratorio (Handelsman 2007). En consecuencia, no se conoce la totalidad de los microorganismos presentes, ni cómo cada uno contribuye al funcionamiento de la comunidad bacteriana.

Actualmente se han desarrollado diferentes métodos para el estudio de microorganismos, algunos de estos métodos son basados en cultivos y otros son independientes de éstos (van Elsas & Boersma 2011). Sin embargo, sólo una pequeña fracción de la microbiota existente en cualquier ecosistema es cultivable en condiciones estándar (Handelsman 2007). En consecuencia los métodos de evaluación de microorganismos independientes de cultivo son una importante alternativa (Kirk *et al.* 2004), que permiten el estudio de ambientes complejos (Castillo *et al.* 2005).

Numerosos estudios se han centrado en la identificación de microorganismos y su diversidad, basándose en la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), del gen *rrs* también conocido como 16S ribosomal (Daniel 2004; Maarit *et al.* 2001). Este gen proporciona una amplia información sobre los taxa y las especies presentes en el medio ambiente (Ghazanfar *et al.* 2010), por esta razón es ampliamente utilizado en análisis metagenómico (Daniel 2005; Fierer *et al.* 2007; Maarit *et al.* 2001).

La metagenómica, definida como el análisis genómico de las comunidades presentes en un ambiente, a partir de la extracción del ADN directamente de la muestra ambiental, permite acceder a los microorganismos no cultivables (Schloss & Handelsman 2003; Riesenfeld *et al.* 2004; Castillo *et al.* 2005). El ADN metagenómico se puede estudiar ya sea mediante la caracterización de las

propiedades que confiere a un organismo que ha sido transformado genéticamente o por la determinación de sus secuencias de nucleótidos en uno o varios genes (Streit & Schmitz 2004).

Otra de las técnicas moleculares es la Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE), esta técnica permite la separación de fragmentos de ADN de igual tamaño, pero con variaciones en la secuencia de nucleótidos (Muyzer *et al.* 1993). La utilización combinada de diferentes técnicas moleculares como PCR y DGGE, basadas en el gen *rrs*, han permitido conocer la diversidad, estructura y dinámica de comunidades microbianas en diversos ecosistemas (Maarit *et al.* 2001; Dong & Reddy 2010).

Este proyecto tiene como objetivo identificar molecularmente las comunidades bacterianas existentes en una muestra de suelo tomada de un ecosistema en proceso de restauración ecológica. Para lograrlo se utilizó la técnica de PCR-DGGE, con la amplificación la región V3 del gen *rrs* del ADN metagenómico de las muestras de dos corredores (Monos y Pavas), dos bosques (Barbas y Bremen) y un potrero. Se construyeron librerías con las regiones V1-V9, y V3 del gen *rrs* amplificadas del ADN extraído directamente de cada una de las muestras de suelo. Los plásmidos se purificaron y los que contenían el inserto de V1-V9 fueron digeridos con las enzimas de restricción Hind III y EcoR I, para evaluar el polimorfismo de los fragmentos, pero no hubo digestión. Los plásmidos con la región V3 se enviaron a MacroGen USA para su secuenciación y posterior análisis bioinformático (“GenBank” y “Ribosomal Database Project”).

## 2. Problema de investigación

La necesidad de restaurar los suelos degradados se convierten en una urgente tarea y en un compromiso ético que corresponde a la comunidad académica y en particular a las ciencias biológicas, dada la importancia del ecosistema y las relaciones que se establecen entre los microorganismos presentes en dicho contexto. Dentro de los *Objetivos de Desarrollo del Milenio* (ODM) propuestos por Naciones Unidas (2010), se considera prioritaria la sostenibilidad del medio ambiente (Objetivo 7), en particular debido a la pérdida de bosques tropicales, bien sea por causas naturales o por destinación de las tierras a otros usos. Mundialmente no se ha alcanzado la meta de biodiversidad, aspecto vital para el bienestar humano, puesto que participa del sostenimiento de los ecosistemas relacionados con la conservación de la vida (Naciones Unidas 2010).

De acuerdo con Barrera-Cataño *et al.* (2008), en nuestro país como en gran parte del planeta, los ecosistemas naturales han sido alterados o transformados en cultivos, potreros, espacios urbanos e infraestructura, que someten a presión los sistemas agropecuarios y sistemas naturales. Esto los puede conducir a su degradación; generando pérdida de biodiversidad, hábitat para las especies, recursos hídricos y erosión. Sin embargo las iniciativas de instituciones privadas y estatales, en los últimos 15 años, han desarrollado procesos de restauración ecológica, con diversos niveles en sus resultados (Barrera-Cataño *et al.* 2008).

La construcción de corredores biológicos ha sido una gestión desarrollada por el Instituto Alexander von Humboldt desde 2004, bajo su esquema de planeación de los paisajes rurales para la conservación de biodiversidad, logrando conectar los bosques de la reserva forestal de Bremen y Cañón del Río Barbas en Filandia, Quindío (Lozano 2009). Este esquema propone el desarrollo de cinco fases (desde Fase 0 a Fase IV); y es justamente en su Fase IV "*Seguimiento y evaluación de la estrategia de conservación*", donde se verifica la pertinencia del presente estudio, debido a que la evaluación de la eficacia biológica de HMP, se realiza mediante seguimiento biológico de poblaciones y comunidades de fauna y flora (Lozano 2009), pero aún no se incluyen los microorganismos del suelo. Teniendo en cuenta que el proceso de seguimiento y evaluación aporta información para retroalimentar, generar ajustes en otros procesos de planeación, y promover estrategias de réplica en otros paisajes a otra escala o en otros paisajes rurales del país (Lozano 2009), es pertinente la inclusión de microorganismos como potenciales bioindicadores en la evaluación de los procesos de restauración de suelos. Por tanto, es relevante que este proyecto se ocupe de identificar molecularmente las comunidades bacterianas presentes en los suelos que están siendo restaurados, estableciendo las condiciones óptimas para la extracción de ADN directamente de una muestra de suelo y su posterior análisis.

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos son importantes para la estructura y dinámica del suelo, además de responder rápidamente a cambios en el ecosistema. Por ello sería recomendable que otros estudios de suelos degradados, o estudios donde se tenga en cuenta las condiciones de antes y después de la restauración, consideren los microorganismos de suelo como posibles bioindicadores en la evaluación de una estrategia de restauración.

## **2.1. Planteamiento de la pregunta de investigación**

Los análisis microbiológicos basados en los métodos estándar de recuento en placa, carecen de precisión, debido a que aproximadamente entre el 1-10 % de las bacterias del suelo puede ser cultivado (Fierer *et al.* 2007). Por otra parte, el uso de métodos moleculares como la secuenciación de un fragmento del gen *rrs* amplificado por PCR o la PCR-DGGE, ofrece buenas alternativas para el estudio de las comunidades microbianas del suelo (Kirk *et al.* 2004). Es así como es proyecto busca determinar ¿cuáles son las condiciones óptimas en la extracción de ADN metagenómico y en la amplificación de dos fragmentos del gen *rrs*, para identificar qué bacterias se encuentran en una muestra de suelo tomada de un ecosistema en proceso de restauración ecológica?

### 3. Marco de referencia

#### 3.1. Antecedentes

Históricamente, el interés de restablecer las especies y las comunidades en un ecosistema degradado se deriva tanto de su valor ecológico intrínseco, así como de la prestación de servicios ecosistémicos. Sin embargo, un enfoque hacia los procesos ecológicos en un contexto de restauración ofrece una visión diferente del estado y dinámica de los ecosistemas y los servicios que pueden ofrecer (Falk *et al.* 2006).

A finales de la década de los ochentas los temas de la restauración ecológica y ecología de la restauración comenzaron a ser desarrollados en diferentes partes del mundo por investigadores como Jordan, Cairns, Bradshaw y Harper (Barrera-Cataño & Valdés-López 2007). Posteriormente en los noventa se crea la Sociedad de Ecología de la Restauración (SER), actualmente con miembros en 37 países (SER International 2004). En Colombia el tema de la restauración ecológica se empezó a trabajar desde mediados de los noventa, pero es a finales de esa década y principios de este siglo que el tema empieza a tener mayor reconocimiento por diferentes instituciones, como la Fundación Restauración de Ecosistemas Tropicales (FRET), el Ministerio del Medio Ambiente, el DAMA y el Jardín Botánico, entre otros (Barrera-Cataño & Valdés-López 2007).

Ruiz-Jaen M.C. y Aide M. (2005) en su artículo *Restoration Success: How Is It Being Measured?*, hacen una revisión de 468 artículos publicados en la revista *Restoration Ecology* entre 1993 y 2003, encontrando que sólo 68 estudios evaluaron el éxito de la restauración después de la siembra de semillas o plántulas. La mayoría de estos estudios se llevaron a cabo en Norte América (53%), pero también hubo estudios en Australia (19%), Europa (16%), África (4%), Sur América (4%) y Asia (3%). El hábitat de estudio más frecuente fueron los humedales (19%), seguido de pastizales (16%) y el bosque montano (13%). En estos lugares previamente se desarrollaban la minería (36%) y la agricultura (18%). Los bioindicadores de recuperación de la diversidad más comunes fueron las plantas (79%) y artrópodos (35%). En la mayoría de los estudios se midió sólo un grupo de organismos (61%). Por otra parte los resultados de este estudio muestran que los microorganismos de suelo fueron poco utilizados para evaluar la eficacia de los procesos de restauración.

Los microorganismos son los componentes más importantes del suelo. Constituyen su parte viva y son los responsables de la dinámica de transformación y desarrollo (Lizarazo 2001). Las comunidades microbianas responden ágilmente a cambios ambientales, por lo que se han sugerido como indicadores (Uribe 1999). Una medida de su riqueza y actividad biológica puede ser un indicador

valioso del efecto del manejo del sistema sobre la población microbiana del suelo (Uribe 1999). Sin embargo se ha encontrado que el estudio microbiológico basado en métodos dependientes de cultivo no es suficiente, debido a que sólo un bajo porcentaje de microorganismos presentes en el medio son cultivables en condiciones estándar de laboratorio (Handelsman 2007; Fierer *et al.* 2007). No obstante para el estudio de las bacterias no cultivables se utilizan herramientas moleculares como la metagenómica y PCR-DGGE (Schloss & Handelsman 2003; Riesenfeld *et al.* 2004; Castillo *et al.* 2005; Li *et al.* 2012). La secuenciación del gen *rrs* de una comunidad de microorganismos proporciona amplia información de la diversidad filogenética de dicha comunidad (Maarit *et al.* 2001).

La metagenómica consiste en extraer el ADN directamente de una muestra ambiental, amplificar un fragmento de uno o más genes, caracterizar las propiedades que confiere a un organismo que ha sido transformado genéticamente o determinar sus secuencias nucleotídicas y posteriormente realizar un análisis bioinformático (Streit & Schmitz 2004). Por su parte la técnica de PCR-DGGE se basa en la amplificación de un fragmento de genes específicos (*nifH*, *rpoβ* y *rrs*), este puede ser una región hipervariable del gen *rrs*, seguida por la separación de los fragmentos de igual tamaño que difieren en la composición nucleotídica, lo que permite variaciones en la migración a lo largo del gel de poliacrilamida con gradiente de concentración de un denaturante químico (Abrams & Stanton 1992).

## **3.2. Marco teórico**

### **3.2.1. Restauración ecológica**

La restauración ecológica es el proceso de ayudar al restablecimiento de un ecosistema que se ha degradado, dañado o destruido (SER International 2004), por causas naturales o antropogénicas, cuando éste no puede por sí mismo retornar a su estado original ya sea porque el daño es muy intenso o porque sería necesario que pasara mucho tiempo para lograrlo de forma natural (Primack 2010). Para establecer un proyecto de restauración ecológica y posteriormente evaluar su trayectoria se toma como modelo un ecosistema de referencia, el cual puede constar de una o varias ubicaciones específicas. A medida que pasa el tiempo se espera que el ecosistema restaurado emule los atributos de la referencia (SER International 2004).

Cualquier ecosistema que no esté destruido totalmente se puede recuperar naturalmente de la alteración producida, sin tener que ser sometido a una restauración ambiental mediada por el hombre. De esta manera se da lugar a un proceso natural de recuperación, en un periodo de tiempo largo, mediante un mecanismo de sucesión de etapas más complejas que modifica las circunstancias

ambientales anteriores (Universidad Politécnica de Valencia-UPV 2010). En algunos casos la restauración implica eliminar o modificar una alteración específica, para permitir que los procesos ecológicos se recuperen por sí solos. En situaciones de mayor deterioro o destrucción del ecosistema, la restauración requiere de la reintroducción intencional de especies autóctonas y de la eliminación o control de especies invasoras y dañinas (SER International 2004).

La intervención humana en los procesos de restauración se adelanta a las situaciones naturales para acelerar los procesos mediante técnicas que permiten la incorporación de elementos como vegetación y fauna, que acorten las etapas del proceso de recuperación natural (Universidad Politécnica de Valencia-UPV 2010). Una estrategia utilizada para la restauración ecológica es establecer corredores biológicos y así, mediante la conexión de fragmentos, recuperar la integridad del paisaje, la dispersión de especies y hábitats (Hilty *et al.* 2006).

