



# UNIVERSIDAD DEL AZUAY

UNIVERSIDAD DEL AZUAY

Facultad de ciencia y  
tecnología

Escuela de biología

**Título:**

Comparación de métodos de extracción de ADN para la identificación de la microbiota bacteriana presente en los caparazones de las tortugas de Galápagos (*Chelonoidis* spp.) en las islas Santa Cruz e Isabela.

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de Bióloga con  
mención en Ecología y Gestión**

**Autora:**

Manuela Burbano Moscoso

**Directores:**

Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres PhD.

Ainoa Nieto Claudín PhD.

**Cuenca – Ecuador**

**2023**

## Dedicatoria

Le dedico este trabajo a toda mi familia, sobre todo a mis padres, hermanay Santiago que me han apoyado todo este trayecto. Gracias por enseñarme que uno no se rinde ante los obstáculos, sino los vence, por estarahí a mi lado y darme una mano cuando más lo necesitaba, para levantarme y poder continuar. Me han ayudado a formarme y lograr ser la persona que soy ahora.

Les quiero con todo mi corazón.

La dedicación de este trabajo también va para las personas que fueron parte de mi vida durante este período de formación.

## Agradecimientos

Agradezco a todas que fueron parte esencial para que este trabajo de investigación se dé. Ya sea con ayuda científica o apoyo moral.

A la Universidad del Azuay y Fundación Charles Darwin por el apoyo y confianza que pusieron en un pequeño proyecto que terminó siendo una investigación super desafiante. Sobre todo ¡gracias por financiarlo!

A mis tutores Rodrigo y Ainoa por su confianza y paciencia. Su apoyo y guianza me ayudaron a terminar esta investigación.

Al Equipo del Programa de Ecología de Movimiento de Tortugas Galápagos, sobre todo a Gislayne y Freddy, por la ayuda que nos dieron tanto en el laboratorio como en el campo. Al equipo del Laboratorio de Biotecnología de la UDA, Daniela, Nicole y Diego por su ayuda en la etapa experimental.

A los profesores de la escuela de Biología, que gracias a ellos he podido obtener los conocimientos necesarios para llegar hasta aquí. En especial quiero agradecer a David por su ayuda y guianza en la parte del análisis estadístico de este trabajo, también quiero agradecer a Raffaella todos sus buenos comentarios y retroalimentación como parte de mi tribunal.

A Miguel y Roberta, que me apoyaron de forma incondicional durante todo este camino, hasta lograr terminar esta investigación.

Y por último agradezco a todos mis compañeros, por estar siempre ahí con sus chistes y apoyo.

# Índice

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>2. METODOLOGÍA</b> .....	<b>14</b>
2.1 ÁREA DE ESTUDIO .....	14
2.2.1 Toma de muestras .....	14
2.2.2 Pretratamientos.....	15
2.3 EXTRACCIÓN DE ADN, CUANTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE CALIDAD .....	20
2.4 GENERACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR 16S MARCADOS CON BARCODES .....	21
2.5 PURIFICACIÓN DE PRODUCTO PCR .....	21
2.6 SECUENCIACIÓN DEL ADN USANDO EL MINION .....	22
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	22
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>31</b>
5.1 RECOMENDACIONES.....	31
<b>ANEXOS</b> .....	<b>32</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>35</b>
<b>TABLA 1:</b> PRETRATAMIENTOS APLICADOS AL KIT DE QIAGEN (A) .....	17
<b>TABLA 2:</b> PRETRATAMIENTOS APLICADOS AL KIT DE INVITROGEN (B) .....	18
<b>TABLA 3:</b> PRETRATAMIENTOS APLICADOS AL KIT DE MACHEREY-NAGEL (C) .....	18
<b>TABLA 4:</b> PRETRATAMIENTOS APLICADOS AL PROTOCOLO DE CTAB (D) .....	19
<b>TABLA 5:</b> ETAPAS, PRUEBAS Y ANÁLISIS QUE SE REALIZARON SOBRE EL ADN.....	21
<b>TABLA 6:</b> EVALUACIÓN DE ADN GENÓMICO OBTENIDO A PARTIR DE LOS DIFERENTES PRETRATAMIENTOS + KITS DE EXTRACCIÓN.....	24
<b>TABLA 7:</b> EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR PURIFICADOS .....	25
<b>TABLA 8:</b> RIQUEZA OBSERVADA DE CADA ESPECIE CON O SIN LESIÓN .....	26
<b>FIGURA 1:</b> GEL DE ELECTROFORESIS CARGADO CON ADN METAGENÓMICO PROVENIENTE DEL CAPARAZÓN DE TORTUGAS. M) LADDER 1 Kb (INVITROGEN); 1) EXTRACCIÓN CON EL TRATAMIENTO 2A; 2) EXTRACCIÓN CON TRATAMIENTO 6A; 3) EXTRACCIÓN DIRECTA .....	23
<b>FIGURA 2:</b> GEL DE ELECTROFORESIS CARGADO CON PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN 16S. M) LADDER 1 Kb (INVITROGEN); 1) MUESTRA DE <i>C. PORTERI</i> CON HONGO; 2) MUESTRA DE <i>C. DONFAUSTOI</i> SIN HONGO; 3) MUESTRA DE <i>C. DONFAUSTOI</i> SIN HONGO; 4) MUESTRA DE <i>C. VANDERBURGHI</i> CON HONGO .....	25
<b>FIGURA 3:</b> CURVAS DE RAREFACCIÓN DE MUESTRAS SIN HONGO, DE LAS 3 ESPECIES DE TORTUGAS GIGANTES DE GALÁPAGOS.....	27
<b>FIGURA 4:</b> CURVAS DE RAREFACCIÓN DE MUESTRAS CON HONGO, DE LAS 3 ESPECIES DE TORTUGAS GIGANTES DE GALÁPAGOS.....	27

<b>ANEXO 1:</b> 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). .....	32
<b>ANEXO 2:</b> 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). .....	32
<b>ANEXO 3:</b> 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 (2020A). .....	33
<b>ANEXO 4:</b> CURVA DE RAREFACCIÓN DE LA MUESTRA <i>C. PORTERI</i> , CON Y SIN LESIÓN .....	33
<b>ANEXO 5:</b> CURVA DE RAREFACCIÓN DE LA MUESTRA <i>C. DONFAUSTOI</i> , CON Y SIN LESIÓN .....	34
<b>ANEXO 6:</b> CURVA DE RAREFACCIÓN DE LA MUESTRA <i>C. VANDERBURGHI</i> , CON Y SIN LESIÓN .....	34

## Resumen

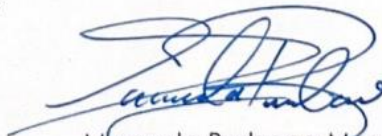
Los caparazones de las tortugas gigantes están siempre expuestos, el cual puede afectarlos a través de la exposición a bacterias, hongos y otros organismos presentes en el entorno. El microbioma asociado a los caparazones de las tortugas gigantes de Galápagos (*Chelonoidis* spp) no ha sido caracterizado hasta la fecha. Para ello, es necesario establecer ciertos parámetros que permitan la extracción de ADN de los microorganismos que puedan encontrarse en dichos caparazones. El objetivo de este estudio consistió en encontrar la metodología óptima para la extracción de ADN de bacterias utilizando muestras de raspados de caparazón de tres especies de tortugas gigantes de Galápagos. Encontramos que el pretratamiento utilizando esferas de cristal e incubación y el kit DNEasy PowerSoil Pro Kit de Qiagen fueron los más óptimos para este tipo de muestra, dando como resultado una gran riqueza de géneros bacterianos en cada una de las muestras secuenciadas.

## Abstract

The carapace of Galapagos tortoises is constantly exposed to the environment, which could lead to the colonization of bacteria, fungi, and other organisms. The microbiome associated to the tortoise carapaces hasn't been studied and characterized yet. In order to do so, it is necessary to determine best protocols for DNA extraction of carapace samples. The main goal of this study was to identify the optimal methodology for DNA extraction of bacteria using carapace scrapes from three species of Galápagos giant tortoises. We concluded that a pretreatment using glass beads followed by an incubation process, along with the Qiagen DNEasy PowerSoil Pro Kit, yielded the best results for this type of sample. Final results obtained by sequencing have proven a high richness of bacterial genera on carapace samples using this technique.

  
Rodrigo García Cáceres. PhD  
Director de Tesis

  
Danilo Minga, MsC.  
Director de Escuela

  
Manuela Burbano Moscoso  
Autora

## 1. Introducción

Las tortugas gigantes, que durante el Pleistoceno se encontraban distribuidas en todos los continentes, ahora solo se encuentran en las Islas Galápagos y en el archipiélago de Aldabra (Gunther, 1874), enfatizando la necesidad de proteger y conservar los individuos y especies remanentes. Históricamente, la población de tortugas gigantes en Galápagos se ha visto severamente afectada a causa de la caza en los siglos XVIII y XIX, y como consecuencia, hubo una disminución de hasta el 90% de la población originaria, causando la extinción de dos de las catorce especies de tortugas que solían habitar en las Islas Galápagos (Hennessy, 2019; IUCN, 2023). En los siglos XIX y XX, las especies invasoras empezaron a convertirse en plagas, depredadores y hasta competidores de las tortugas, ocasionando una mayor disminución en la población de estas especies (Froyd et al., 2014; Padilla et al., 2018, Vásconez Robalino, 2018).

No fue hasta 1959, cuando se estableció la Dirección del Parque Nacional Galápagos (DPNG) y la Fundación Charles Darwin (FCD), que verdaderamente se empezaron a realizar esfuerzos de conservación de las tortugas gigantes, convirtiéndose en el logo de estas instituciones y en símbolos de ciencia y conservación en todo el mundo (Hennessy, 2019). El programa de crianza en cautiverio de las tortugas de Galápagos es uno de los proyectos de conservación más exitosos del mundo, criando a más de ocho mil tortugas juveniles y reintroduciéndolas a sus poblaciones originarias (Hunter et al., 2013).

