



**UNIVERSIDAD DEL AZUAY
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

Identificación del microbioma bacteriano presente en los caparazones de tres especies de tortugas gigantes de Galápagos (*Chelonoidis* spp.) en las islas Santa Cruz e Isabela

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA Y GESTIÓN

Autor:

Miguel Fernando Perea Brugal

Directores:

Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres PhD.

Ainoa Nieto Claudín PhD.

Cuenca, Ecuador

2023

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a mi familia. En particular a mis padres y hermana que me han apoyado durante todo el camino. Gracias por enseñarme a enfrentar los obstáculos que me ha puesto la vida. Me han enseñado a ser la persona que soy hoy, mis principios, mis valores, mi dedicación y resiliencia. Todo con mucho amor y cariño. Los quiero con la vida.

Este trabajo también va dedicado a todas las personas que han sido parte de mi vida, que me han inspirado, enseñado, formado. Ya estén en esta vida o en la siguiente, mis más profundos agradecimientos por estar conmigo en cada paso del camino.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar expresando mi gratitud a todas las personas que con su apoyo científico y humano han contribuido en la elaboración de lo que ha sido este trabajo de investigación.

A la Universidad del Azuay y Fundación Charles Darwin por confiar en lo que empezó solo como una idea y se convirtió en un investigación ambiciosa y desafiante. ¡Muchas gracias por financiar este proyecto!

A mis tutores, Rodrigo y Ainoa, por su paciencia, dedicación y confianza. Gracias a su apoyo y orientación, logré estar preparado para llevar a cabo este estudio.

Al equipo del Programa de Ecología de Movimiento de Tortugas de Galápagos, particularmente a Gislayne y Freddy, por la ayuda y disposición que nos brindaron durante nuestra estadía en las islas; y al equipo del Laboratorio de Biotecnología de la UDA, particularmente a Diego, Daniela y Nicole por su apoyo y contribución durante la etapa experimental de este proyecto.

A aquellos profesores de la escuela de Biología, quienes fueron una parte esencial de mi formación académica. Quiero agradecer particularmente a David, por su orientación en la ejecución de los análisis estadísticos de esta investigación, y a Raffaella y Boris, por la retroalimentación brindada como parte del tribunal de esta tesis.

A Manuela y Roberta, por su apoyo incondicional, sus palabras de fortaleza, y todos los aportes que brindaron a lo largo de este proyecto.

A mi angelito en tierra, Akira, que, sin poder decir una sola palabra, ha sido mi compañera leal durante todo este trayecto.

Y un gracias enorme a todos mis compañeros, mis colegas biólogos y biólogas, por hacer el camino mucho más llevadero. Ha sido un placer crecer con ustedes y compartir lo que ha sido el comienzo de nuestro futuro.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE ANEXOS.....	6
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
CAPÍTULO I.....	10
INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Historia, importancia y amenazas a las tortugas gigantes de Galápagos.....	10
1.2. Microorganismos en la conservación.....	13
1.3. Microbioma asociado a tortugas.....	14
1.3.1. Microbioma asociado a las tortugas gigantes de Galápagos.....	15
1.4. Secuenciación de nueva generación en la identificación de microorganismos.....	16
CAPÍTULO II.....	18
METODOLOGÍA.....	18
2.1. Área de estudio.....	18
2.2. Colección de muestras.....	18
2.3. Extracción de ADN.....	19
2.4. Generación de productos de PCR 16S marcados con Barcodes.....	19
2.5. Secuenciación de ADN usando el MinION.....	19
2.6. Análisis de secuencias e identificación taxonómica de bacterias.....	20
2.7. Análisis de comunidades microbianas.....	20
CAPÍTULO III.....	21
RESULTADOS.....	21
3.1. Resultados de secuenciación y procesamiento de datos.....	21
3.2. Taxones y diferencias de abundancia.....	22
3.3. Asignación taxonómica de bacterias en el caparazón sano de <i>Chelonoidis</i> spp.....	25
3.4. Asignación taxonómica de bacterias en el caparazón lesionado de <i>Chelonoidis</i> spp.....	26
3.5. Comparación de comunidades microbianas.....	27
3.6. Análisis de diversidad en las comunidades microbianas.....	31