### **3.2.2. Corredores Biológicos**

Un corredor biológico es un espacio geográfico delimitado que proporciona conectividad entre paisajes, ecosistemas y hábitats naturales o modificados (CCAD-PNUD/GEF 2002). Dicho corredor posibilita que las poblaciones o especies en riesgo se movilicen, encontrando condiciones para sobrevivir y propagarse, generando nuevos hábitats (Walker & Craighead 1997). A medida que los organismos se mueven a través de paisajes complejos, responden a múltiples factores bióticos y abióticos para maximizar el acceso a los recursos y la actividad reproductiva, minimizando los costos de fitness, tales como los riesgos de mortalidad (Cushman *et al.* 2013).

Los corredores o zonas conectoras facilitan la denominada “colonización de parches” funcionando como canales de movimiento, o como un medio de interceptación y contención de los individuos que transitan dispersándose en el paisaje circundante y dirigiéndolos hacia los parches en conexión (Haddad *et al.* 2003).

El corredor biológico Barbas-Bremen se encuentra entre los 1700 y 2100 msnm y entre los municipios de Filandia (Quindío) y Pereira (Risaralda), en la vertiente occidental de la Cordillera Central (75°39'38"W/4°42'47"N y 75°35'42"W/4°40'48"N) (Figura 2). Su extensión es de 47,4 ha y está compuesto por cuatro zonas conectoras: Monos, Pavas, Colibrís y Laureles) con aproximadamente 100 metros de ancho (Vargas & Lozano, 2008). Siguiendo a Vargas y Lozano (2008), se encuentra que en el establecimiento de los corredores de Barbas-Bremen se utilizó una estrategia basada en la aceleración de la sucesión a partir de diferentes métodos como: siembra de estacones con elevada capacidad de rebrote para reemplazar cercas muertas por cercas vivas, trasplante de plántulas y rescate de

plántulas. Con esta sucesión acelerada se buscaba restablecer la conectividad funcional entre la reserva forestal Bremen y el cañón del río Barbas, contribuir a la conservación de la diversidad biológica local y regional e incrementar el hábitat para las especies de flora y fauna que habitan estas áreas (Vargas 2008).

### 3.2.3. Suelo y Microorganismos

El suelo y las capas subyacentes de material orgánico albergan diversidad de organismos como: artrópodos, miriápodos, hongos, algas, virus y bacterias (Burke *et al.* 1986). La composición de estas comunidades y su abundancia está influenciada por la localización geográfica, el clima, propiedades físicas y químicas del suelo, el tipo de vegetación, naturaleza y profundidad de la materia orgánica, y el manejo de este recurso. Los microorganismos son uno de los principales constituyentes del suelo, participan activamente en la formación de su estructura, en la descomposición de la materia orgánica, y su presencia es indispensable para la fertilidad, desarrollo y sostenimiento del mismo (Lizarazo 2001). Por lo anterior los microorganismos de suelo se consideran útiles en la determinación de la calidad del suelo y como generadores de alimento para las plantas (Sivila & Hervé 1999). De ahí la importancia de incluir organismos del suelo, junto con otras características biológicas, entre los indicadores de la calidad del suelo (Sadeghian *et al.* 1999; Socarras & Rodríguez 2005).

Se estima que en el suelo hay entre  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  bacterias/gramo, pero la mayoría no son cultivables en condiciones de laboratorio (Fierer *et al.* 2007). El papel de los microorganismos en el suelo es determinante para la formación de una estructura adecuada, puesto que contribuyen a mantener las partículas del suelo unidas, ejercen control biológico, aumentan la disponibilidad de nutrientes e intervienen en la biodegradación de plaguicidas y contaminantes (Hendrix *et al.* 1990).

En un estudio realizado recientemente por Delgado (2012) se recalca la importancia de la materia orgánica en el proceso de restauración, porque retiene nutrientes en forma disponible para las plantas y al mismo tiempo potencializa las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Además, se generan las condiciones necesarias en la obtención de los estados sucesionales requeridos debido a la interacción entre la materia orgánica y los microorganismos. Es así como se producen cambios en las propiedades del suelo que permiten el establecimiento o inhibición de ciertas especies de plantas a lo largo del tiempo (Delgado 2012).

Lauber *et al.* (2013), en su estudio acerca de la *Variabilidad temporal en comunidades bacterianas de suelo a través del tipo de uso de la tierra*, sugieren que el tipo de uso de la tierra y, en particular, las diferencias en la dinámica de la

vegetación, pueden tener un papel importante en la modulación de la variabilidad temporal de las comunidades bacterianas en el suelo.

Así mismo Uribe (1999), al destacar la importancia de los microorganismos de suelo, considera que las comunidades microbianas responden ágilmente a cambios ambientales, por lo que se han sugerido como indicadores.

#### **3.2.4. Bioindicadores**

Para la medición de impacto de la eficacia biológica de las estrategias de restauración ecológica utilizadas en un ecosistema degradado, se deben precisar indicadores biológicos que permitan hacer observables propiedades o características para detectar cambios en el sistema objeto de estudio (Hoorman 2011).

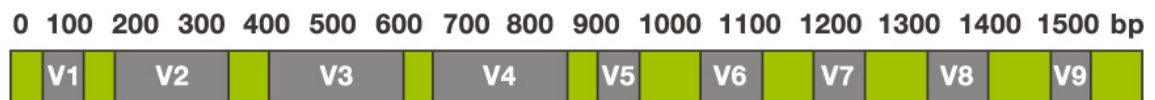
En el corredor biológico Barbas-Bremen (Filandia – Quindío), se han desarrollado diferentes estrategias de restauración para lograr la aceleración de los procesos sucesionales y su progreso se ha evaluado teniendo en cuenta indicadores biológicos como mamíferos, aves, insectos y plantas (Marin *et al.* 2009; Bedoya, 2007; Lozano, 2009), pero aún no se han utilizado las comunidades bacterianas de suelo. Los resultados de los estudios de Bedoya (2007) con mamíferos terrestres medianos y grandes, y el monitoreo de la avifauna realizado por Marin *et al.* (2009), dan un primer indicio de la efectividad de los corredores como mecanismo de restauración ecológica.

De acuerdo con Uribe (1999), Los requisitos que debe tener un indicador óptimo, es que sea sensible, fácil y económico de medir y de amplia distribución. Debido al papel de los microorganismos en la descomposición de residuos, una medida de su abundancia y actividad biológica puede ser un indicador valioso del efecto del manejo del sistema sobre la población de microorganismos del suelo.

#### **3.2.5. Gen *rrs***

El gen *rrs* que codifica para la subunidad menor del ribosoma bacteriano 16S rARN, se ha utilizado ampliamente debido a que proporciona información importante para la descripción de los microorganismos presentes en muestras ambientales (Spedding 1990; Gaona *et al.* 2012). Existen características relevantes, que determinan a este gen como una herramienta importante para estudios de filogenia y taxonomía (Tomas & Petr 2013), permitiendo estudiar la estructura y composición de las comunidades bacterianas en determinado ambiente (Gaona *et al.* 2012).

La estructura y función del gen *rrs* han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, contiene regiones conservadas, idénticas para todas las bacterias y nueve regiones variables (V1-V9) (Figura 1), que contienen sitios específicos únicos para bacterias individuales, con suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos (Heuer *et al.* 1999). La identificación de bacterias incluyendo microorganismos no cultivables, se ha facilitado por la comparación de las secuencias del gen *rrs* (Eisen *et al.* 1992; Pace 1997) accediendo a las distintas bases de datos que proveen información detallada sobre este gen (van Elsas & Boersma 2011). Adicionalmente la secuenciación del gen *rrs* se ha aplicado en identificación bacteriana mediante el análisis de las secuencias parciales del gen, donde se han encontrado patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos (Hong *et al.* 2002).



**Figura 1 .** Esquema del gen *rrs*.

### 3.2.6. Metagenómica

El análisis genómico de las comunidades presentes en un ambiente, a partir de la extracción del ADN directamente de la muestra ambiental, se conoce como metagenómica (Schloss & Handelsman, 2003; Riesenfeld *et al.* 2004). El ADN metagenómico se puede estudiar ya sea mediante la caracterización de las propiedades que confiere a un organismo que ha sido transformado genéticamente o por la determinación de sus secuencias nucleotídicas de uno o varios genes y posteriormente someterlas a un análisis bioinformático (Streit & Schmitz, 2004). Todo el proceso se basa en la eficiencia de cuatro pasos principales. (i) El aislamiento del material genético. (ii) La manipulación del material genético. (iii) La construcción de la biblioteca genómica. (iv) El análisis de material genético en la biblioteca genómica (Zeyullah *et al.* 2009).

La metagenómica del suelo puede proporcionar una evaluación de las comunidades microbianas presentes, que no son cultivables (Ghazanfar *et al.* 2010). Una metodología utilizada para tal fin es la amplificación por PCR del gen ribosomal 16S (*rrs*) (Daniel 2005; Fierer *et al.* 2007), que por sus características es un gen ideal para estudios de filogenia y taxonomía (van Elsas & Boersma 2011). El análisis filogenético, es un paso preliminar útil en un proyecto de metagenómica, ya que proporciona una evaluación de la diversidad de dicha comunidad, usando herramientas bioinformáticas que permitan realizar comparaciones entre diferentes secuencias (Daniel 2005).

### 3.2.7. PCR-DGGE (Reacción en Cadena de la Polimerasa- Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización)

La amplificación por PCR de los genes que codifican para RNA ribosómico bacteriano, y la utilización combinada de diferentes técnicas moleculares basadas en el 16S rARN, ha permitido un estudio en profundidad de la diversidad, estructura y dinámica de comunidades microbianas en diversos ecosistemas (Daniel 2005; Fierer *et al.* 2007). Los fragmentos amplificados del gen 16S o 18S rARN y el análisis de estos genes por la DGGE, se han utilizado con frecuencia para examinar la diversidad microbiana de muestras ambientales y para monitorear los cambios en las comunidades de microorganismos (Muyzer & Smalla 1998).

La técnica de DGGE permite la separación de fragmentos de ADN de igual tamaño, pero con variaciones en la secuencia de nucleótidos (Muyzer & Smalla 1998), esta basada en la desnaturalización parcial de cadenas de doble hélice del ADN a cadenas sencillas, empleando un gradiente químico y de temperatura (Muyzer *et al.* 1993). Para impedir la desnaturalización total de la doble hélice y evitar que los productos de PCR continúen corriendo y se salgan del gel, en la amplificación previa a la DGGE se utiliza un cebador con una abrazadera (clamp) de GC (guanina y citosina) unida al extremo 5', resultando en un producto con un extremo que tiene alto punto de fusión (Muyzer *et al.* 1993). Al presentarse el cambio de una base, se alteran drásticamente las interacciones de apilamiento y puede cambiar la temperatura de fusión en 1°C, alterando el patrón de migración de las bandas a través de la matriz del gel (Myers *et al.* 1988; Abrams & Stanton 1992; Bassam & Gresshoff 2007). Después de la tinción del gel de DGGE el número, posición precisa y la intensidad de las bandas dan una estimación del número y la abundancia relativa de ribotipos numéricamente dominantes en la muestra (Boon *et al.* 2002). Si los patrones de bandas obtenidos difieren claramente, las comunidades son distintas (Abrams & Stanton 1992; Maarit *et al.* 2001; Dong & Reddy 2010). La utilidad de esta técnica en el análisis de comunidades bacterianas se basa en la existencia de variación en las secuencias que migran a diferentes posiciones en los geles de acrilamida/bisacrilamida, separando las secuencias con base en su comportamiento de fusión. Se ha demostrado que el 95% de las diferencias individuales de las secuencias se detectan por este método (Jackson *et al.* 2000). Así que esta herramienta molecular tiene un gran potencial para identificar bacterias no cultivables, a partir del análisis de secuencias con la técnica de PCR (Boon *et al.* 2002). Una de las falencias es que sólo las principales poblaciones de la comunidad analizada están representadas en estos patrones de DGGE y relativamente en menor abundancia, por lo cual especies potencialmente importantes podrían no ser detectadas por este método molecular (Heuer *et al.* 1999).

#### **4. Objetivo General**

Identificar a nivel molecular las comunidades bacterianas existentes en una muestra de suelo tomada de un ecosistema en proceso de restauración ecológica (corredor biológico Monos, Barbas-Bremen, Filandia - Quindío), a partir del análisis de la secuencia de fragmentos del gen *rrs* amplificados por PCR.

#### **4.1. Objetivos Específicos**

- 4.1.1. Construir una biblioteca genómica de un fragmento del gen *rrs* de los microorganismos presentes en la muestra de suelo.
- 4.1.2. Identificar las comunidades bacterianas encontradas a partir de los resultados de las técnicas moleculares utilizadas.
- 4.1.3. Analizar la diversidad hallada en el suelo del corredor Monos usando herramientas moleculares y bioinformática (GenBank, RDP y MEGA 5.1).