Debido al comportamiento migratorio que tienen algunas especies de tortugas gigantes, específicamente aquellas que se encuentran en la isla Santa Cruz, estas se ven expuestas constantemente a la actividad antrópica (Froyd et al., 2014). La intervención humana sigue expandiéndose rápidamente, produciendo consecuencias directas sobre las tortugas, como la pérdida de hábitat, el comercio ilegal, y la exposición a enfermedades (Márquez et al., 2004; Padilla et al., 2018; Nieto-Claudin et al., 2021). Uno de los casos más recientes de estos efectos lo podemos observar en la presencia de genes resistentes a los antimicrobianos asociados a actividades humanas

en las tortugas gigantes localizadas en la isla Santa Cruz (Nieto-Claudin et al., 2021).

Actualmente, las especies de tortugas de Galápagos remanentes están todas bajo diferentes niveles de amenaza, que van desde vulnerables hasta críticamente amenazadas (IUCN, 2021). Además, se encuentran en el apéndice II del CITES, donde "se incluyen especies que no se encuentran necesariamente en peligro de extinción, pero cuyo comercio debe controlarse a fin de evitar una utilización incompatible con su supervivencia" (<https://cites.org/esp/disc/how.php>).

De manera similar, las tortugas de la región son de crítica importancia para el mantenimiento de la salud de los socio-ecosistemas del archipiélago, debido a que son dispersoras de semillas y modificadoras del paisaje (Gibbs et al., 2010), además de ser uno de los principales atractivos turísticos del país (Watkins & Oxford, 2009).

Por esta razón, el Programa de Ecología del Movimiento de las Tortugas de Galápagos (PEMTG; [www.gianttortoise.org](http://www.gianttortoise.org)) de la FCD realiza desde el 2009 numerosas investigaciones para determinar la ecología migratoria y reproductiva de las tortugas terrestres y su estado de salud en diferentes islas. Con ello se busca establecer de qué manera la interacción entre las tortugas, los seres humanos y los animales domésticos puede afectar el bienestar y la salud de las tortugas y sus ecosistemas (Blake et al., 2012; Bastille-Rousseau et al., 2017; Yackulic et al., 2017).

A pesar de todas las investigaciones que se han realizado en el archipiélago, han sido muy pocas las que se han dedicado a la parte microbiológica de los diferentes ecosistemas, cómo el microbioma que se puede encontrar en el suelo agrícola y ganadero (Martínez Vargas, 2022), que son áreas en que se pueden encontrar tortugas de Galápagos. Los microorganismos provenientes del suelo ganadero podrían combinarse con el que está presente en el caparazón de las tortugas, causando alteraciones cuyas consecuencias se desconocen hasta la fecha, de acuerdo a la literatura publicada.



Las amenazas que enfrentan las tortugas gigantes de Galápagos están todas vinculadas a los numerosos impactos antropogénicos, siendo uno de ellos la potencial patogenicidad de agentes infecciosos emergentes, de los cuales se posee escasa información (Padilla et al., 2018; Nieto Claudin et al., 2021). Por estas razones, es crucial profundizar los conocimientos y establecer una línea base sobre el microbioma bacteriano presente en el caparazón de estas tortugas, y así entender cómo éste podría afectar en su estado de salud, para que se puedan reforzar los planes de conservación y manejo existentes.

En 2013, se encontró y describió un nuevo género y especie de hongo (*Aphanoascus galapagosensis*), que fue aislado de una lesión con coloración blanquecina que se presentó en el caparazón de una tortuga gigante (*Chelonoidis nigra microphyes*) en una colección zoológica en el sur de Texas (Sutton et al., 2013). Estas lesiones son crecimientos de diferentes formas que se encuentran en el caparazón o hasta en el plastrón, pueden llegar a la queratina de el caparazón (Guillen y Zeas, 2022). En poblaciones naturales se han podido constatar estas lesiones en algunas especies de tortugas gigantes, incluyendo *Chelonoidis porteri* y *Chelonoidis donfaustoi* en Santa Cruz y *Chelonoidis vanderburghi* en Isabela. Los recientes datos aportados por Guillén y Zeas (2022) confirman la presencia de *A. galapagosensis* en los caparazones de las tortugas de la especie *C. porteri*, sin embargo, se desconoce hasta la fecha si las lesiones observadas en *C. donfaustoi* y *C. vanderburghi* son debidas a esta misma especie fúngica. La preocupación reside en que se desconoce completamente el microbiota bacteriano que puede estar asociado a estas lesiones, así como los posibles efectos que podrían generar en la salud de los individuos en los que se presentan. Se conoce que las especies microbianas rara vez viven en poblaciones monoespecíficas y suelen interactuar entre sí y con su hábitat, incluyendo a sus organismos anfitriones (Wooley et al., 2010), lo que sugiere una etiología multifactorial de estas lesiones presentes en el caparazón de las tortugas gigantes de Galápagos.

En una investigación llevada a cabo por el PEMTG en colaboración con la Universidad del Azuay se ha evidenciado la presencia de varias especies de hongos y bacterias en estas lesiones. Guillén y Zeas (2022) sugieren la

coexistencia de cierta diversidad de bacterias (*Arsenicococcus spp.*, *Bacillus*, *Solibacillus*, *Burkholderia spp.*, entre otros) en el caparazón de las tortugas. Considerando la naturaleza metodológica del trabajo, es posible que gran parte de la diversidad bacteriana no pudiera ser determinada ya que los ensayos se basaron fundamentalmente en el cultivo microbiológico. Más del 80% de las bacterias descritas no son cultivables por métodos tradicionales (Nieto Claudin et al., 2019), y el éxito de los medios de cultivo depende de la selección y concentración adecuada de nutrientes, lo que a su vez requiere de conocimientos básicos sobre los microorganismos y sustratos de las muestras a analizar (Gómez & Batista, 2006). Gracias a esta falta de conocimiento sobre los microorganismos presentes en este tipo de muestras, se considera oportuno no solo estudiar las bacterias presentes en las lesiones (áreas blanquecinas que se encuentran en el caparazón, denominadas en este estudio como "caparazón con lesión"), sino también estudiar e identificar las bacterias que se encuentran en los "caparazones sanos" (aquellos en los que no se observan dichas áreas blancas y que conservan la integridad de la queratina y su coloración), y establecer comparaciones entre ambos. También resulta interesante estudiar las diferencias del microbioma entre diferentes especies, para así obtener un entendimiento más completo sobre el microbioma bacteriano que presentan las tortugas gigantes de Galápagos en su caparazón.

La limitación que representa el cultivo de microorganismos para evaluar su diversidad se puede solventar a través de la secuenciación de ADN de tercera generación, utilizando la metagenómica. Para lograr tener una buena secuenciación de ADN, éste se tiene que extraer de la muestra y debe ser representativo de la información genética presente en ésta. La extracción de ADN es uno de los grandes descubrimientos de la ciencia, ya que presenta el desafío de la ruptura de la pared celular para así lograr alcanzar el ADN (Guevara, 2004). Para tener éxito en la ruptura celular deben emplearse métodos mecánicos y/o enzimáticos (Mosquera, 2005). De esta manera se permite la identificación y caracterización de microorganismos, seres vivos y enfermedades (De Alda et al., 2019). Esta técnica permite tener almacenada a largo plazo la información de cada organismo vivo (Zuñiga Guevara, 2014). La metagenómica es el análisis del conjunto de genomas de una comunidad

microbiana, también denominada metagenoma. Este tipo de análisis permite el estudio de una amplia variedad de genes y sus productos, por lo tanto, es una herramienta poderosa para entender la diversidad de los distintos nichos ecológicos a través de muestras ambientales (Vélez, 2009; Cortés-López et al., 2020). La metagenómica presenta varias ventajas para el diagnóstico de enfermedades e identificación de microorganismos, ya que supera en cobertura y eficiencia a otros métodos y disminuye la identificación errónea de especies (Vázquez-Euán et al., 2017). Esta metodología no depende de medios de cultivo, los cuales solo pueden cultivar un pequeño porcentaje de la población microbiana (Wooley et al., 2010), y permite identificar microorganismos a través de los genomas aislados del entorno natural (Nielsen et al., 2014). Asimismo, la naturaleza sensible y rica en datos de la secuenciación metagenómica, junto con las eficaces herramientas bioinformáticas actuales, han posibilitado identificar comunidades de bacterias como *Clostridium difficile*, *Enterobacter cloacae*, etc. (Khoruts & Sadowsky, 2016; Mafune et al., 2019; Leggett et al., 2020).

Existe solo una investigación más sobre protocolos para la extracción de ADN en muestras de raspados de caparazón de tortugas gigantes de Galápagos, la cual fue realizada por Guillen y Zeas (2022) con énfasis en el aislamiento de especies fúngicas. Es importante implementar una metodología que permita aislar el material genético de bacterias en la cantidad y calidad suficiente para ser utilizado en experimentos de metagenómica. Para ello existen numerosos kits comerciales que tienen protocolos preparados para la extracción de ADN bacteriano en diferentes tipos de muestras. Entre ellos está el Dneasy PowerSoil Pro Kit de Qiagen, el kit NucleoSpin® Microbial DNA de Macherey-Nagel, el kit de Invitrogen (PureLink® Genomic DNA Mini kit) y también un protocolo casero que utiliza CTAB (Van Burik, J. A. et al., 1998), ya que no solo los kits comerciales se han utilizado con la finalidad de extraer el ADN bacteriano. Estos protocolos pueden ser complementados con pretratamientos, con el objetivo de mejorar la etapa de lisis y con ello evitar sesgos al momento de estimar la diversidad bacteriana (Corcoll et al., 2017). Dentro de los posibles pretratamientos se incluyen cambios de temperaturas, aplicación de diferentes enzimas, uso de distintos métodos mecánicos para la ruptura celular, entre otros (Mosquera, 2005).