CAPÍTULO IV.....	33
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	37
RECOMENDACIONES.....	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de secuenciación por muestra.....	21
Tabla 2. Géneros de bacterias representativos de caparazones sanos en orden de significancia (pval < 0.05).....	28
Tabla 3. Géneros de bacterias representativos de caparazones lesionados en orden de significancia (pval < 0.05).....	29
Tabla 4. Índice de Shannon del microbioma bacteriano de los individuos secuenciados.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>C. porteri</i> en la isla Santa Cruz, Galápagos. Fuente: Reptiles of Ecuador: Life in the middle of the world, Arteaga & Guayasamín (2020b).....	12
Figura 2. Distribución de <i>C. donfaustoi</i> en la isla Santa Cruz, Galápagos. Fuente: Reptiles of Ecuador: Life in the middle of the world, Arteaga & Guayasamín (2020b).....	12
Figura 3. Distribución de <i>C. vandenburghi</i> en la isla Isabela, Galápagos. Fuente: Reptiles of Ecuador: Life in the middle of the world, Arteaga & Guayasamín (2020c).....	13
Figura 4. Diversidad taxonómica de bacterias a nivel de filo encontradas en el caparazón de tortuga de las tres especies estudiadas. Los datos muestran los 12 filos más abundantes de cada individuo, utilizando el porcentaje de lecturas para cada muestra.....	23
Figura 5. Diversidad taxonómica de bacterias a nivel de género encontradas en el caparazón de tortuga de las tres especies estudiadas. Los datos muestran los 10 géneros más abundantes de cada individuo, utilizando el porcentaje de lecturas para cada muestra.....	24
Figura 6. Árbol filogenético de los géneros de bacterias identificadas en el caparazón sano de <i>Chelonoidis</i> spp. Árbol elaborado por EPI2ME (Parámetros: Límite mínimo de abundancia: 0.1%; Número de taxones principales: 20).....	25
Figura 7. Árbol filogenético de los géneros de bacterias identificadas en el caparazón lesionado de <i>Chelonoidis</i> spp. Árbol elaborado por EPI2ME (Parámetros: Límite mínimo de abundancia: 0.1%; Número de taxones principales: 20).....	26
Figura 8. Plot de ordenación de las comunidades microbianas comparando especies e individuos con y sin lesión (basado en las disimilaridades de Bray-Curtis).....	27

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Lista de géneros más abundantes por individuo. Este archivo contiene un documento Excel con el top 20 de géneros más abundantes de cada individuo.....	49
Anexo 2. Árboles filogenéticos individuales. Esta carpeta contiene las figuras de los árboles filogenéticos de cada individuo examinado.....	49
Anexo 3. Ejemplar de <i>C. porteri</i> con presencia de la lesión blanquecina.....	49
Anexo 4. Miguel recolectando muestras de <i>Chelonoidis porteri</i> en Santa Cruz, Galápagos...	50
Anexo 5. Miguel cargando el MinION™ con las muestras a secuenciar en el laboratorio de Biotecnología, UDA.....	50

Identificación del microbioma bacteriano presente en los caparazones de tres especies de tortugas gigantes de Galápagos (*Chelonoidis* spp.) en las islas Santa Cruz e Isabela

RESUMEN

Las tortugas gigantes de Galápagos (*Chelonoidis* spp.) desempeñan un rol fundamental en la ecología y economía del archipiélago, y actualmente, las doce especies existentes se encuentran amenazadas. Los microorganismos asociados a las superficies externas de los animales representan una parte importante del microbioma animal, y tienen la capacidad de afectar su salud. En los caparazones de las tortugas gigantes de Galápagos frecuentemente se encuentran áreas blanquecinas causadas por el hongo *Aphanoascus galapagosensis*. Este estudio utilizó tecnología de secuenciación de última generación para examinar los microbiomas bacterianos asociados a tres especies de *Chelonoidis* spp. Se examinaron muestras de caparazón sano y lesionado para cada especie. Bacterias de los filos Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Actinobacteria, Proteobacteria y Bacteroidetes fueron comunes en todas las muestras, y *Deinococcus* fue el género más abundante de todos. Se encontraron diferencias significativas entre caparazones sanos y lesionados y entre la interacción lesión-especie, con una diversidad semejante entre todas las muestras examinadas.

Palabras clave: *tortugas gigantes, caparazón, microbioma bacteriano, secuenciación de nueva generación*



Rodrigo Caroca Cáceres, PhD
Director de Tesis



Daniilo Minga, MsC.
Director de Escuela



Miguel Perea
Autor

Identification of the bacterial microbiome present in the shells of three species of Galapagos giant tortoises (*Chelonoidis* spp.) on Santa Cruz and Isabela islands

ABSTRACT

Galapagos giant tortoises (*Chelonoidis* spp.) play a fundamental role in the ecology and economy of the archipelago, and currently, all twelve extant species are threatened. Microorganisms associated with the external surfaces of animals represent an important part of the animal microbiome and have the capacity to affect their health. On the shells of Galapagos giant tortoises, whitish areas caused by the fungus *Aphanoascus galapagosensis* are frequently found. This study used next-generation sequencing technology to examine bacterial microbiomes associated with three species of *Chelonoidis* spp. Healthy and lesioned shell samples were examined for each species. Bacteria of the phyla Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Actinobacteria, Proteobacteria, and Bacteroidetes were common in all samples, and *Deinococcus* was the most abundant genus overall. Significant differences were found between healthy and lesioned shells and between lesion-species interaction, with a similar diversity among all samples examined.

Keywords: *giant tortoises, carapace, bacterial microbiome, next-generation sequencing*



Rodrigo Caroca Cáceres, PhD
Thesis Director



Danilo Minga, MsC.
School Director

Translated by:



Miguel Perea
Author