## **5. Metodología**

### **5.1. Preparación de soluciones stock y otros reactivos**

Se prepararon las soluciones stock necesarias para el desarrollo del proyecto, con el fin de asegurar su vigencia, concentración y calidad. Las soluciones preparadas fueron: EDTA 0,5 M pH 8.0, TBE 5x, KCL 1M, Tris-HCl 1M pH 8, Buffer de PCR 10x, MgCl<sub>2</sub> 25mM, Acetato de sodio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) 3M pH 5.8, TE, dNTPs 20mM, NaCl 5M y STET.

### **5.2. Recolección de muestras de suelo**

Las muestras de suelo fueron tomadas del corredor biológico Barbas-Bremen. Este corredor se encuentra entre los 1700 y 2100 msnm, está ubicado entre los municipios de Filandia (Quindío) y Pereira (Risaralda), en la vertiente occidental de la Cordillera Central (75°39'38"W/4°42'47"N y 75°35'42"W/4°40'48"N) (Figura 2).

La recolección de muestras de suelo se realizó según lo indicado en la norma NTC 4113-6 (1997). Se estableció un punto de inicio de muestreo en cada una de las zonas (corredores Monos y Pavas, bosques Barbas y Bremen, potrero junto a Monos) evitando los bordes. Se tomó una muestra compuesta, conformada por diez submuestras, localizadas en zigzag cada 10 metros (Figura 3) Fue necesario retirar la hojarasca y demás material que se encontraba en la superficie para proceder con la toma de muestra del suelo, utilizando un palín rectangular de 30 cm para cavar un agujero en forma de "V" y luego tomar una tajada de 30 cm de profundidad con un espesor de 5 cm. A continuación se eliminaron los bordes, y se introdujo en un balde plástico. Luego de tener las 10 submuestras en el balde se homogenizaron y se tomó la muestra compuesta, aproximadamente de 1 kg. Inmediatamente se tamizó la muestra con un tamiz metálico de 2 mm para impedir el paso de piedras o material vegetal y/o animal (Figura 4). Se guardó en una bolsa plástica de cierre hermético, la cual fue rotulada y preservada a 4°C. Se almacenó cuidadosamente evitando compactación física, humedad excesiva, luz, anaerobiosis y congelación. La norma indica que el material debe procesarse tan pronto como sea posible para no alterar los resultados y si es necesario almacenarlo; el tiempo no debe superar los tres meses. El primer muestreo se llevó a cabo el 19 de junio de 2013 y en septiembre se repitió.



**Figura 2.** Ubicación del área de estudio. A) Mapa del departamento de Quindío donde se muestra la localización del municipio de Filandia (óvalo rojo). B) Corredor Barbas-Bremen. Los números indican la localización de los corredores, siendo el 1 el corredor Monos.



**Figura 3.** Representación de la ubicación de las submuestras. Las submuestras se tomaron cada 10 m. en zigzag evitando los bordes de cada una de las zonas.



**Figura 4.** Pasos para la recolección y almacenamiento de las muestras. **a)** Huevo en forma de "V". **b)** Corte de la muestra. **c)** Eliminación de bordes y homogenización de submuestras. **d)** Toma de la muestra compuesta y tamizaje. **e)** Almacenamiento de la muestra en bolsa plástica de cierre hermético.

### **5.3. Extracción de ADN**

A partir de 250 mg de la muestra compuesta de cada una de las zonas de estudio se realizó la extracción de ADN, por duplicado, utilizando el kit comercial UltraCleanSoil® DNA Isolation Kit (MO-BIO) (Whitehouse & Hottelb 2007; Filiona *et al.* 2003; Dong & Reddy 2010), presentando buenos resultados en la remoción de posibles inhibidores de la PCR y en la calidad del ADN aislado. Inicialmente el proceso de extracción de ADN se llevó a cabo como lo sugiere el protocolo del fabricante. Seguido a esto se realizaron varias extracciones con modificaciones para mejorar el rendimiento y calidad, debido a inconvenientes presentados en la amplificación por PCR. La primera modificación consistió en aumentar a tres el número de lavados con la solución S4. Esta solución contiene etanol el cual limpia el ADN unido a la membrana de sílica, removiendo los ácidos húmicos (Tebbe & Vahjen 1993) y otros inhibidores de la PCR (Whitehouse & Hottelb 2007). La segunda modificación fue un procedimiento de precipitación del ADN extraído. Este se mezcló con 1/10 de solución de acetato de sodio 3M a pH 5.8 y 6/10 de isopropanol frío, se incubó a -20°C por dos horas y se centrifugó (centrifuga THERMO SCIENTIFIC HERAEUS PRIMO) a 4°C, 11.000 r.p.m. durante 15 minutos. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200 µl de etanol 70%, luego se centrifugó a 4°C, 10.000 r.p.m. por 3 minutos. Seguido a esto se descartó el etanol, se dejó secar a temperatura ambiente sobre una toalla de papel y se resuspendió en 50 µl de TE (10 mM Tris HCl, pH 8. 1 mM EDTA). El tubo eppendorf se rotuló y se almacenó a -20°C. La tercera y última modificación fue la dilución 1:3 del ADN que había sido extraído siguiendo el protocolo y del ADN extraído con el aumento de lavados con la solución S4. Además se realizaron diluciones después de los tratamientos de precipitación. Luego de cada extracción y modificaciones, se verificó la extracción con electroforesis (cámara EASYCAST B2) en gel de agarosa al 1%, con buffer TBE 1x a 90 v. Se tomaron 5 µl del ADN metagenómico extraído las muestras de suelo de Monos (Mo), Pavas (Pa), Brabas (Ba), Bremen (Br) y Potrero (Po), y se mezclaron con 5 µl de SYBR Green-blue juice.

### **5.4. Amplificación por PCR**

#### **5.4.1. Selección de cebadores**

La selección de los cebadores para la amplificación de distintos fragmentos del gen *rrs*, se basó en la búsqueda bibliográfica de estudios similares donde emplearan cebadores universales, específicos para bacterias y que amplificaran regiones hipervariables del gen (Galkiewicz & Kellogg 2008; Pedersen 2008).

**Tabla 1.** Secuencias de los cebadores universales seleccionados.

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño del fragmento</b>
27F	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'	1499 pb.
1492R	5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	
518F	5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'	285 pb.
800R	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'	
518-GCF	5'- CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGG GGCGGGGGCACGGGGGGCCAGCA GCCGCGGTAATACG-3'	300pb

Luego de definir los cebadores, se verificó su especificidad mediante la herramienta “primer-BLAST” en la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI). Una vez sintetizados por el laboratorio IDT se preparó una alícuota de 100 µl a una concentración de 20µM de cada uno de los cebadores. Este procedimiento se realizó en cabina de bioseguridad Esco clase II, para evitar contaminación del stock y/o las alícuotas. Tanto el stock como las alícuotas de los cebadores se almacenaron a -20°C.

Al iniciar las pruebas para la amplificación los reactivos utilizados en el coctel de PCR (Buffer de Taq, MgCl<sub>2</sub> y Taq) no eran comerciales sino que habían sido preparados en la Universidad Icesi, los demás reactivos como dNTPs y cebadores si se adquirieron comercialmente. Una vez estandarizadas las condiciones para la amplificación y buscando mejorar la resolución de las bandas, se adquirieron componentes comerciales.

Se siguió la metodología propuesta por Aristizabal (2011); Arjun & Harikrishnan, (2011); Eisen *et al.*(1992), de las condiciones para la amplificación por PCR. Se utilizaron dos pares de cebadores específicos para la identificación de bacterias: 27F/1492R, y 518F/800R (Tabla1). El primer par de cebadores amplifica desde la región V1 a la región V9, casi la totalidad del gen, mientras que el segundo par de cebadores amplifica la región hipervariable V3 del *rrs* (Figura 1). Se realizaron reamplificaciones para las pruebas de DGGE, los cebadores utilizados fueron 518-GCF/800R y como molde se empleó el producto de amplificación de la región V3.

Una vez amplificadas las regiones mencionadas, se procedió con cuatro metodologías diferentes para la identificación de las bacterias existentes en las muestras.

La primera metodología consistió en:

- Purificación del producto de amplificación por PCR de la región V3 del gen *rrs* de las cinco muestras (corredores Monos y Pavas, bosques Bremen y Barbas y potrero).
- Análisis metagenómico de las muestras pertenecientes al corredor Monos, bosque Bremen y potrero.

La segunda metodología incluyó:

- Clonación de las regiones V3 y V1-V9 del gen *rrs*.
- Construcción de librerías genómicas.
- Purificación del ADN plasmídico.
- Digestión enzimática con EcoR I y Hind III de los plásmidos recombinantes con la región V1-V9.
- Selección de los plásmidos con fragmentos de distintos tamaños.
- Secuenciación de los plásmidos seleccionados

La tercera metodología es igual a la anterior hasta la purificación del ADN plasmídico, a continuación se secuenciaron los plásmidos recombinantes con la región V3 para el posterior análisis bioinformático.

La cuarta metodología se diferencia de las anteriores en que se realiza una PCR con los cebadores 518-GCF/800R empleando como molde el producto de amplificación de la región V3 con los cebadores 518F/800R, para llevar a cabo la DGGE.

A continuación se presentan las condiciones finales utilizadas en la amplificación por PCR del 16S rARN con los cebadores 27F/1492R y 518F/800R, y los componentes comerciales.

**Tabla 2.** Condiciones finales para el coctel de PCR, con componentes comerciales, para la amplificación de las regiones V3 y V1-V9 de gen *rrs*.

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen (µl)</b>
Buffer de Taq	5X	4.0
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5
dNTP's	20 mM	0.4
Primer F	20 µM	0.4
Primer R	20 µM	0.4
Taq	5u/µl	0.3
Agua		17
ADN	70 ng/µl	1.0
Vol. final		25

**Tabla 3.** Condiciones del termociclador (ESCO SWIFT MAXPRO), para la amplificación de las regiones V3 y V1-V9 del gen *rrs*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	5 min
2*	94	1 min
3*	56	45 s
4*	72	1 min
5	72	10 min
6	14	∞

\*35 ciclos entre los pasos 2-4

La amplificación se verificó realizando electroforesis en gel de agarosa 1%, TBE 1x, 90 v. Se tomaron 5 µl del producto de la amplificación y se mezclaron con 5 µl de SYBR Green-blue juice. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1Kb de Promega, 5 µl con 5 µl de SYBR Green-blue juice.

Como parte de la primera metodología, se siguió un protocolo corto de purificación de ADN por centrifugación con el Kit de limpieza Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), para el producto de amplificación de la región V3 de las 5 muestras (Monos, Pavas, Barbas, Bremen y Potrero), luego se cuantificaron utilizando el NanoDrop 2000, y se enviaron a MacroGen Korea para el análisis metagenómico (Orden 1310KFP-0008).

Para la segunda y tercera metodología, el producto fresco de la amplificación por PCR con los cebadores 518F/800R y 27F/1492R, de las regiones V3 y V1-V9 respectivamente, se empleó para la clonación en el vector pCR 2.1 del kit comercial TOPO TA Cloning® Kit with pCR™2.1 (Invitrogen).

Por otra parte, siguiendo la cuarta metodología, se amplificó de la región V3 del gen *rrs* con los cebadores y 518F/800R para la realización de la reamplificación con los cebadores y 518F-GC/800R. Las condiciones de los componentes son las mismas que las presentadas en la tabla 2, pero las condiciones del termociclador varían para la reamplificación, como se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones del termociclador para la reamplificación, utilizando los cebadores 518-GCF/800R.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	5 min
2*	94	1 min
3*	60	45 s
4*	72	1 min
5	72	30 min

\*15 ciclos entre los pasos 2-4

## 5.5. DGGE

Los fragmentos de ADN amplificados para esta técnica deben tener entre 200 y 500 pb. ya que secuencias de mayor tamaño pueden generar artefactos (Muyzer *et al.* 1993). Por esta razón se utilizó el producto de la reamplificación de la región V3 para evaluar la diversidad de bacterias presentes en cada una de las muestras. Las condiciones utilizadas para la DGGE variaron en los tres ensayos realizados durante el proceso de estandarización de la técnica. Finalmente la separación de los fragmentos se realizó en un gel de acrilamida/bisacrilamida (AMRESCO, Chile) con gradiente de desnaturalización de 30–70%, sumergido en buffer TAE 1X, a voltaje constante de 100 v, y temperatura de 65°C. La electroforesis se corrió durante 16 h y luego se reveló siguiendo el protocolo de tinción con plata de Bassam & Gresshoff (2007).

## 5.6. Clonación y Construcción de librería

Utilizando el kit comercial TA Cloning® Kit with pCR™2.1 (Invitrogen) y el producto fresco de la amplificación por PCR de las regiones V3 y V1-V9, se llevó a cabo la clonación y construcción de librerías genómicas.