Hay algunas técnicas que permiten evaluar los pretratamientos con el objetivo de seleccionar aquellos que resulten más efectivos. Una de estas técnicas es la electroforesis en geles de agarosa, que sirve para separar moléculas de ADN según su forma y tamaño y así tener una idea de su concentración y su integridad (Cornejo Romero et al., 2014). Por otro lado, la espectrofotometría sirve para determinar con precisión la concentración molecular del ADN y otras biomoléculas. Esto es gracias a la capacidad del ADN de absorber la luz ultravioleta a 260nm, lo que ayuda a saber su concentración (Cornejo Romero et al., 2014; Parra Rojas, 2015). También permite estimar la pureza de una muestra, obteniendo la razón del 260/280, siendo el 260 la longitud de onda en la cual absorben las bases nitrogenadas del ADN y 280 la longitud de onda en la que absorben los aminoácidos aromáticos de las proteínas (Parra Rojas, 2015). Por último, la fluorimetría ayuda con la cuantificación del ADN. Uno de los equipos que se puede utilizar es el Qubit de Invitrogen, el cual es una buena opción para cuantificar muestras raras y difíciles de procesar (*Nucleic Acid Quantification Support— Getting Started | Thermo Fisher Scientific - NL, s. f.*)

El MinION™ de Oxford Nanopore Technologies (ONT) es un secuenciador portátil de tercera generación, diseñado para generar lecturas largas y capaz de secuenciar grandes cantidades de ADN. Este equipo, junto con los kits que permiten el procesamiento de las muestras de ADN previo a la secuenciación, ha probado ser eficiente en la determinación de microbiomas bacterianos, sin tener un proceso de cultivo de por medio (Benítez-Páez et al., 2016; Mafune et al., 2019; Tosco Herrera, 2019; Kisová et al., 2020). El principio del MinION se basa en el reconocimiento de una perturbación de la corriente eléctrica en una proteína nanoporosa. En líneas generales, cuando una hebra de ADN está dentro del nanoporo, los nucleótidos inducen un cambio en la corriente eléctrica basal, la cual es reconocida por los sensores del dispositivo y luego se traduce en una secuencia de nucleótidos a través de un algoritmo (Runtuwene et al., 2019).

Existen varias opciones disponibles de kits patentados para el MinION, que van desde un kit de preparación rápida sin PCR, kits basados en PCR de alta precisión, e incluso kits de propósitos especiales como 16S barcoding, low

input y ultralow input (Runtuwene et al., 2019). Precisamente, el 16S barcoding kit puede ser utilizado para la identificación de la diversidad bacteriana en una o más muestras. En vista de que la calidad de la secuenciación y la representatividad del microbioma dependen en gran medida del ADN utilizado, es de suma importancia contar con un protocolo adecuado para la extracción y posterior evaluación del ADN.

Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, se propone en este trabajo comparar distintos kits de extracción de ADN, complementados con diferentes métodos de pretratamiento, aplicándolos a muestras de raspado de caparazón de tortugas gigantes de Galápagos. Esto con la finalidad de establecer un protocolo que permita obtener una buena cantidad y calidad de ADN, que sea representativo de la diversidad bacteriana presente en caparazones con y sin lesión. Cumplir con estos requisitos es esencial para evitar sesgos en el análisis del microbioma del caparazón. Con el ADN extraído se analizó la diversidad en el marco de otro trabajo de titulación realizado por Perea (2023), en el cual se empleó un enfoque metagenómico a través del secuenciador portátil MinION (Oxford Nanopore Technologies, ONT).

## 2. Metodología

### 2.1 Área de estudio

La fase de toma de muestras de este trabajo se llevó a cabo en las Islas Galápagos. En el volcán Alcedo (S00.434428, W091.088167), localizado en la Isla Isabela, se recolectaron muestras de las tortugas gigantes de la especie *C. vandenburghi* (anexo 1). Por otro lado, en el “Rancho El Manzanillo” ubicado en la Isla Santa Cruz (S00.698194, W090.402047), se muestrearon las tortugas gigantes de la especie *C. porteri* (anexo 2), mientras que de la especie *C. donfaustoi* se muestrearon los individuos que se encontraron en Cerro Mesa (S00.646326, W090.276518) y en Cerro Fatal (S00.635512, W090.241463) (anexo 3).

### 2.2 Metodología para la recolección de datos

#### 2.2.1 Toma de muestras

Para el presente estudio, se recolectaron muestras de raspados de caparazón sano y con lesión de las dos especies de tortugas de la isla Santa Cruz y de la especie de la isla Isabela. Debido a que se requerían aproximadamente 300 mg de muestra para los protocolos de extracción de ADN, se obtuvieron raspados de al menos 500 mg.

En la isla Santa Cruz se tomaron muestras de 10 individuos de cada especie (cinco con lesión y cinco sin lesión), mientras que para el análisis de las tortugas de Alcedo se analizaron cinco muestras de caparazón sano y un pool de muestras con lesión recolectadas previamente por investigadores del PEMTG.

### 2.2.2 Pretratamientos

Se llevaron a cabo seis pretratamientos con el objetivo de mejorar la calidad y cantidad del ADN obtenido. Se realizaron modificaciones en la etapa de lisis celular para evaluar distintos métodos físicos y enzimáticos de ruptura celular. Para efectos de este estudio, se consideró "pretratamiento" a cualquier paso adicional que se llevó a cabo antes de aplicar los kits de extracción (o en los primeros pasos) y que no estaban incluidos en sus protocolos.

**Pretratamiento 0:** Como control, se hicieron las extracciones de las muestras con los tres kits de extracción, sin llevar a cabo ningún pretratamiento.

**Pretratamiento 1:** se realizó una resuspensión del raspado de caparazón con agua peptonada y agua desionizada, para pasar al Vortex (DAIGGER, VortexGenie 2) y homogenizador (SCIENTZ - 11 Germfree Homogenizer). Al finalizarse pasó a la centrifuga (LEGEND MICRO 17) y por último al kit correspondiente.

**Pretratamiento 2:** Se colocó la muestra ya pulverizada por el molino (MM 400, Retsch) en agua peptonada o desionizada, se filtró con papel filtro y se centrifugó para luego continuar con la extracción.

**Pretratamiento 3:** Se molió la muestra de caparazón en un mortero con 8 ml de 2x CTAB buffer (7.882 gr. Tris HCl, 4.1 gr. NaCl, 0.372 gr. EDTA, 1 gr. CTAB; aforado a pH 8), se pasó a la incubación con las enzimas (proteínasa K, lisozima y acromopeptidasa) y se continuó con el protocolo de extracción según Van Burik, J. A. et al. (1998). Con el propósito de aislar ADN libre de ARN, también se agregó un paso con RNasa A a una concentración de 10 µg/ml se incubó por 10 minutos a 37°C.

**Pretratamiento 4:** Primero se pulverizó la muestra en el molino mezclador (MM400, Retsch) y luego se colocó en el sonicador con el fin de lograr la ruptura mecánica. Luego se incubó con las enzimas (proteínasa K, lisozima y acromopeptidasa) y se prosiguió con la extracción según lo descrito en las instrucciones de los kits comerciales.

**Pretratamiento 5:** Se molieron las muestras con perlas metálicas y de cristal de diferentes tamaños, con el objetivo de ampliar la superficie de contacto y

romper la pared celular de la muestra, al concluir con este paso se prosiguió con la extracción.

**Pretratamiento 6:** La muestra se pulverizó previo a la extracción con esferas metálicas en el molino mezclador, tras lo cual se prosiguió con la extracción según el protocolo, añadiendo un paso de incubación con las enzimas lisozima, acromo peptidasa y proteinasa k (las enzimas lisozima y acromo peptidasa se incubaron conjuntamente por 1 hora a 37°C, y luego se agregó la proteinasa k la cual fue incubada a 60°C por 2 horas).

Después de los pretratamientos, las muestras se sometieron a diferentes kits de extracción, con el objetivo de encontrar el método más eficiente para la obtención de ADN. Los pretratamientos que se emplearon con cada kit se pueden ver detalladamente en las tablas 1-4



**Tabla 1:** Pretratamientos aplicados al Kit de Qiagen (A)

Código para el Pretratamiento	Agua desionizada	Agua peptonada	Esferas metálicas	Molino	Papel filtro	Centrífuga	Vortex	Homogenizador	Lisozima	Acromo peptidasa	Proteinasa k	Incubación
1A.1	Sí; 9ml					Sí; 100rpmx30''(x2); 200rpmx5'	Sí; 10'					
1A.2	Sí; 9ml					Sí; 100rpmx30''(x2); 200rpmx5'		Sí; 10'				
1A.3		Sí; 9ml				Sí; 100rpmx30''(x2); 200rpmx5'	Sí; 10'					
1A.4		Sí; 9ml				Sí; 100rpmx30''(x2); 200rpmx5'		Sí; 10'				
2A	Sí 20ml		Sí	Sí; 1'	Sí	Sí; 4,4rpmx15'		Sí; 20'				
5A			Sí	Sí; 1'								
6A			Sí	Sí; 1'					Sí; 37°x1h	Sí; 37°x1h (junto lisozima)	Sí; 60°x2h	Sí

**Tabla 2:** Pretratamientos aplicados al Kit de Invitrogen (B)

Código para el Pretratamiento	Agua desionizada	Esferas de vidrio	Esferas metálicas	Molino	Mortero	Homogenizador
1B.1	Sí; 20ml				Sí; 5'	Sí; 20'
1B.2	Sí; 20ml		Sí	Sí; 1'		Sí; 20'
5B		Sí		Sí; 1' 30"		

**Tabla 3:** Pretratamientos aplicados al Kit de Macherey-Nagel (C)

Código para el Pretratamiento	Agua desionizada	Agua peptonada	Esferas metálicas	Molino	Sonicador	Papel filtro	Centrífuga	Homogenizador	Lisozima	Acromo peptidasa	Proteinasa k	Incubación
1C	Sí; 20ml						Sí; 4000rpm x10'(x2)	Sí; 15'				
2C.1	Sí; 20ml		Sí	Sí; 1'		Sí	Sí; 4,4 rpmx15'					
2C.2		Sí; 20ml	Sí	Sí; 1'		Sí	Sí; 4,4 rpmx15'					
4C			Sí	Sí; 1'	Sí; 30' a 45° a 42kHz				Sí; 37°x1h	Sí; 37°x1h (junto lisozima)	Sí; 55°x2.5h	Sí

**Tabla 4:** Pretratamientos aplicados al protocolo de CTAB (D)

<b>Código para el Pretratamiento</b>	<b>Esferas metálicas</b>	<b>Molino</b>	<b>Mortero</b>	<b>Sonicador</b>	<b>Lisozima</b>	<b>Acromo peptidasa</b>	<b>Proteinasa k</b>	<b>CTAB</b>	<b>Incubación</b>	<b>RNAsa A</b>
<b>3D</b>			Sí		Sí; 37°x30'	Sí; 40°x30'	Sí; 60°x2h	Sí	Sí	Sí; Concentración a 10 µg/ml
<b>4D</b>	Sí	Sí; 1'		Sí; 30' a 45° a 42kHz	Sí; 37°x1h	Sí; 37°x1h (junto lisozima)	Sí; 55°x2.5h		Sí	

## 2.3 Extracción de ADN, cuantificación y evaluación de calidad

Para la extracción de ADN se evaluaron cuatro protocolos: 1) NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey-Nagel), 2) Dneasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen), 3) PureLink® Genomic DNA Mini kit (Invitrogen), y 4) CTAB (casero) (Van Burik, J. A. et al., 1998). En los tres primeros se siguieron los protocolos recomendados por los fabricantes mientras que para el cuarto se siguieron las recomendaciones de Van Burik, J. A. et al. (1998).

Posterior a la extracción, se prosiguió con los análisis comparativos del rendimiento y calidad del ADN obtenido para cada método de extracción, por medio de electroforesis en geles de 1,2 % agarosa. La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260nm ( $A_{260}$ ) con un espectrofotómetro (Epoch, Biotek) y calculando la razón  $A_{260}/A_{280}$ , con el fin de analizar potenciales contaminaciones con proteínas. Para tener una cuantificación más precisa del ADN mediante fluorometría, se empleó el Qubit y el kit Qubit™ 3 Fluorometer (Invitrogen).

Se llevaron a cabo tres etapas para el análisis del ADN. Primero, la extracción para obtener el ADN genómico; segundo, los productos de PCR en los que se usó como molde el ADN genómico, y, por último, la purificación de dichos productos. En cada una de estas etapas, se realizaron entre dos y tres pruebas (Tabla 5), con el fin de comprobar la calidad y cantidad de ADN obtenido. Los productos que cumplieran con los requisitos de cantidad/calidad de cada etapa (ADN genómico >15000 pb y concentración de 1,8 – 2 y producto de PCR purificado >1500pb y concentración de 10 ng/ $\mu$ L) fueron seleccionados para la siguiente etapa correspondiente.

**Tabla 5:** Etapas, pruebas y análisis que se realizaron sobre el ADN

<b>Etapa</b>	<b>#Prueba</b>	<b>Análisis</b>
ADN genómico	1	Gel
	2	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> (espectrofotometría)
PCR	1	Gel
	2	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> (espectrofotometría)
	3	Cuantificación (Epoch)
Purificación	1	Gel
	2	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> (espectrofotometría)
	3	Cuantificación (Qubit)

## 2.4 Generación de productos de PCR 16S marcados con Barcodes

El ADN genómico fue utilizado como molde para llevar a cabo una amplificación específica de regiones de ADN mediante PCR. Esta región corresponde al gen ribosomal 16S de bacterias, ya que ha demostrado ser de gran utilidad para la clasificación filogenética de estos microorganismos (Filippis, Parente and Ercolini, 2017). Se utilizaron *primers* marcados con *Barcodes* provenientes del 16S Barcoding kit (SQK-RAB204, ONT), siguiendo las instrucciones del fabricante. El éxito de las reacciones de PCR se evaluó mediante electroforesis en geles de 1,2% de agarosa, teniendo en cuenta que, en el gel, el producto tiene que mostrar alrededor de 1500 pb como indica el protocolo del 16S Barcoding kit (SQK-RAB204, ONT). El resultado de la relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> y su concentración se registró con un espectrofotómetro (Enduro GDS Touch, Labnet International Inc.).

## 2.5 Purificación de producto PCR

Los productos de PCR fueron purificados mediante las DNA Purification SPRI Magnetic Beads (Applied Biological Materials Inc.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza fue analizada por espectrofotometría (Epoch, Biotek) (Parra Rojas, 2015).

Finalmente, los productos de PCR purificados fueron cuantificados por fluorometría usando el Qubit (Invitrogen). Se realizó el protocolo según su fabricante lo recomienda, ajustando las concentraciones y mezclándolos, para la generación de grupos de muestras de acuerdo con lo sugerido por el 16S Barcoding kit (SQK-RAB204, ONT).

## 2.6 Secuenciación del ADN usando el MinION

Para la secuenciación de *Barcodes* de ADN bacteriano se realizaron pruebas preliminares. Este proceso se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Azuay empleando el equipo portátil MinION (ONT). Se siguieron todos los pasos preparatorios descritos en el protocolo del kit del 16S Barcoding kit (ONT), aplicando modificaciones de ser necesario.

Con el fin de evaluar los distintos protocolos de extracción de ADN y reacciones de PCR dirigidas a la región 16S, se realizaron secuenciaciones utilizando las Flongle Flow Cells (FLO-FLG001, ONT). Estas tienen una menor capacidad de secuenciación en comparación a una Flow Cell "normal", no obstante, su menor costo permitió realizar varias pruebas para encontrar el protocolo que lograra una mejor representación de la diversidad bacteriana en los caparazones de estudio.

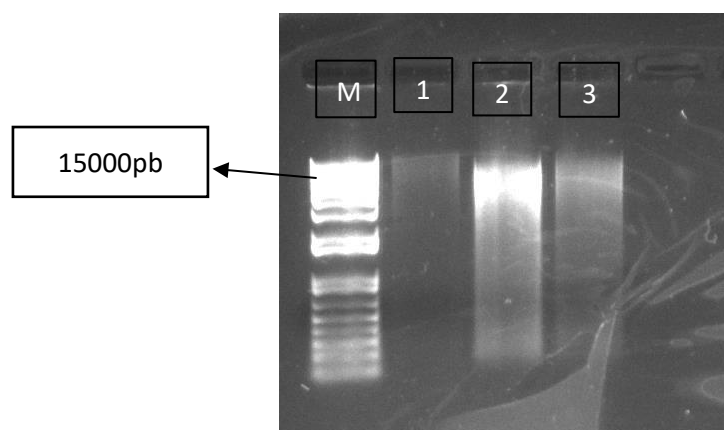
La secuenciación se monitoreó a través del Software MinKNOW (ONT), poniendo particular atención a la calidad de las secuencias obtenidas y la cantidad de poros activos a lo largo del proceso. El análisis de la diversidad de bacterias se realizó con el Software EPI2ME de ONT, el cual se adapta muy bien a los tipos de secuencia entregados por el equipo MinION.

## 2.7 Análisis estadístico

Para evaluar la riqueza de los resultados obtenidos se utilizó el paquete iNEXT del programa estadístico R (R Core Team, 2022). Este paquete sirve para calcular y trazar curvas de muestreo de extrapolación y rarefacción continuas (Hsieh et al., 2016). Al tener muestras de diferentes tamaños, se usó la curva de rarefacción para así determinar la influencia de los resultados de riqueza con todos los tamaños de las muestras (Mejía Vargas, 2017).

### 3. Resultados

Al analizar los seis pretratamientos de las muestras con y sin hongo de las tres diferentes especies de tortuga gigante con las que se trabajaron, se pudo observar que solo los tratamientos 1C y 6A (Tablas 3 y 1, respectivamente) mostraron una intensidad en la banda del gel lo suficientemente fuerte para cumplir los requisitos de calidad planteados. Para la prueba de electroforesis, se debía observar una banda intensa y definida de un tamaño aproximado de  $>15000$  pb (Figura 1). Asimismo, en la concentración solo cumplió con los requisitos el pretratamiento 6A (Tabla 6), esto también se debe a que la relación  $A_{260}/A_{280}$  debía que oscilar entre 1,8-2, siendo un resultado menor o mayor a este un indicador de contaminación por proteínas o ARN. El pretratamiento 6A consiste en pulverizar la muestra con esferas metálicas en el molino mezclador, para continuar con el protocolo del kit de Qiagen (Dneasy PowerSoil Pro Kit), pero se añadió un paso de incubación con las enzimas lisozima, acromo peptidasa y proteinasa K (k (las enzimas lisozima y acromopeptidasa se incubaron conjuntamente por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , y luego se agregó la proteinasa k la cual fue incubada a  $60^{\circ}\text{C}$  por 2 horas).



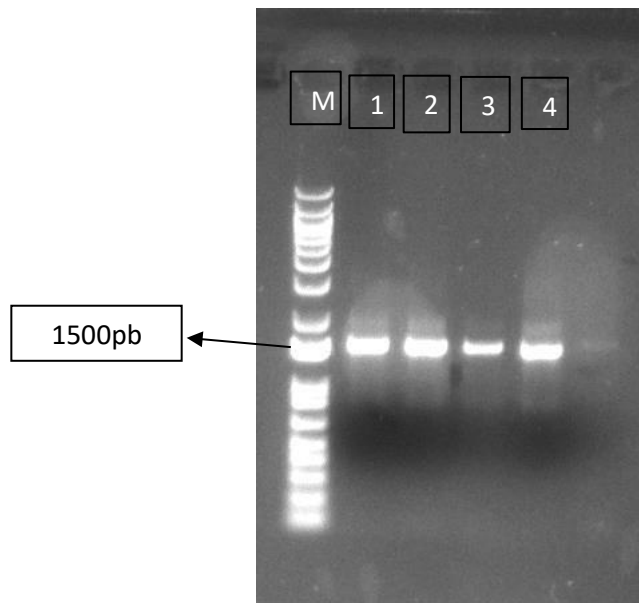
**Figura 1:** Gel de electroforesis cargado con ADN metagenómico proveniente del caparazón de tortugas. M) Ladder 1 Kb (Invitrogen); 1) Extracción con el tratamiento 2A; 2) Extracción con tratamiento 6A; 3) Extracción directa 0A.