**Tabla 5.** Condiciones para una reacción de clonación utilizando el kit TA Cloning® Kit con pCR™2.1 (Invitrogen).

Componentes	Volumen (µl)	Concentración
Producto de PCR fresco	1.2	
Buffer	0.2	5X
pCR®2.1 vector	0.4	25 ng/µL
T4 DNA Ligase	0.2	5 u

La reacción permaneció 12 horas a 14°C en el termociclador. Al día siguiente se precipitó con 200 µl de etanol 90% por 30 min a -20°C. Luego se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 10 min., se lavó con etanol 70% y se volvió a centrifugar por 5 min. Después se eliminó el etanol teniendo cuidado de no descartar el pellet, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 5 µl de DH<sub>2</sub>O. Usando el electroporador eppendorf, se transformaron las células competentes de la cepa *E. coli* DH5α (20 µl) con 2 µl del producto de ligación, seguido por una fase de recuperación en 500 µl de caldo nutritivo en tubos eppendorf de 1.5 ml, durante 1 hora a 37°C.

### 5.6.1. Selección por alfa-complementación

Para la identificación de clones bacterianos recombinantes se utilizó el sistema de alfa complementación. La inserción de ADN foráneo en el sitio de policlonación del plásmido inactiva el fragmento amino-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa y suprime la  $\alpha$ -complementación. Por lo tanto, las células que llevan los plásmidos recombinantes (LacZ) se podrán reconocer como colonias de color blanco en presencia de X-Gal, y las bacterias con fenotipo Lac<sup>+</sup> que resultan de la complementación  $\alpha$  se pueden reconocer por la formación de colonias azules (Reddy, 2004). Para este procedimiento fue necesario preparar 12 cajas de Petri con LB, a cada una se adicionó 40  $\mu$ l X-Gal 20 mg/ml, 10  $\mu$ l ampicilina 100 mg/ml, 5  $\mu$ l IPTG y 100  $\mu$ l del producto transformado. Se incubó 48 horas a 37°C. Luego se realizó el conteo de las colonias blancas en cada una de las cajas Petri y se tomó la mitad de cada colonia blanca con una punta estéril y ésta punta se introdujo en un tubo de vidrio tapa rosca 12 x 150 estéril, que contenía 5 ml del medio líquido LB con ampicilina. Se dejaron en incubación con agitación a 37°C por 24 horas, en el agitador con temperatura HEIDOLPH INKUBATOR 1000.

### 5.7. Purificación de ADN plasmídico

El ADN de un plásmido recombinante presente en una bacteria se puede aislar mediante diversos métodos. En este caso se realizó el siguiente protocolo de miniprep a los cultivos bacterianos de las 2 librerías construidas.

1. Transferir 1.5 ml del cultivo bacteriano a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Centrifugar a 10000 r.p.m. durante 5 min. y descartar el sobrenadante.
3. Repetir pasos 1 y 2
4. Adicionar al pellet 350  $\mu$ l de STET caliente (NaCl 0.1M, Tris-HCl pH 8.0 10 mM, EDTA pH 8.0 1 mM, Tritonx-100 al 5%) y resuspender fuertemente.
5. Adicionar 25  $\mu$ l de lisozima fresca (solución de 10 mg/ml en 10 mM Tris-HCl pH 8.0) mezclar suavemente hasta que se disuelva.
6. Incubar a 100°C por 60 segundos.
7. Centrifugar a 12000 r.p.m. por 10 min.
8. Remover el pellet con un palillo estéril.
9. Adicionar 33  $\mu$ l de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 42  $\mu$ l de isopropanol frío y mezclar por inversión suavemente.
10. Incubar 5 min. a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 12000 r.p.m. por 5 min. a 4°C
12. Descartar el sobrenadante y secar invirtiendo el tubo sobre una toalla de papel.
13. Añadir 1 ml de etanol 70% frío.
14. Centrifugar a 12000 r.p.m. por 2 min. a 4°C.
15. Descartar el sobrenadante y dejar secar completamente a temperatura ambiente.
16. Resuspender el pellet en 20  $\mu$ l de TE (10 mM Tris HCl, pH 8. 1 mM EDTA).

17. Adicionar ARNasa (10mg/ml).
18. Incubar 20 min a 37°C.
19. Verificar por electroforesis en gel de agarosa 1% el producto obtenido.

### 5.8. Digestión enzimática y amplificación con los cebadores M13

Antes de enviar a secuenciar los plásmidos se realizó una digestión enzimática con EcoR I y Hind III (Promega), para evaluar el polimorfismo de los fragmentos en los clones con la región V1-V9, se realizó varias veces modificando la concentración del ADN, la concentración de las enzimas y el tiempo de exposición.

Adicionalmente se realizó una amplificación con los cebadores M13F y M13R usando como molde el ADN plasmídico (Anexo 4). En otro intento se hizo una dilución 1:20 del ADN plasmídico purificado para usarlo como molde en la amplificación. Finalmente se realizó una PCR a partir de la colonia bacteriana.

**Tabla 6.** Componentes de digestión enzimática para dos tratamientos a 37°C.

Componentes	Concentración	Volumen (µl)	
		Digestión 1	Digestión 2
Agua		6.4	5.9
Buffer	10X	1.0	1.0
BSA		0.1	0.1
Plásmido		2.0	2.0
*Enzima de restricción	10 u/µl	0.5	1.0
Tiempo de incubación		3 horas	24 horas

\*Las enzimas utilizadas fueron Hind III y EcoR I (Promega)

Tras los intentos fallidos de digestión enzimática con Hind III y EcoR I, y la amplificación con M13 F/M13R, se decidió continuar con la tercera metodología y enviar a secuenciar los plásmidos recombinantes con la región V3 a MacroGen USA (Orden 131220UMDN-073), para el posterior análisis bioinformático.

### 5.9. Secuenciación y análisis bioinformático

Se envió el producto de amplificación por PCR purificado y cuantificado de las regiones V3 de las cinco muestras, (corredores Monos y Pavas, bosques Barbas y Bremen y potrero), a MacroGen Korea (Orden 1310KFP-0008), para su secuenciación en un solo sentido, pero debido al alto costo del análisis se tomó la

decisión de procesar tres muestras (corredor Monos, Bosque Bremen y potrero). Por otra parte, las secuencias resultantes de los plásmidos recombinantes (27) con la región V3 de tres muestras (corredor Monos, bosque Bremen y potrero), enviadas a Macrogen USA (Orden 131220UMDN-073). Una vez finalizada la secuenciación se puede comparar la secuencia de nucleótidos con secuencias disponibles en las diferentes bases de datos como GenBank, Ribosomal Database Project (RDP). Usando el programa informático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se realizan alineamientos con secuencias similares a la secuencia de interés para conocer el respectivo porcentaje de homología y finalmente asociar la secuencia problema a una especie (Madden 2002). Para las bacterias identificadas por el gen *rrs*, la mayoría de los taxónomos aceptan una puntuación de porcentaje de identidad  $\geq 97\%$  y  $\leq 99\%$  para clasificar un microorganismo al género y especie, respectivamente. (Reller *et al.* 2007).

#### **5.10. Construcción de árbol filogenético**

Se utiliza el programa MEGA 5.1, de previo conocimiento y manejo, y un bootstrap de 1000 para determinar la diversidad filogenética aproximada a nivel de género que presentan las comunidades bacterianas identificadas.

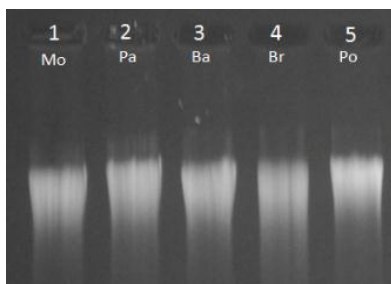
MEGA es un programa libre que permite alinear secuencias, inferir árboles filogenéticos, estimar distancias entre taxa y tasas de evolución, así como evaluar hipótesis evolutivas. (Tamura *et al.* 2011)

## 6. Resultados

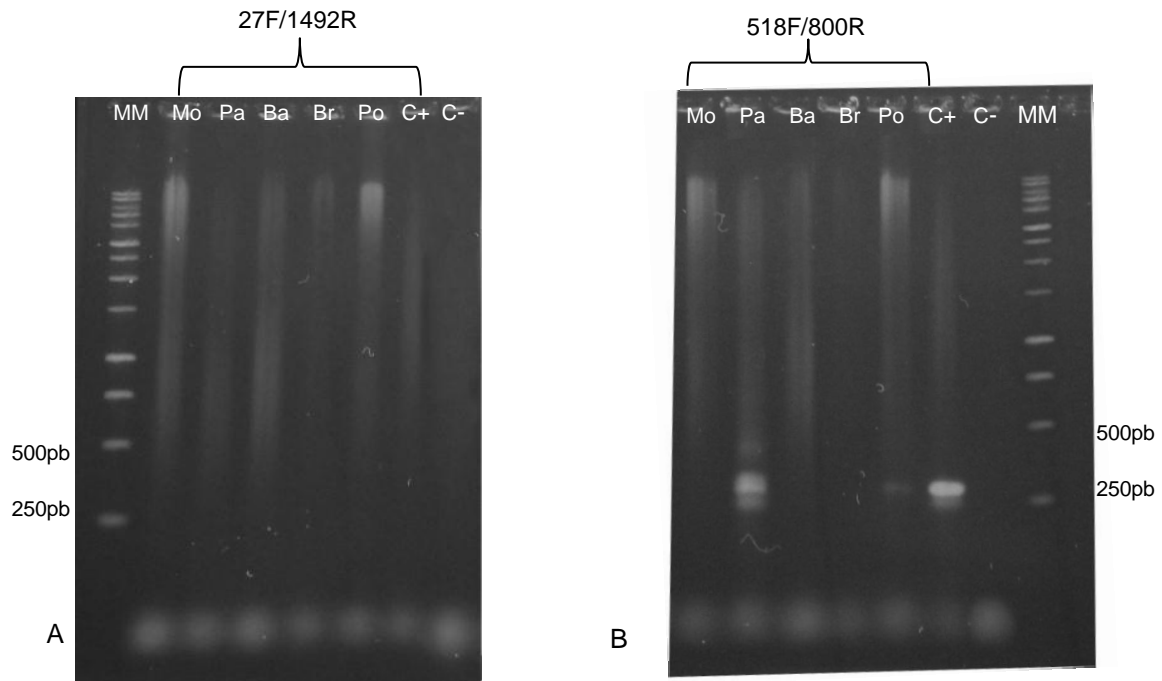
### 6.1. Extracción de ADN y Amplificación por PCR

En la Figura 5 se observa la electroforesis en gel de agarosa 1% de la extracción de ADN metagenómico, con el kit comercial UltraCleanSoil® DNA Isolation Kit (MO-BIO). La extracción se realizó siguiendo el protocolo del kit sin ninguna modificación. Se obtuvo un barrido, es decir que la banda no está definida en ninguna de las 5 muestras de suelo de cada una de las zonas. Se realizó una PCR para la amplificación de dos regiones del gen *rrs* utilizando los cebadores (27F/1492R y 518F/800R) pero no hubo amplificación, como se muestra en el anexo 1. Posteriormente se incluyó un control positivo para verificar el estado de los cebadores, este control fue una bacteria aislada del suelo. En la figura 6. se observa que no hubo amplificación con el par de cebadores 27F/1492R en ninguna de las muestras y con el par de cebadores 518F/800R sí hubo amplificación de la muestra del corredor Pavas y del control positivo, también se alcanza a reconocer una leve banda en la muestra del potrero. Las bandas estaban a la altura esperada pero había impurezas.

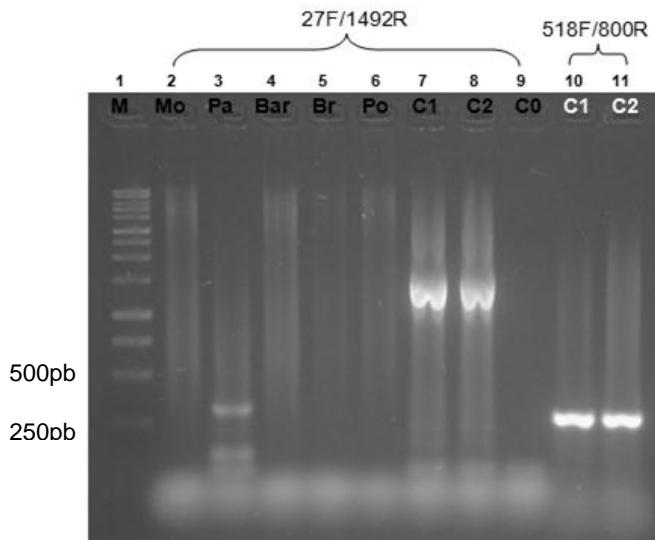
Al realizar una PCR control de reactivos y ADN, sólo amplificaron el control positivo y la muestra del ADN metagenómico del corredor Pavas (Figura 7). Se evidenció que el cebador 1492R tenía fallas dado que en un PCR control para éste cebador no amplificó en ninguno de los casos donde se hacían combinaciones con otros cebadores.