**Tabla 6:** Evaluación de ADN genómico obtenido a partir de los diferentes pretratamientos + kits de extracción

Pretratamiento	Gel	Cuantificación ng/ $\mu$ l	Promedio A260/A280	Requisitos
1 A.1	X	4,13	1,559	X
1 A.2	X	5,67	1,807	X
1 A.3	X	2,98	1,515	X
1 A.4	X	6,23	1,9945	X
1 B.1	X	15,33	1,2535	X
1 B.2	X	17,42	1,6305	X
<b>1 C</b>	✓	<b>362,73</b>	24,9	X
2 A	X	6,48	1,7565	X
2 C.1	X	0,72	1,1335	X
2 C.2	X	2,46	-2	X
3 D	X	1,98	1,146	X
4 C	X	2,28	1,257	X
4 D	X	3,24	1,4555	X
5 A	X	6,68	1,8375	X
5 B	X	11,85	1,237	X
<b>6 A</b>	✓	<b>7,70</b>	<b>1,906</b>	✓

Para llevar a cabo las reacciones de PCR, solo se utilizaron muestras de ADN genómico (de las muestras con y sin hongo) con el tratamiento 6A, pues fue el único que mostraba tener suficiente cantidad y calidad para pasar a la siguiente etapa. El requisito de los productos de PCR en el gel es que debían mostrar una banda de aproximadamente 1500 pb (Figura 2), para así continuar con la purificación de dichas muestras. En esta etapa, las muestras purificadas tenían que pasar los requisitos del gel y la relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, como también de la cuantificación, siendo esta mayor a 10 ng/ $\mu$ L. El pretratamiento 6A fue consistentemente efectivo (Tabla 7).





**Figura 2:** Gel de electroforesis cargado con productos de PCR de la región 16S. M) Ladder 1 Kb (Invitrogen); 1) muestra de *C. porteri* con hongo; 2) muestra de *C. donfaustoi* sin hongo; 3) muestra de *C. donfaustoi* sin hongo; 4) muestra de *C. vanderburghi* con hongo

**Tabla 7:** Evaluación de los productos de PCR purificados

Pretratamiento	Gel	A260/A280 Espectrofotometría	Promedio A260/A280	Pasa / No pasa	Cuantificación Qubit	Pasa / No pasa
6A (1)	pasa	12,25	1,896	pasa	11,8	Pasa
6A (2)	pasa	10,26	1,814	pasa	4,73	No pasa
6A (3)	pasa	10,28	1,935	pasa	3,28	No pasa
6A (4)	pasa	14,12	1,849	pasa	4,38	No pasa

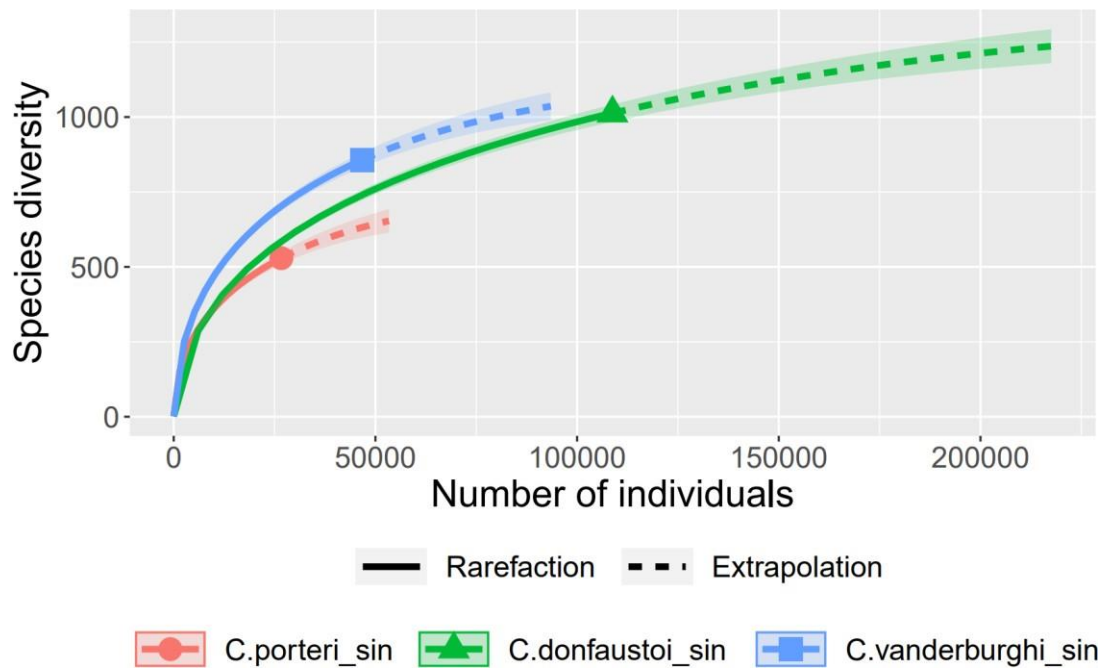
Con la secuenciación preliminar en la Flongle flow cell y el análisis correspondiente de las secuencias con el Software EPI2ME, se obtuvieron los géneros de bacterias encontrados en cada uno de los caparazones de las

tortugas. Con esta base de datos, se utilizó el paquete iNEXT en R para obtener la riqueza de seis individuos, representando las tres especies con presencia y ausencia de lesión en sus caparazones (Tabla 8).

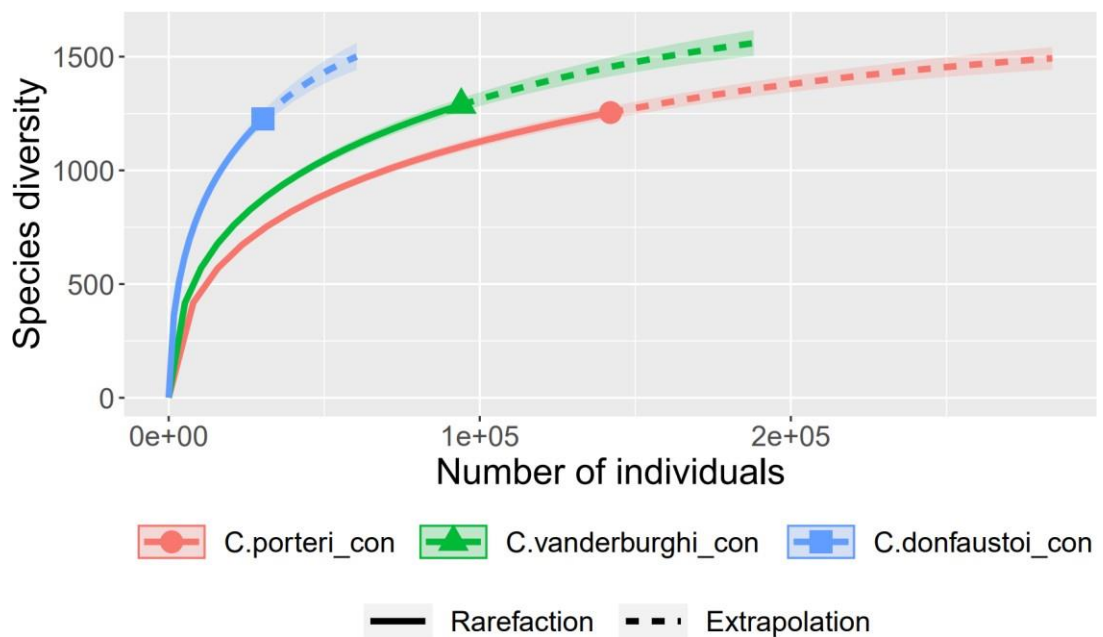
**Tabla 8:** Riqueza observada de cada especie con o sin lesión

<b>Especies de tortuga</b>	<b>Presencia de lesión</b>	<b># de géneros bacteria</b>
<i>C. porteri</i>	sin	529
<i>C. porteri</i>	con	1254
<i>C. donfaustoi</i>	sin	1013
<i>C. donfaustoi</i>	con	1227
<i>C. vandenburghi</i>	sin	857
<i>C. vandenburghi</i>	con	1288

Analizando las curvas de cada individuo se pudo apreciar un nivel considerable de riqueza, observando mayor riqueza de géneros bacterianos en individuos con lesión, en comparación de los caparazones sanos (Anexos 4-6). Asimismo, se debe tener en cuenta que las muestras que tuvieron secuencias con mayor número de lecturas son las que más se aproximaron a la asíntota de la curva (Figuras 3 y 4).



**Figura 3:** Curvas de rarefacción de muestras sin hongo, de las 3 especies de tortugas gigantes de Galápagos.



**Figura 4:** Curvas de rarefacción de muestras con hongo, de las 3 especies de tortugas gigantes de Galápagos.

## 4. Discusión

Los resultados mostraron que el pretratamiento 6A en conjunto con el Dneasy PowerSoil Pro Kit de Qiagen generaron los mejores resultados dentro de los parámetros que se evaluaron para las muestras de caparazón. Este pretratamiento consistió en un método de pulverización de la muestra, lo que permitió aumentar la superficie de contacto a la hora de realizar la extracción, y un paso adicional de ruptura enzimática que se llevó a cabo a través de la incubación de las muestras con tres enzimas: acromo peptidasa, lisozima y proteinasa K.

Al tratarse de muestras poco exploradas, esta investigación se concentró en evaluar diferentes opciones de pretratamientos y kits de extracción, usando información de protocolos aplicados a otros tipos de muestras de las cuales se obtuvo material genético. Debido al tipo de muestra poco frecuente utilizada en este estudio, los pretratamientos que mostraron ser efectivos en otras investigaciones fallaron en entregar ADN en suficiente cantidad y calidad a partir de los raspados de caparazón. Por ejemplo, el uso de agua desionizada y peptonada, utilizadas con el objetivo de resuspender la muestra, fue eficiente a la hora de extraer ADN de muestras de sangre (López DA y Mejía G, 2012), pero no dio resultados en este estudio. De manera análoga, el empleo del instrumento de mortero ha demostrado ser efectivo en los estudios de la Red Nacional de Biobancos - ISCIII et al. (2010) y de González Sánchez (2018). En el primero se comparan muchos métodos de extracción para diferentes tipos de muestras, con paredes celulares duras, de las cuales, en las muestras de tejidos, se prueba una ruptura mecánica eficiente con el mortero, obteniendo buenos resultados. En el segundo también se obtuvieron buenos resultados en el gel y las lecturas de electroforesis de la extracción de ADN de bacterias que se encontraban en macroalgas. En contraste con este estudio, que falló en obtener suficiente cantidad y calidad de ADN para proseguir con la etapa de PCRs.

El tipo de pretratamiento que se utilizó en este estudio funcionó en el trabajo publicado por Betancurt-Olvera (2018), en el cual se utilizaron muestras de tejido de árbol de tejocote (*Crataegus mexicana*). Estos tejidos fueron en

forma de brotes frescos, hojas jóvenes deshidratadas en sílica gel y brotes frescos liofilizados. Para poder romper las paredes celulares y obtener el ADN, se molieron las muestras en la etapa de lisis y en la obtención de resultados se obtuvieron buenas lecturas en el gel de agarosa y en la absorbancia 260/280.

Para el método de ruptura enzimática, se utilizaron las enzimas acromotilolisis, lisozima y proteinasa K. La incubación de estas enzimas ha mostrado ser eficiente en la ruptura de la pared celular de las bacterias (Coll et al., 2005; Cuan & Cárdenas, 2018).

A diferencia del presente estudio, en donde la combinación de las tres enzimas mostró ser eficaz para la extracción de ADN, en una investigación llevada a cabo por Suárez Contreras y Yañez Meneses (2018), se encontró que la lisozima sola fue más eficiente a la hora de la obtención de ADN de las muestras que utilizaron (bacterias gram positivas y gram negativas) que la mezcla de lisozima con proteinasa K.

En cuanto a kits de extracción, el que mejor funcionó en combinación con los pretratamientos mencionados fue el DNEasy PowerSoil Pro Kit de Qiagen. Este kit también ha mostrado ser eficaz tanto en muestras de sedimentos marinos (Pearman et al., 2020) como en sedimentos terrestres (Caro et al., 2023) y uvas trituradas (Gobert et al., 2022). Por otro lado, Sperling et al. (2018) comparó este kit con algunos otros con diferentes muestras (compost, arcilla y tierra superficial) y en todas tuvo éxito. Otros kits que también fueron utilizados a lo largo de este estudio fueron NucleoSpin® Microbial DNA de Macherey – Nagel y el PureLink® Genomic DNA Mini kit de Invitrogen. Aunque en este estudio se obtuvieron cantidades bajas de ADN, el kit de Invitrogen ha tenido éxito con muestras de orina bovina (Ruales et al., 2020), hongos aislados (*Fusarium avenaceum*, *Stagonospora nodorum* etc.) (Feng et al., 2010) y plantas de cacao (Vera-Loor et al., 2020). Además de esos estudios, el de Guillén y Zeas (2022) muestra que funcionó con ADN fúngico encontrado en raspado de caparazón. El kit de Macherey – Nagel ha demostrado buenos resultados con material genético de diferentes tipos de rocas (Jurado et al., 2009), suelos (Cardona & Restrepo, 2023) y cepas bacterianas obtenidas de tallos de planta de tubérculo, suelo de campo,

cáscara de tubérculo y raíces de patata (Essarts et al., 2016). Además de los kits de extracción de ADN industriales, también se intentó un método casero de extracción utilizando CTAB. Este método se ha realizado con algunos tipos de muestras, como las plantas, hongos y bacterias (Honoré-Bouakline et al.2003; Van Burik et al., 1998) pero, a pesar de que han sido realizadas para obtener el mismo tipo de material genético (bacteriano), en este estudio nose obtuvieron los mismos resultados.

Después de completar la extracción del ADN y con el objetivo de avanzar en el proceso de secuenciación, se pudo notar que, a pesar de las desviaciones presentes en los resultados debido a las disparidades en las lecturas entre distintas especies, se logró obtener una notable diversidad en aquellas especies que mostraron los resultados más prometedores. Es esencial tener en mente que la cantidad de lecturas no guarda una relación directa con la diversidad de un individuo en particular. Esto se evidenció en casos donde ciertas especies presentaron un menor número de lecturas, pero a su vez, exhibieron una mayor riqueza, como se ilustra en el caso de *C. donfaustoi\_sin hongo* (figura 1, 4).

Los resultados revelan que las especies que contaron con un mayor número de lecturas también estuvieron más próximas a la asíntota en la curva. Esta disparidad podría atribuirse a la posible preferencia de la Flonge Flow cell hacia ciertos barcodes utilizados en el experimento.

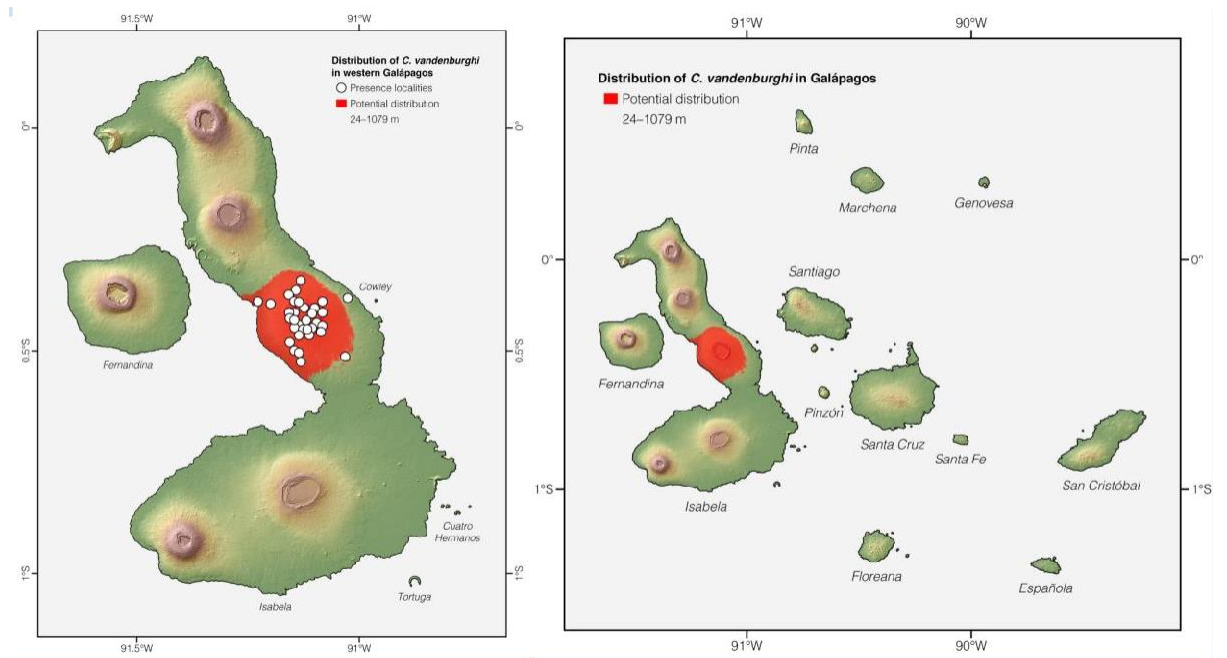
## 5. Conclusiones

- El mejor pretratamiento para la extracción de ADN fue el 6A con el DneasyPowerSoil Pro Kit Qiagen juntos
- Aunque se obtuvieron sesgos y contratiempos durante el proceso, el protocolo y los criterios de selección que se estableció en esta investigación funcionó para la extracción de ADN de bacterias, obteniendo una buena riqueza de estas.
- Con el pretratamiento establecido, se logró obtener una gran riqueza de géneros de bacterias en cada una de las poblaciones muestreadas de tortugas gigantes.
- Los retos asociados a la extracción de ADN de muestras biológicas de especies no convencionales entraña numerosos retos que deben ser abordados en futuros estudios para optimizar las técnicas de diagnóstico microbiológico.