**Figura 5.** Extracción sin modificaciones en el protocolo. Electroforesis en gel de agarosa 1%, TBE 1X, 90 v. 4  $\mu$ l ADN con 5  $\mu$ l SYBR Green-Blue juice. El orden de las muestras de ADN metagenómico es el siguiente: carril 1 Monos (Mo), carril 2 Pavas (Pa), carril 3 Barbas (Ba), carril 4 Bremen (Br), carril 5 potrero (Po).

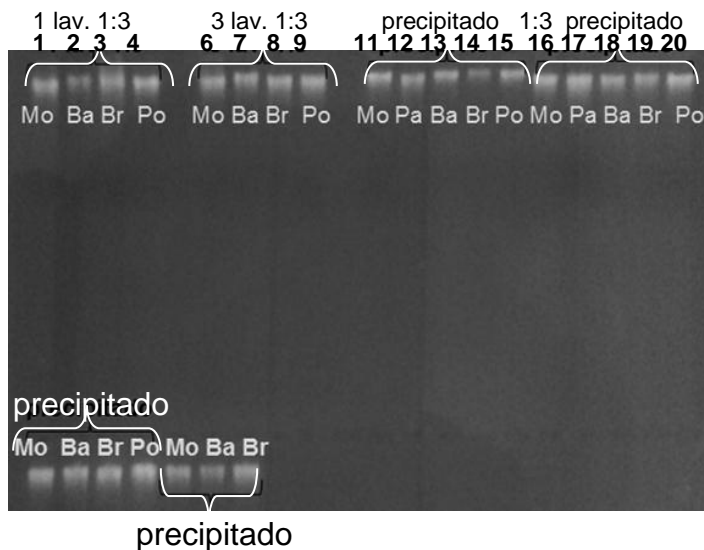


**Figura 6.** Amplificación por PCR de las regiones V1-V9 y V3. Se utilizaron los cebadores universales (tabla 1). Electroforesis en gel de agarosa 1%, GelRed (1:10000), TBE 1X 90 v. 10  $\mu$ l del producto de PCR con 3  $\mu$ l Blue juice. Marcador 1Kb (Promega). A) No hubo amplificación de la región V1-V9 en ninguna muestra. B) La amplificación de la región V3 se logró en la muestra del ADN metagenómico de Pavas (Pa) y en el control positivo (C+).



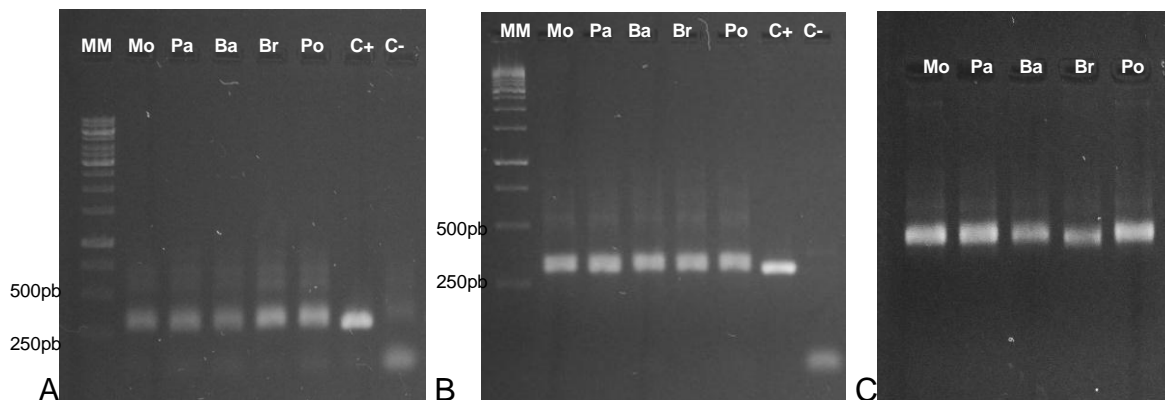
**Figura 7.** PCR control de reactivos y ADN. Electroforesis en gel de agarosa 1%, GelRed (1:10000), TBE 1X 90 v. 10  $\mu$ l del producto de PCR con 3  $\mu$ l Blue juice. Marcador 1Kb (Promega). Solo en la muestra de Pa hubo amplificación utilizando reactivos comerciales y cebadores de otra alícuota. En los controles si hubo amplificación de la región V1-V9 y V3.

Las modificaciones en el protocolo de extracción y el tratamiento de precipitación mejoraron la calidad del ADN metagenómico, como se muestra en la Figura 8. Se logró eliminar en gran parte los inhibidores de la PCR, como los ácidos húmicos. Las bandas se ven definidas en la mayoría de las muestras, lo que confirma que las modificaciones fueron acertadas.



**Figura 8.** Modificaciones en la extracción de ADN metagenómico. Electroforesis en gel de agarosa 1%, TBE 1X, 70 v. 5 µl ADN con 5 µl SYBR Green-Blue juice. Carril 1 al 4, dilución 1:3 del producto de extracción con el kit comercial de las muestras de Mo, Ba, Br y Po. Carril 6 al 9, dilución 1:3 de la extracción modificada con 3 lavados usando la solución S4 para las muestras de Mo, Ba, Br y Po. Carril 11 al 15, dilución 1:3 del ADN extraído con el kit y precipitado de las muestras de Mo, Pa, Ba, Br y Po. Carril 16 al 20 (arriba) y 1 al 4 (abajo), ADN metagenómico extraído con el kit y precipitado de las muestras de Mo, Pa, Ba, Br, Po, Mo, Ba, Br y Po. Carril 5 al 7 (abajo), ADN precipitado después de la extracción modificada con 3 lavados con la solución S4 de las muestras de Mo, Ba y Br.

En el proceso de estandarización se realizaron diversas amplificaciones, con los reactivos no comerciales, de los dos fragmentos del 16S rARN, como se muestra en el anexo 2; hasta lograr las condiciones que permitieron la obtención de bandas definidas, sin impurezas y de alto contraste, tanto con los reactivos no comerciales como con los comerciales, para su posterior purificación (Figura 9).

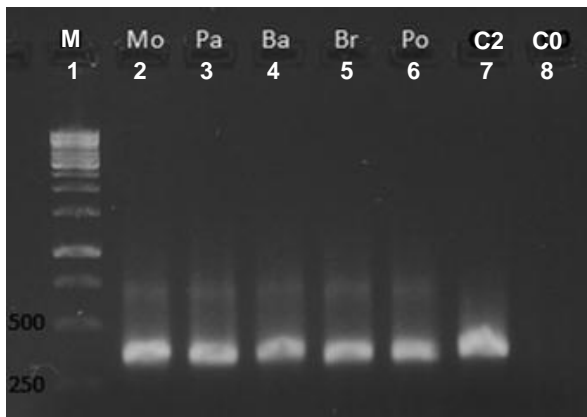


**Figura 9.** Amplificación de la región V3 del 16S rARN y purificación. A) Electroforesis en gel de agarosa 1%, TBE 1X, 90 v. 5  $\mu$ l ADN con 5  $\mu$ l SYBR Green-Blue juice, la PCR se realizó con reactivos no comerciales. Marcador 1Kb (Promega). Hubo amplificación en todas las muestras. B) Electroforesis en gel de agarosa 2%, TBE 1X, 70 v. 5  $\mu$ l ADN con 5  $\mu$ l SYBR Green-Blue juice, la PCR se realizó con reactivos comerciales. Hubo amplificación de todas las muestras. C) Producto de PCR de la región V3 del 16S rARN de todas las muestras amplificadas con reactivos comerciales, purificado con el Kit de limpieza Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).

**Tabla 7.** Cuantificación de ADN en el NanoDrop 2000 antes del enviar las muestras a MacroGen Korea.

Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ l)
Monos	90.3
Pavas	84.2
Barbas	91.2
Bremen	70.4
Potrero	68.4

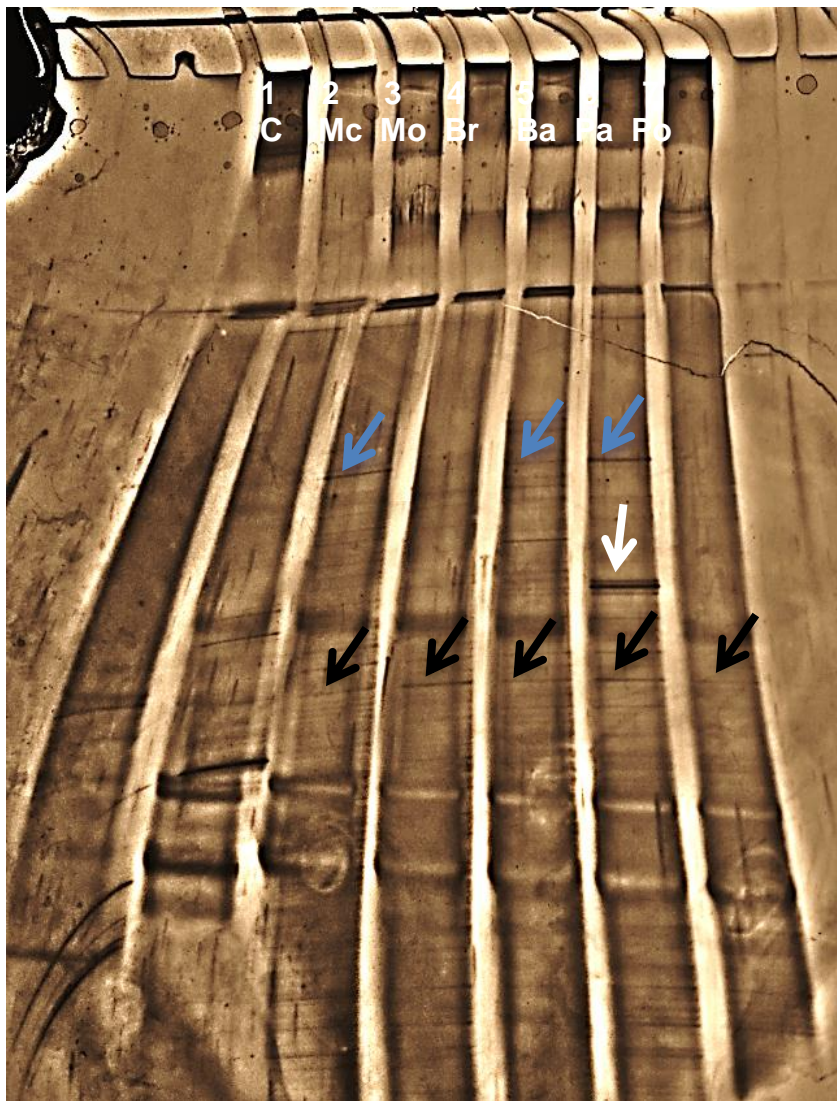
La amplificación del gen *rrs* con los cebadores y 518F/800R para la realización de la reamplificación con los cebadores y 518-GC F/800R no tuvo ninguna complicación. Se obtuvieron bandas definidas de alto contraste, del tamaño esperado (300pb.), como se muestra en la figura 10. Estas muestras se utilizaron para la DGGE.



**Figura 10.** Reamplificación empleando los cebadores 518-GCF/800R. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%, TBE 1X, 90 v. 5  $\mu$ l ADN con 5  $\mu$ l SYBR Green-Blue juice. Carril 1 Marcador 1Kb (Promega). Del carril 2 al 6 se puede observar la reamplificación de la región V3 de las muestras del corredor Monos (Mo), corredor Pavas (Pa), bosque de Barbas (Ba), bosque de Bremen (Br) y potrero (Po). Carril 7 control positivo (C2). Carril 8, control negativo (Co).

## 6.2. DGGE

A continuación se presenta el resultado de DGGE, luego de su estandarización. Se observan los patrones de bandas obtenidos con los cebadores bacterianos específicos para la región V3. Estos patrones de bandas representan las comunidades de bacterias presentes en cada una de las muestras. Hay elementos comunes entre las diferentes zonas muestreadas (flechas negras, Figura 11), bandas que son compartidas por algunas muestras (flechas azules, Figura 11), como también elementos exclusivos (flecha blanca, Figura 11) y dominantes. Adicionalmente se observa que la intensidad de las bandas varía entre los elementos comunes. La cantidad de bandas visibles cambia entre las muestras, indicando la diversidad bacteriana presente en cada una de las zonas muestreadas. Se observan más bandas en el bosque de Barbas (58) que en las demás muestras, y éstas tienen la misma intensidad. El bosque de Bremen ocupa el segundo lugar en diversidad con aproximadamente 51 bandas, seguido por los corredores Monos y Pavas; finalmente en la muestra del Potrero se observa una menor cantidad de bandas 32, la mayoría de estas son elementos comunes con otras muestras y de baja intensidad. Hay elementos que sólo se encuentran en los corredores Monos y Pavas y la intensidad de la banda es levemente mayor a las demás bandas.



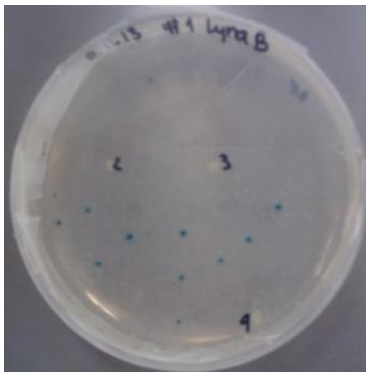
**Figura 11.** DGGE teñido con plata. Las bandas representan las comunidades bacterianas presentes en la muestra. Carril 1 control, “pool” de 4 bacterias. Carril 2 muestra compuesta. Carril 3 muestra del corredor Monos (Mo). Carril 4 muestra del bosque Bremen (Br). Carril 5 muestra del bosque Barbas (Ba). Carril 6 muestra del corredor Pavas (Pa). Carril 7 muestra del potrero (Po). Las flechas negras señalan los elementos comunes entre las zonas de muestreo, las flechas azules muestran un ejemplo de elementos compartidos por varias zonas y la flecha blanca indica un elemento exclusivo del corredor Pa.

### 6.3. Clonación, alfa complementación y Construcción de librería genómica

El producto de PCR de la amplificación de las regiones V3 y V1-V9 se clonó empleando células competentes de la cepa *E.coli* DH5 $\alpha$  y el kit TA Cloning® Kit with pCR™2.1. Mediante el sistema de alfa-complementación se diferenciaron 56 colonias blancas, como se presenta en la tabla 8. A partir de estas colonias aisladas se construyeron 2 librerías.

**Tabla 8.** Conteo de colonias recombinantes.

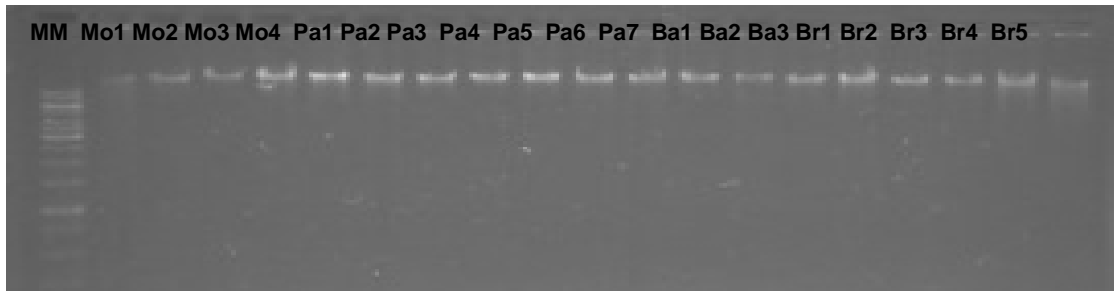
Muestra	Numero de colonias blancas
Monos (V1-V9)	4
Pavas (V1-V9)	7
Barbas (V1-V9)	3
Bremen (V1-V9)	6
Potrero (V1-V9)	4
Monos (V3)	7
Pavas (V3)	5
Bremen (V3)	10
Potrero (V3)	10



**Figura 12.** Sistema de alfa-complementación para la identificación de clones bacterianos recombinantes. Se pueden observar las colonias azules y blancas que crecieron en la muestra de Monos (V1-V9).

#### 6.4. Purificación de ADN plasmídico

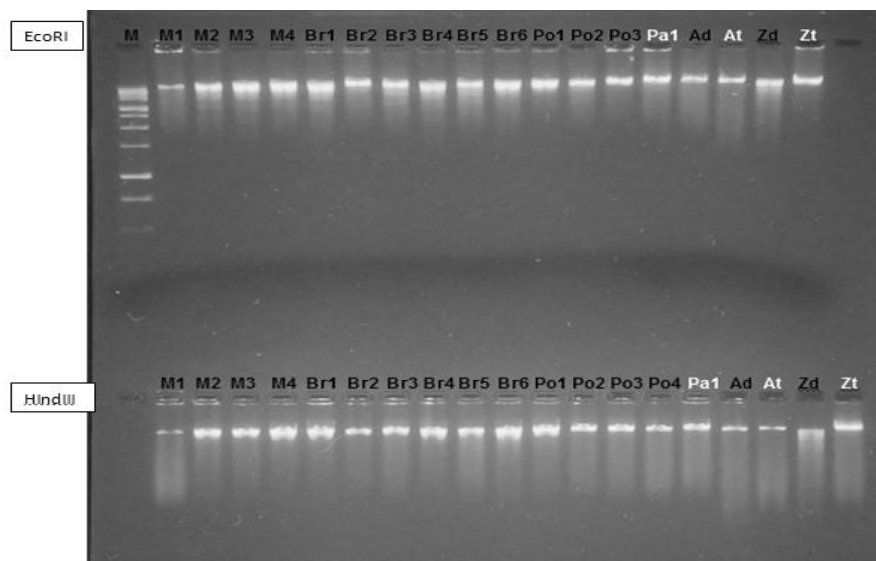
Se consiguió purificar el ADN plasmídico de las 56 colonias recombinantes cultivadas, teniendo un buen rendimiento como se puede observar en la Figura 13.



**Figura 13.** Purificación de ADN plasmídico de las colonias recombinantes cultivadas. Electroforesis en gel de agarosa 1%, TBE 1X, 90 v. 2  $\mu$ l ADN con 4  $\mu$ l SYBR Green-Blue juice. Carril 1 Marcador 1Kb (Promega). Del carril 2 al 5, ADN plasmídico de 4 colonias de la muestra de Monos (V1-V9). Carril 6 al 12, ADN plasmídico de 7 colonias de la muestra de Pavas. Carril13 al 15 ADN plasmídico de 3 colonias de la muestra de Barbas. Carril 16 al 20 ADN plasmídico de 5 colonias de la muestra de Bremen.

#### 6.5. Digestión enzimática y amplificación

La digestión enzimática con EcoR I y Hind III (Promega), para evaluar el polimorfismo de los fragmentos en los clones con la región V1-V9 no fue exitosa. Debido a esto no fue posible evaluar el polimorfismo de los fragmentos en los clones.



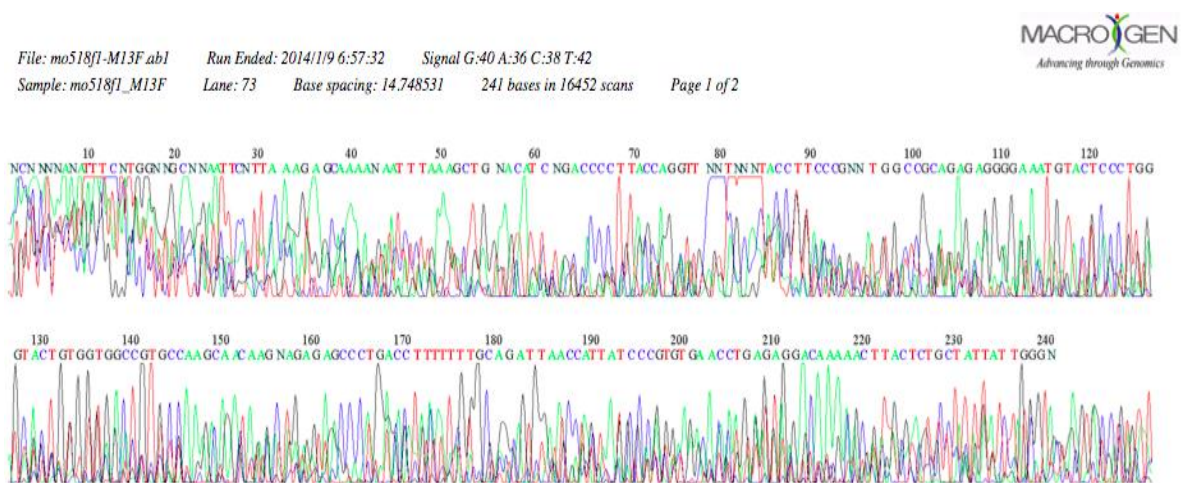
**Figura 14.** Digestión enzimática con EcoR I y Hind III. En blanco se representan controles negativos (sin enzima). Como controles positivos se incluyeron Ad: *Oryza sp* con enzima. Zd: *Zephiranthes* (Amarillydaceae) con enzima, pero tampoco hubo digestión en estas muestras. At : ADN total de *Oryza sp* y Zt: ADN total de *Zephiranthes*.

La amplificación con los cebadores M13F y M13R usando como molde el ADN plasmídico no presentó amplificación (Anexo 4) en ninguno de los casos (ADN sin diluir, dilución 1:20 y PCR directo de colonia).

## 6.6. Secuenciación y análisis bioinformático

Las muestras enviadas a MacroGen Korea fueron procesadas dos meses después del envío y la construcción de librerías fracasó (Reporte: MACQCREPORT\_V1\_121106).

Los resultados de la secuenciación de los 27 plásmidos recombinantes con la región V3, presentaron impurezas que impidieron un correcto análisis bioinformático (Figura 15). Se solicitó el servicio de resecuenciación de las muestras bajo la orden 131220UMDN MacroGen USA.



**Figura 15.** Cromatograma de la muestra de Monos (V3). Plásmido recombinante con la región V3.

## 7. Discusión

En este estudio se emplearon distintas metodologías moleculares para lograr la identificación molecular de las comunidades bacterianas existentes en una muestra de suelo tomada de un ecosistema en proceso de restauración ecológica (corredor biológico Monos, Barbas-Bremen, Filandia - Quindío), a partir del análisis de la secuencia de fragmentos del gen *rrs* amplificados por PCR y la técnica de PCR-DGGE basada en la amplificación de una región hipervariable del 16S rARN y su análisis electroforético.

Daniel (2005) al tener en cuenta la diversidad de especies microbianas y la compleja matriz del suelo, que contiene muchos compuestos (tales como los ácidos húmicos) que se unen al ADN e interfieren con la modificación enzimática de ADN, plantea que para la recuperación de ADN microbiano para la clonación o la PCR es necesario hacer los ajustes pertinentes que posibiliten la obtención de ADN metagenómico libre de impurezas. Por tanto en este estudio, dadas las condiciones de impureza del ADN metagenómico, identificadas con la electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 5), al seguir el protocolo del kit comercial UltraCleanSoil® DNA Isolation Kit (MO-BIO), se incluyeron las siguientes modificaciones buscando mejorar la calidad del ADN metagenómico:

- Aumento en el número de lavados (3 lavados) de la columna.
- Precipitación del ADN.
- Dilución 1:3 del ADN obtenido.

Este proceso fue desarrollado a partir de 4 extracciones y 6 modificaciones hasta lograr las condiciones óptimas en el producto de extracción.

Es importante considerar que aunque estas estrategias purificaron el ADN metagenómico, también puede haber pérdida de material genético.

Se evaluó la pureza *rrs* rARN y se determinó la presencia de inhibidores de la PCR (Figura 7). Debido a que la Taq polimerasa es muy sensible a los ácidos húmicos y otros inhibidores potenciales que se encuentran en el suelo, la amplificación por PCR es un método óptimo para evaluar la pureza del ADN metagenómico extraído del suelo (Whitehouse, & Hottelb, 2007). Es así como este estudio se apoya en la evaluación realizada por Whitehouse, & Hottelb (2007) en la cual utilizan distintos kits comerciales, incluyendo el UltraCleanSoil® DNA Isolation Kit (MO-BIO). En el presente estudio se utilizó el mismo kit verificando, mediante amplificación por PCR, que se requieren ajustes para mejorar la calidad del ADN.

La estandarización de la amplificación por PCR fue un proceso extenso (2.5 meses), porque los ácidos húmicos contenidos en el ADN metagenómico extraído inicialmente interfirieron. Las modificaciones realizadas en el protocolo de

extracción de ADN mencionadas anteriormente, mejoraron los resultados. Esto permitió amplificar específicamente las regiones V3 y V1-V9.

Se amplificaron estas regiones específicas porque: la región V1-V9 permite amplificar casi la totalidad del gen y así con una de las metodologías empleadas se buscaba analizar los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, pero los resultados no permitieron avanzar en esta metodología, dado que la digestión no se presentó (Figura 14).

Se realizó la amplificación de la región V3 porque tiene una alta variabilidad y además para la ejecución de la DGGE es necesario un fragmento que no supere las 500 pb. (Muyzer *et al.* 1993; Abrams & Stanton, 1992). Esta amplificación específica en combinación con otras técnicas moleculares como la DGGE, permiten un acercamiento a la identificación de la composición estructural bacteriana, específica, como lo propuso Boon *et al.* (2002).

La DGGE permite la separación de fragmentos de ADN de igual tamaño, pero con variaciones en la secuencia de nucleótidos (Muyzer & Smalla 1998). En este estudio se confirma lo anteriormente planteado por Muyzer & Smalla (1998), ya que en el gel se visualizaron gran cantidad de bandas por la separación de los fragmentos de igual tamaño con secuencias distintas, porque al presentarse el cambio de una base nucleotídica, se alteran drásticamente las interacciones de apilamiento y puede cambiar la temperatura de fusión en 1°C, alterando el patrón de migración de las bandas a través de la matriz del gel (Myers *et al.* 1988; Abrams & Stanton 1992; Bassam & Gresshoff 2007). En el gel de la DGGE (Figura 11) se puede inferir que las bandas con mayor intensidad son aquellas que representan comunidades bacterianas con alta abundancia (Boon *et al.* 2002) pero debido a la similitud en las bandas en los geles de poliacrilamida, para la diferenciación de las comunidades bacterianas, se hace necesario buscar métodos alternativos que permitan realizar un análisis profundo para establecer las diferencias entre estas (Heuer *et al.* 1999).