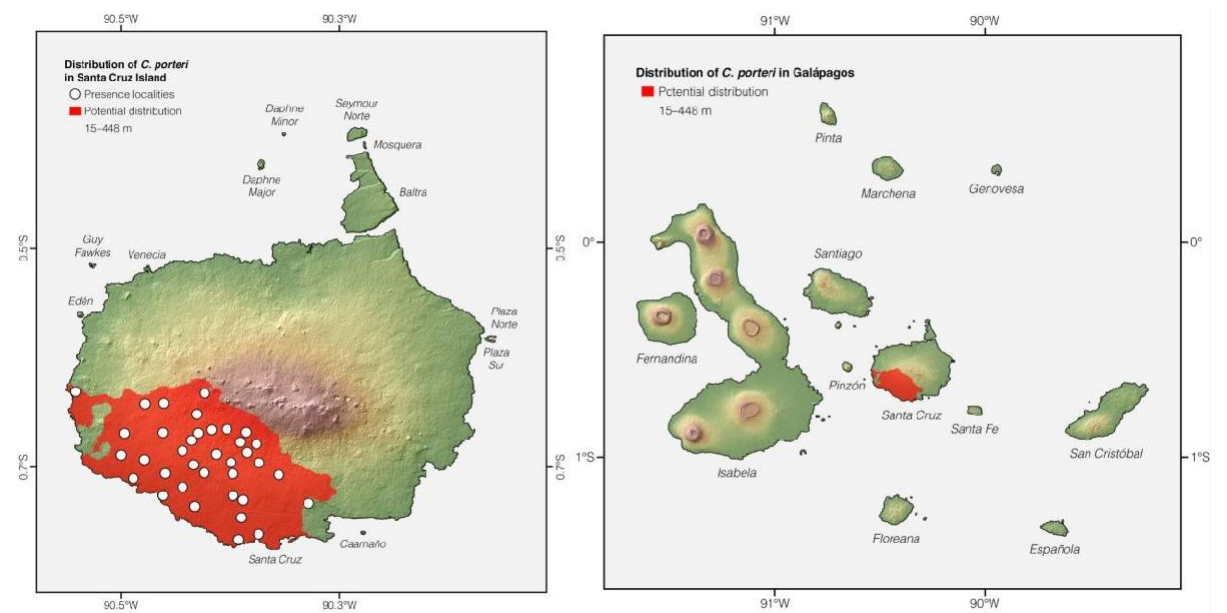
### 5.1 Recomendaciones

- Organizar bien el tiempo de la extracción de las muestras con la llegada del Kit de secuenciación e insumos (Flong Flow cell).
- Usar Flow cell ya que tiene una mayor cantidad de poros y durabilidad que la Flong Flow cell que se utilizó en este proyecto. También se podría poner a prueba otro equipo de secuenciación, como lo es Illumina, que utiliza amplificación clonal y secuenciación por síntesis química para permitir una secuenciación rápida y precisa.
- Realizar lecturas de más muestras, para disminuir el sesgo en los resultados.

## Anexos

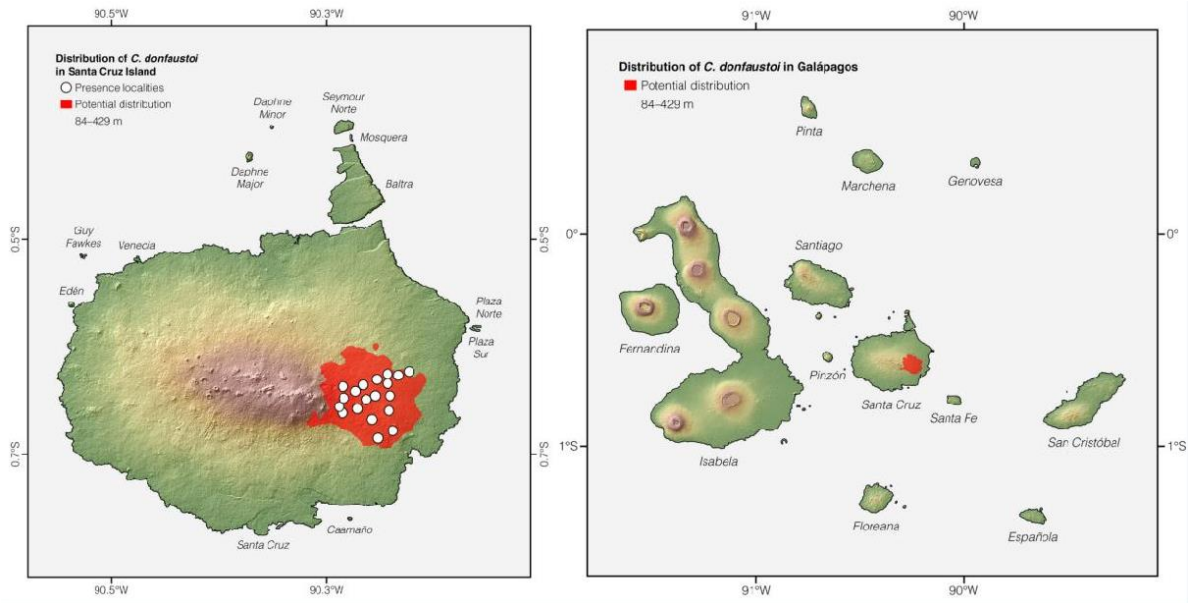


**Anexo 1:** Distribución de *C. vandenburghi* en la isla Isabela, Galápagos. Fuente: Reptiles of Ecuador: Life in the middle of the world, Arteaga & Guayasamín (2020c).

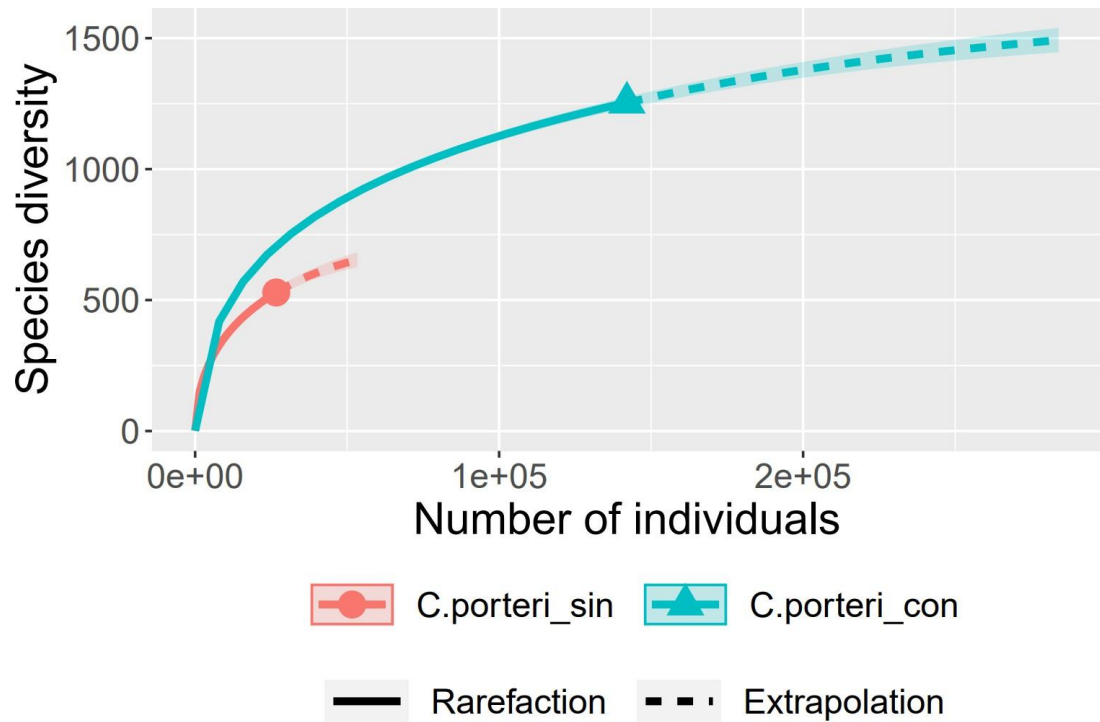


**Anexo 2:** Distribución de *C. porteri* en la isla Santa Cruz, Galápagos. Fuente: Reptiles of Ecuador: Life in the middle of the world, Arteaga & Guayasamín (2020b).