Con base en los resultados obtenidos se podría argumentar que la diferencia en la diversidad presentada en las zonas muestreadas se debe al estado sucesional del ecosistema y el contenido de materia orgánica. En un bosque maduro como Barbas se espera encontrar un mayor porcentaje de materia orgánica que en un corredor donde el proceso de sucesión es temprano, o como en las zonas de potrero ya que la biomasa acumulada es menor. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en los análisis físico-químicos de las tres zonas (Delgado 2013) donde se observa que el bosque maduro de Barbas fue la zona con mayor porcentaje de materia orgánica, seguido por el corredor Monos y finalmente el Potrero. Es así como se puede explicar que la mayor diversidad bacteriana esté asociada al bosque maduro, el corredor biológico es muy similar en la mayoría de las comunidades bacterianas pero su menor diversidad se puede deber al estado temprano de sucesión pero con el tiempo se acercará a la diversidad del bosque maduro.

La digestión enzimática y la amplificación fueron dos metodologías que no dieron buenos resultados. Es posible que luego de la purificación del ADN plasmídico no se hayan realizado las diluciones necesarias para que el ADN no inhibiera la reacción de amplificación y digestión.

Por otra parte, debido a que las muestras enviadas a Macrogen Korea fueron procesadas dos meses después del envío, la construcción de librerías fracasó (Reporte: MACQCREPORT\_V1\_121106) y no se pudo realizar la secuenciación, por consiguiente no se contó con la información para ser analizada con el programa bioinformático.

Los resultados de la secuenciación de los 27 plásmidos recombinantes con la región V3, presentaron impurezas que impidieron un correcto análisis bioinformático (Figura 15), posiblemente los artefactos se deben al ADN metagenómico.

## 8. Conclusiones

Se construyeron 2 librerías genómicas con las regiones V1-V9 y V3, las cuales se encuentran criopreservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis.

Se logró extraer ADN metagenómico de las muestras de suelo de diferentes zonas del corredor Barbas-Bremen, utilizando el kit UltraCleanSoil® DNA Isolation Kit (MO-BIO), con dos lavados adicionales a la columna, una precipitación del ADN y una dilución 1:3 para eliminar los ácidos húmicos.

Se estandarizaron las condiciones para la amplificación por PCR de las regiones V3 y V1-V9 del gen *rrs*, con reactivos no comerciales y comerciales, obteniendo bandas definidas y de alto contraste.

La técnica de DGGE, empleando la reamplificación del fragmento de la región V3, con un gradiente de desnaturalización de 30-70% durante 16 horas permitió una aproximación al conocimiento de la diversidad de comunidades bacterianas en cada una de las zonas evaluadas del corredor Barbas-Bremen.

La tinción con plata permitió visualizar patrones de bandas que representan las comunidades bacterianas comunes a todas las muestras, exclusivas o compartidas por algunas muestras.

La muestra del bosque de Barbas presentó un patrón de bandas de mayor diversidad con respecto a las otras muestras, seguido por el corredor monos, el bosque de Bremen, el corredor Pavas y finalmente el potero.

## 9. Recomendaciones

Se ha demostrado que la utilización de una sola técnica de extracción no es suficiente para conseguir la totalidad del ADN metagenómico (Tebbe & Vahjen, 1993). En concordancia con varios autores (Daniel, 2004; Tebbe & Vahjen, 1993) la extracción de ADN metagenómico es un proceso que merece toda la atención y esfuerzo para que no haya un sesgo que afecte la obtención la totalidad de ADN metagenómico. De esta manera, la metagenómica del suelo puede proporcionar una evaluación de las comunidades microbianas presentes, que no son cultivables (Ghazanfar *et al.* 2010). Por lo anterior, se recomienda utilizar distintos métodos de extracción de ADN para enriquecer una muestra compuesta a partir de estos y no sesgar la muestra a un solo método de extracción que podría estar dejando por fuera gran cantidad de información.

Se sugiere realizar análisis fisicoquímicos del suelo que permitan conocer la naturaleza del suelo del cual se toman las muestras, porque su composición podría intervenir de forma negativa en la obtención del ADN metagenómico.

Es necesario complementar las técnicas moleculares con las técnicas microbiológicas clásicas para evaluar desde dos perspectivas diferentes (cultivables y no cultivables) la diversidad bacteriana del suelo.

Se recomienda continuar con la evaluación de las regiones V1-V9 y V3 de las librerías construidas y el análisis metagenómico de las muestras.

## 10. Referencias

- Abrams, E. S. y Stanton Jr, V. P. (1992). Use of denaturing gradient gel electrophoresis to study conformational transitions in nucleic acids. *Methods in enzymology*, 212, 71-104.
- Aristizaba, M. I. (2011). Dinámica poblacional de bacterias de la filósfera de banano (*Musa sp.*) por acción de sustratos foliares relacionado al control de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Universidad Nacional de Colombia.
- Arjun, J. K. y Harikrishnan, K. (2011). Metagenomic analysis of bacterial diversity in the rice rhizosphere soil microbiome. *Biotechnol Bioinform Bioeng*, 1, 361-367.
- Barrera-Cataño, J. I. y Valdés-López, C. (2007). Herramientas para Abordar la Restauración Ecológica de Áreas Disturbadas en Colombia. *Universitas Scientiarum* Revista de la Facultad de Ciencias Edición especial II, Vol. 12, 11-24
- Barrera-Cataño, J. I., Aguilar M. y Rondón-Camacho D. (2008). Experiencias de restauración ecológica en Colombia. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Bassam, B. y Gresshoff, P. (2007). Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 2649-2654.
- Bedoya, J. J. (2007). Valoración Inicial del Potencial de Conectividad de Corredores Biológicos por Medio de Mamíferos Terrestres Medianos y Grandes en un Bosque Subandino. *Trabajo de Grado*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Boon, N., De Windt, W., Verstraete, W. y Top, E. M. (2002), Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 39: 101–112.
- Burke, W., Gabriels, D. y Bouma, J. (1986). Soil structure assessment. *Soil structure assessment*.
- Castillo, F., Roldán, M. D., Blasco, R., Huertas, M. J., Caballero, F. J., Moreno-Vivián, C. y Martínez, M. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Tebar, Madrid. Pg 357
- Comisión Centroamericana de Ambiente y Desarrollo (CCAD), Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), Fondo para el Medio Ambiente Mundial (GEF). (2002). “Proyecto Para La Consolidación del Corredor Biológico Mesoamericano”.

Cushman, S. A., McRae, B., Adriaensen, F., Beier, P., Shirley, M. y Zeller, K. (2013). Biological corridors and connectivity. *Key Topics in Conservation Biology* 2, 384-404.

Daniel, R. (2004). The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *Elsevier*, 199-204.

Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 3: 470-478.

Delgado, M. (2012). Aplicación de las Características Fisicoquímicas del Suelo como Indicadoras de la Efectividad de las Estrategias de Restauración Implementadas en el Corredor Barbas–Bremen (Quindío – Colombia). *Trabajo de Grado*. Santiago de Cali. Universidad Icesi

Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas (DESA). (2010). Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM). New York. 54-59

Dong, X. y Reddy, G.B. (2010). Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. *Bioresource Technology* 101: 1175-1182

Eisen, J., Smith, S., y Cavanaugh, C. (1992). Phylogenetic Relationships of Chemoautotrophic Bacterial Symbionts of *Solemya velum* Say (Mollusca: Bivalvia) Determined by 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Journal of Bacteriology*. 174: 3416-3421.

Falk, D., Palmer, M. y Zedler J. (2006). *Foundations of Restoration Ecology*. Washington: Island Press.

Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R., Robeson, M., Edwards, R. A., Felts, B., Rayhawk, S., Knight, R., Rohwer, F. y Jackson, R. (2007). Metagenomic and Small-Subunit rARN Analyses Reveal the Genetic Diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 73: 7059–7066.

Filiona, M., St-Arnaud, M. y Jabaji-Harea, S. (2003). Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods Elsevier Ltda*. Vol. 53: 67–76.

Gaona, J. G., García, Y., Rodríguez, J. y Martínez, G. (2012). Análisis de la diversidad bacteriana por métodos moleculares no dependientes del cultivo microbiano. *Cienciencia* vol.29. Departamento de Biotecnología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Mexico.

- Galkiewicz, J. P., & Kellogg, C. A. (2008). Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 74 (24) : 7828-7831.
- Ghazanfar, S., Azim, A., Ghazanfar, M., Anjum, M. y Begum I. (2010). Metagenomics and its application in soil microbial community studies: biotechnological prospects. *Journal of Animal & Plant Sciences*. Vol. 6: 611-622.
- Haddad, N. M., Bowne D. R., Cunningham A., Cunningham A., Danielson B., Levey D., Sargent S. y Spira T. (2003). Corridor use by diverse taxa. *Ecology*. Vol. 84: 609–615
- Handelsman, J. (2007). Metagenomics and Microbial Communities. *Encyclopedia of Life Sciences*. Universidad de Wisconsin. Madison.USA.
- Hendrix, P.F., D.A. Crossley Jr., J.M. Blair and D.C. Coleman. 1990. Soil biota as components of sustainable agroecosystems. In: *Sustainable agricultural systems*, C.A. Edwards, R. Lal, P. Madden, R.H. Miler and G. House (Eds.). SWCS, Ankeny, USA. 637-654.
- Heuer, H., Hartung, K., Wieland, G., Kramer , I. y Smalla, K. (1999). Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Applied Environmental Microbiology*, 1045–1049.
- Hilty, J. A., Lidicker, W. Z. y Merendeler, A. M. (2006). Corridor Ecology. The Science and Practice of Linking Landscapes for Biodiversity Conservation. Washington: Island Press.
- Hong, S., Jeong, W. Jung, H. (2002) Amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of polypores and its potential for phylogenetic analysis *Mycologia* 2002 94: 823-833
- Hoorman, J. (2011). The Role of Soil Bacteria. The Fact Sheet, Agriculture and Natural Resources. The Ohio State University. USA
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (1997). NTC4113-6, Gestión ambiental. Calidad de suelo. Muestreo. Guía para la recolección, manejo y almacenamiento de suelo para la evaluación de procesos microbianos aeróbicos en el laboratorio. Bogotá, D.C.
- Jackson, C.R., Roden, E.E. y Churchill, P.F.(2000) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Can Fail to separate 16s rDNA fragments with multiple base differences. *Molecular Biology*, vol 1(2): 49-51.

- Kirk, J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H. y Trevors J.T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 58: 169–88.
- Lauber, C.L., Ramirez, K., Aanderud, Z., Lennon J. y Fierer, N. (2013) Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *International Society for Microbial Ecology. The ISME Journal* 1–10.
- Li, M., Zhou, M., Adamowicz, E., Basarab, J. A. y Guan, L.L. (2012). Characterization of bovine ruminal epithelial bacterial communities using 16S rRNA sequencing, PCR-DGGE, and qRT-PCR analysis. *Veterinary microbiology*, 155(1): 72-80.
- Lizarazo, L.M. (2001). Grupos funcionales de microorganismos del suelo: ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. *Suelos Ecuatoriales* 35(1): 59-65
- Lozano, F. H. (2009). Herramientas de Manejo para la Conservación de Biodiversidad en Paisajes Rurales. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt" y Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR).
- Maarit Niemi, R., Heiskanen, I., Wallenius, K. y Lindström, K. (2001). Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods*, 45(3): 155-165.
- Madden T. (2002). The BLAST Sequence Analysis Tool. En: McEntyre J, Ostell J, editors. The NCBI Handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); Capítulo 16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>
- Marin, O., Banguera, N. y Cardona P. (2009) Monitoreo de la Avifauna del AICA Barbas-Bremen y Evaluación de la población de pava caucana (*Penelope perspicax*) en el cañón del río Barbas. Libro: Memorias Del I Simposio Internacional De Investigaciones, Universidad Del Quindío Facultad De Ingeniería. Colombia.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. y 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.
- Muyzer, G, Smalla, K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 73, 127–141.

- Myers, R. M., Sheffield, V. C., Cox, D. R., & Davies, K. E. (1988). Detection of single base changes in DNA: ribonuclease cleavage and denaturing gradient gel electrophoresis. *Genome analysis: a practical approach*, 95-139.
- Pace, N. (1997). A Molecular view of Microbial diversity and the Biosphere. *Science*. 276: 734-740.
- Pedersen, R. T. (2008). Screening for Ulkebugt bacteria capable of inhibiting bacterial pathogens.
- Primack, R. B. (2010). *Essentials of Conservation Biology*. Massachusetts: Sinauer Associates .
- Reddy, M. (2004). Positive selection system for identification of recombinants using alpha-complementation plasmids. *BioTechniques*, 37: 948-953.
- Reed, A. J. (2008). Molecular analysis of microbial 16S rRNA, mcrA, dsrAB and pmoA genes from deep-sea hydrothermal vent and cold seep sites. ProQuest.
- Reller, L. B., Weinstein, M. P., & Petti, C. A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical infectious diseases*. Vol. 44(8), 1108-1114.
- Riesenfeld, C., Schloss, P. y Handelsman J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*. Vol. 38: 525-552.
- Ruiz-Jaen, M.C. y Aide, M. (2005). Restoration Success: How Is It Being Measured? *Restoration Ecology*. Vol. 13, No. 3: 569–577
- Sadeghian, S., Rivera, J. y Murgueitio, R. (1999). Características de suelos en sistemas agropecuarios y forestales para el ordenamiento territorial en el departamento del Quindío, Colombia. In *Memorias Primer Congreso Latinoamericano de Agroforestería para la producción animal sostenible FAO-CIPAV. Material electrónico (DC)*. Editor: Hector Osorio. Cali, Colombia.
- Schloss, P. y Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 14: 303-310.
- Sivila, R. y Hervé, D. (1999). Analisis de la microbiota en suelos cultivados dei Altiplano Central. La Paz: Memorias Primer Congreso Boliviano de la Ciencia dei Suelo.
- Socarrás, A. A., y Rodríguez, M. (2005). Utilización de la mesofauna como indicador biológico en áreas recultivadas con *Pinus cubensis* en la zona minera de Moa, Holguín, Cuba.

Society for Ecological Restoration (SER) International, Grupo de Trabajo sobre Ciencia y Políticas. (2004). Principios de SER international Sobre la Restauración Ecológica . Washington.

Spedding, G. (1990). Ribosomes and Protein Synthesis. The Practical Approach Series. IRL Press at Oxford University Press, Oxford [England] ; New pg. 211-214

Streit, W. y Schmitz, R. (2004). Metagenomics :the key to the uncultured microbes. *Elsevier*. Vol. 7: 492-498

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood, Distance, and Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. Consultado: 04/06/2013, en <http://www.megasoftware.net/manual.pdf>

Tebbe, C. y Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 2657-2665.

Tomas, V. y Petr, B. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLOS one*, 8: 1-10.

Universidad Politécnica de Valencia (2010). Restauración y Gestión de Áreas Degradadas. Espacios Degradados y Restauración Ambiental. Fuente: Master Universitario de Jardinería y Paisaje Upv

Uribe, L. (1999). Uso de indicadores microbiológicos de suelos: ventajas y limitantes. Conferencia 49. XI Congreso Nacional Agronómico III Congreso Nacional de Suelos.

van Elsas, J. D. y Boersma F. (2011). A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *Euro Journal of Soil Biology*. Vol. 47: 77-87.

Vargas, W. y F. H. Lozano. (2008). El papel de un vivero en un proyecto de restauración en paisajes rurales andinos: Establecimiento del Corredor Barbas-Bremen. Pp. 67-82. En: Barrera-Castaño, J. I., Aguilar M y Rondón-Camacho D. Experiencias de restauración ecológica en Colombia. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Vargas, W.G. (2008). Evaluación de dos estrategias de restauración, su aplicación y evaluación en el establecimiento del corredor Barbas-Bremen, Quindío. Universidad del Valle, Programa de Biología, Maestría en Ciencias Biológicas. Tesis. Santiago de Cali

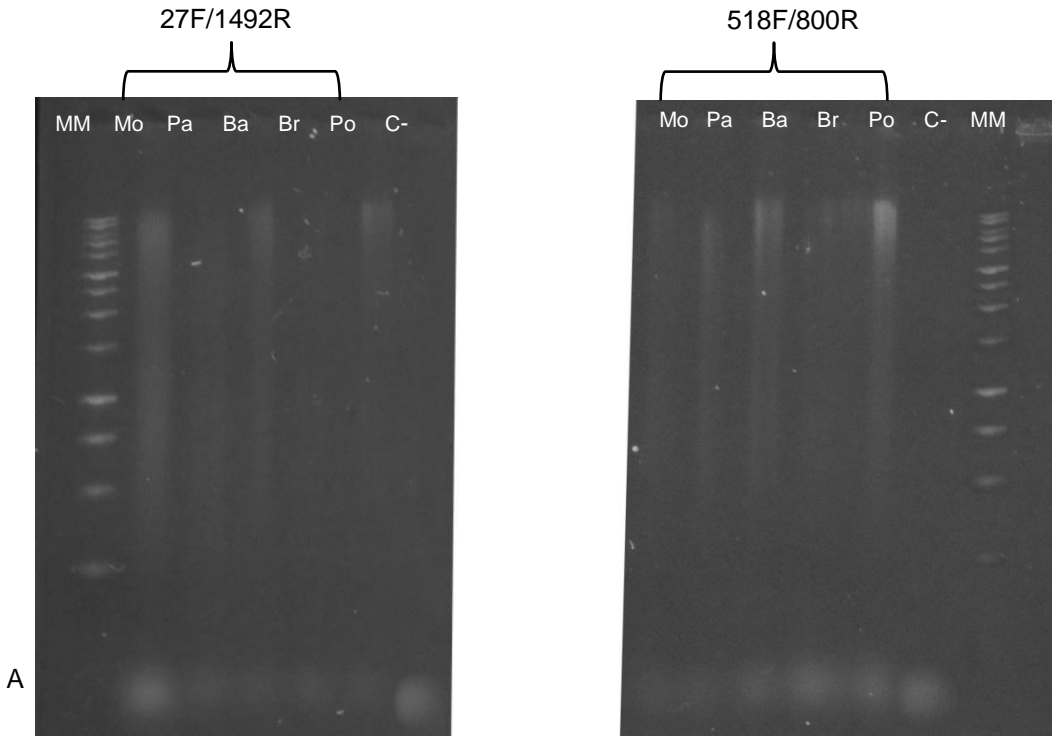
Walker, R., y Craighead, L. (1997). Analyzing Wildlife Movement Corridors in Montana Using GIS. ESRI User Conference Proceedings. California. Consultado 04/06/2013.

<http://proceedings.esri.com/library/userconf/proc97/proc97/to150/pap116/p116.htm>

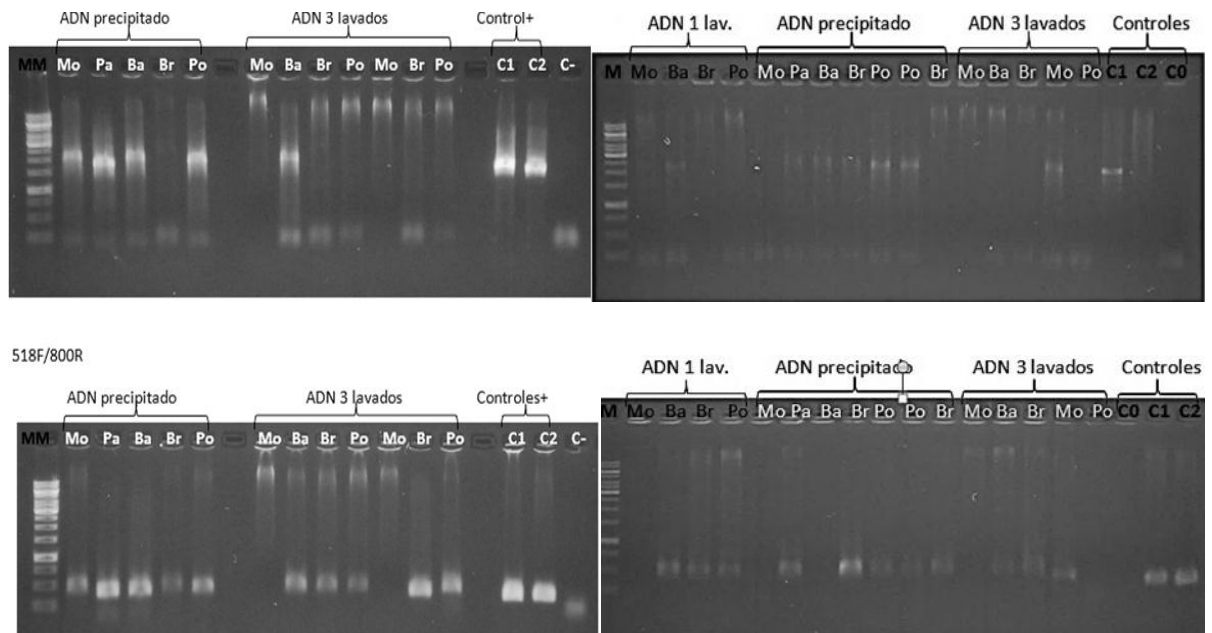
Whitehouse, C. y Hottelb, H. (2007). Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Molecular and Cellular Probes*. Elsevier Ltda. Vol. 21:92–96

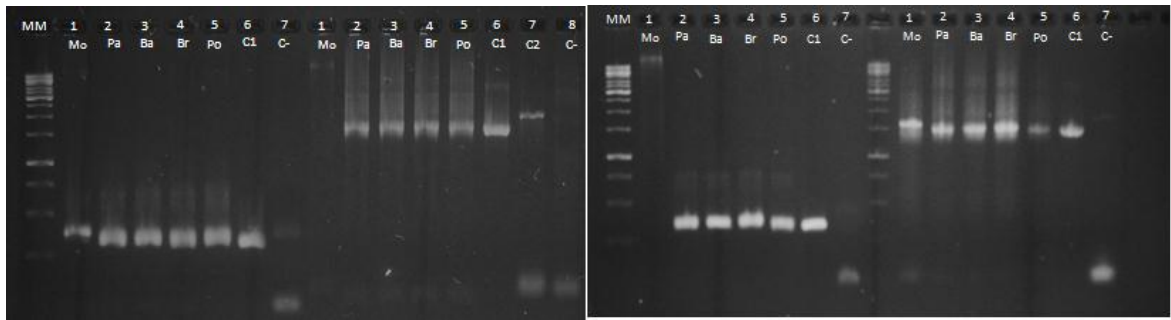
Zeyauallah, Md., Kamli, M., Islam B., Atif, M., Benkhayal, F., Nehal M., Rizvi, M. y Ali A., (2009). Metagenomics - An advanced approach for non-cultivable microorganisms. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 4: 49-54

## 11. Anexos

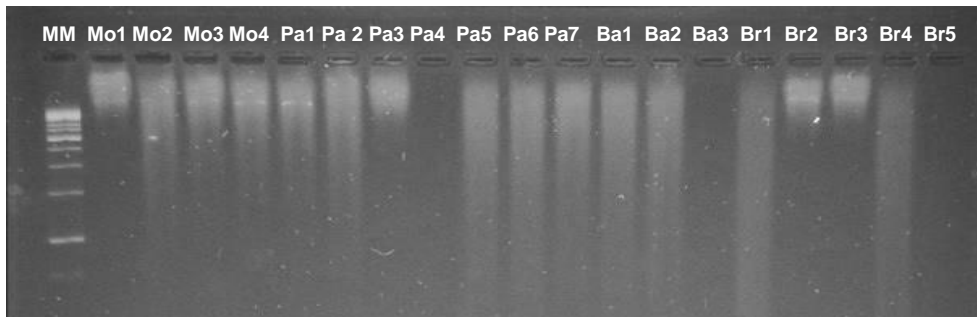


**Anexo 1.** Primera amplificación por PCR con los cebadores (27F/1492R y 518F/800R). Electroforesis en gel de agarosa 1%, GelRed (1:10000), TBE 1X 90 v. 5 µl del producto de PCR con 2 µl Blue juice. Marcador 1Kb (Promega).

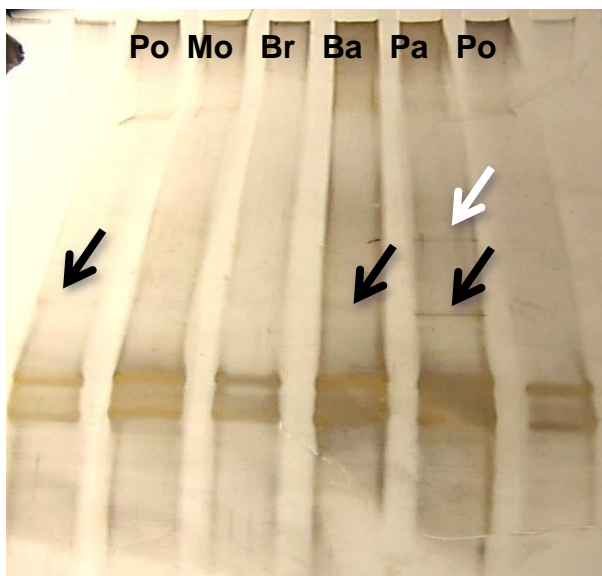




**Anexo 2.** Proceso de estandarización de la PCR. Diversas amplificaciones de los dos fragmentos del gen *rrs*, con reactivos no comerciales. Electroforesis en gel de agarosa 1%.



**Anexo 3.** Amplificación fallida con M13F/M13R.



**Anexo 4.** DGGE corrido durante 14 horas.