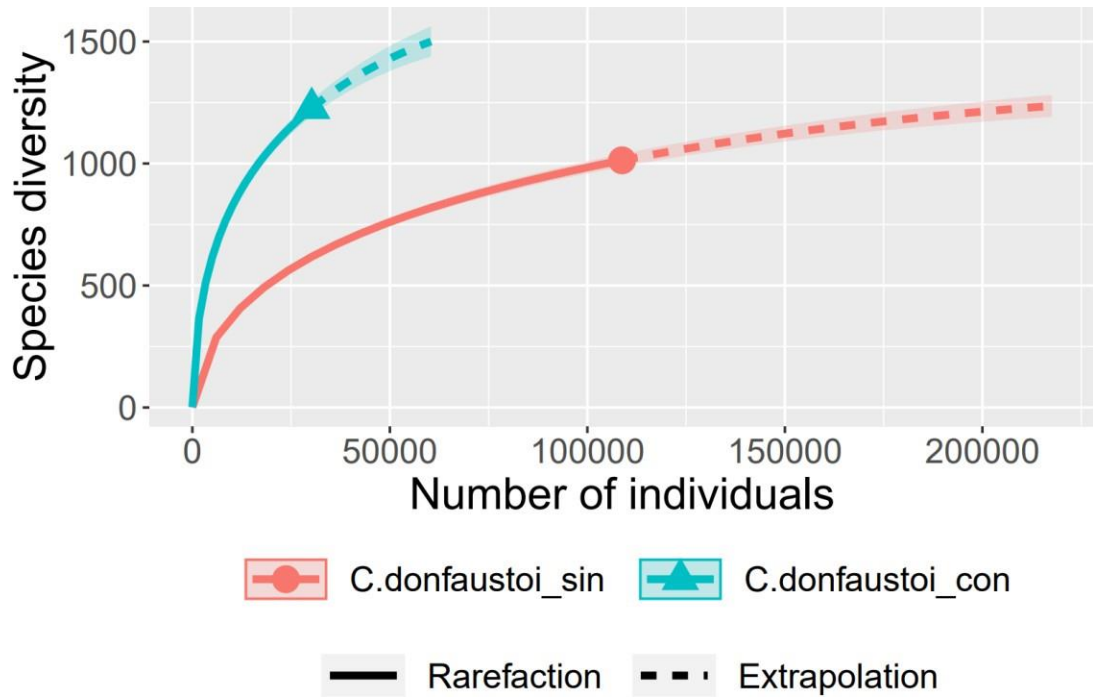




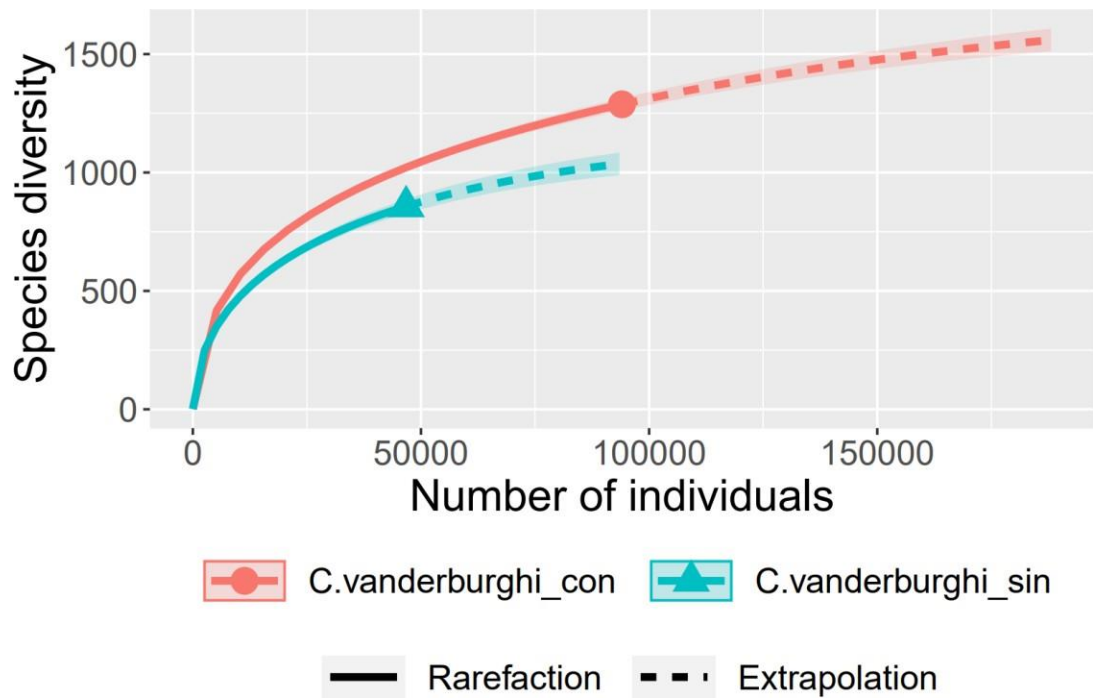
**Anexo 3:** Distribución de *C. donfaustoi* en la isla Santa Cruz, Galápagos. Fuente: Reptiles of Ecuador: Life in the middle of the world, Arteaga & Guayasamín (2020a).



**Anexo 4:** Curva de rarefacción de la muestra *C. porteri*, con y sin lesión.



**Anexo 5:** Curva de rarefacción de la muestra *C. donfaustoi*, con y sin lesión.



**Anexo 6:** Curva de rarefacción de la muestra *C. vanderburghi*, con y sin lesión.

## Referencias

An introduction to r. (2023, 29 abril). Rstudio. Recuperado 1 de mayo de 2023, de <https://cran.rstudio.com/doc/manuals/r-devel/r-intro.pdf>

Bastille-Rousseau, G., Gibbs, J. P., Yackulic, C. B., Frair, J. L., Cabrera, F., Rousseau, L., Wikelski, M., Kümmeth, F., & Blake, S. (2017). Animal movement in the absence of predation: Environmental Drivers of Movement Strategies in a Partial Migration system. *Oikos*, 126(7), 1004-1019.

<https://doi.org/10.1111/oik.03928>

Benítez-páez, A., Portune, K. J., & Sanz, Y. (2016). Species-level resolution of 16s rRNA gene amplicons sequenced through the minion™ portable nanopore sequencer. *Gigascience*, 5(1), s13742-016

Betancurt-olvera, M. (2018). Comparación de seis métodos de extracción de ADN en tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé). *Redalyc.org*. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61054744009>

Blake, S., Yackulic, C. B., Cabrera, F., Tapia, W., Gibbs, J. P., Kümmeth, F., & Wikelski, M. (2012). Vegetation dynamics drive segregation by body size in Galapagos tortoises migrating across altitudinal gradients. *Journal of Animal Ecology*, 82(2), 310-321. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12020>

Cardona Vanegas G I, Restrepo Escobar M C (2023): bacterias y arqueas de la transición andino-amazónica del departamento del caquetá - proyecto colombia bio. V2.4. Instituto amazónico de investigaciones científicas - sinchi. Dataset/occurrence. <https://doi.org/10.15472/6sg16z>  
<https://doi.org/10.15472/6sg16z>

Caro, A., Ugarte-Zabaleta, I., Vázquez-Sanz, J., Albaina, A., Madeira, M. J., & Gómez-Moliner, B. J. (2023). Monitorización de las comunidades de anfibios mediante metabarcoding de ADN ambiental. *Munibe Monographs*.

<https://doi.org/10.21630/mmns.2023.5.03>

Cornejo Romero, A., Serrato Díaz, A., Rendón Aguilar, B., Rocha Munive, M., secretaria de medio ambiente y recursos naturales (semarnat), instituto nacional de ecología y cambio climático (inecc), & universidad autónoma metropolitana-iztapalapa (uam-i). (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos [researchgate]. [https://www.researchgate.net/profile/jorge-ramirez-salcedo/publication/296695965\\_microarreglos\\_de\\_dna\\_fabricacion\\_proceso\\_y\\_analisis/links/56d88bc408aee73df6ccfd74/microarreglos-de-dna-fabricacion-proceso-y-analisis.pdf#page=43](https://www.researchgate.net/profile/jorge-ramirez-salcedo/publication/296695965_microarreglos_de_dna_fabricacion_proceso_y_analisis/links/56d88bc408aee73df6ccfd74/microarreglos-de-dna-fabricacion-proceso-y-analisis.pdf#page=43)

¿cómo funciona la citas? | citas. (s. F.). <https://cites.org/esp/disc/how.php>

Corcoll, N., Österlund, T., Sinclair, L., Eiler, A., Kristiansson, E., Backhaus, T., & Martin Eriksson, K. (2017). Comparison of four dna extraction methods for comprehensive assessment of 16s rRNA bacterial diversity in marine biofilms using high-throughput sequencing. *Fems microbiology letters*, 364(14), 1–9.

Hyperlink"<https://doi.org/10.1093/femsle/fnx139>"

<https://doi.org/10.1093/femsle/fnx139>

Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., & Domínguez-Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(4), 1150-1173. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>

Cuan, A. G., & Cárdenas, A. (2018). Evaluación de métodos de extracción de ADN bacteriano en muestras fecales de pacientes diagnosticados con infección por *Helicobacter pylori*. *Biociencias*, 13(2), 17-23. <https://doi.org/10.18041/2390-0512/biociencias.2.4996>

De Alda, J. A. G. O., Marcos-Merino, J. M., & Gallego, R. (2019). Extracción de ADN con material cotidiano: desarrollo de una estrategia interdisciplinaria

partir de sus fundamentos científicos. *Educación química*, 30(1), 58.  
<https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2019.1.65732>

Essarts, Y. R. D., Cigna, J., Quêtu-Laurent, A., Caron, A., Munier, E., Beury-Cirou, A., Hélias, V., & Faure, D. (2016). Biocontrol of the potato blackleg and soft rot diseases caused by *dickeya dianthicola*. *Applied and environmental microbiology*, 82(1), 268-278. <https://doi.org/10.1128/aem.02525-15>

Feng, J., Hwang, R. F., Chang, K., Hwang, S., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., & Zhou, Q. (2010). An inexpensive method for extraction of genomic dna from fungal mycelia. *Canadian journal of plant pathology*, 32(3), 396-401. <https://doi.org/10.1080/07060661.2010.508620>

Filippis, F. De, Parente, E., & Ercolini, D. (2017). Minireview metagenomics insights into food fermentations, 10, 91–102. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12421>

Froyd, C. A., Coffey, E. E., Van Der Knaap, W. O., Van Leeuwen, J. F., Tye, A., & Willis, K. J. (2014). The ecological consequences of megafaunal loss: giant tortoises and wetland biodiversity. *Ecology letters*, 17(2), 144-154.

Galapagos tortoise movement ecology program. (s. F.). [www.gianttortoise.org](http://www.gianttortoise.org)

Gibbs, J. P., Sterling, E. J., & Zabala, F. J. (2010). Giant tortoises as ecological engineers: a long-term quasi-experiment in the galápagos islands. *Biotropica*, 42(2), 208-214. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2009.00552.x>

Gobert, A., Ever, M. S., Morge, C., Sparrow, C., & Delafont, V. (2022). Comparison of dna purification methods for high-throughput sequencing of fungal communities from wine fermentation. *Microbiologyopen*, 11(5). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1321>

Gómez, G., & Batista, C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos tropicales*, 27(3), 17-24.

González Sánchez, P. T. (2018). Comparación de metodologías de extracción de adn de bacterias epífitas de ulva lactuca y tamizaje preliminar de su actividad funcional [tesis de grado]. Universidad de bogotá jorge tadeo lozano.

Guevara Pardo, G., (2004). ADN: historia de un éxito científico. Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia, 3(11), 9-40.

Guillén Liger, M. P., & Zeas Bermeo, S. E. (2022). Aislamiento, identificación y caracterización molecular de los microorganismos presentes en el caparazón de las tortugas gigantes (*Chelonoidis porteri*) de la isla Santa Cruz (bachelor's thesis, Universidad del Azuay).

Gunther, a. C. L. G. (1874). Xi. Description of the living and extinct races of gigantic land-tortoises. —parts i. And ii. Introduction, and the tortoises of the Galapagos islands. Proceedings of the Royal Society of London, 22(148-155), 421-422.

Hennessy, e. (2019). On the backs of tortoises. Yale University Press

Honoré-Bouakline, S., Vincensini, J., Giacuzzo, V., Lagrange, P., & Herrmann, J. (2003). Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. Journal of Clinical Microbiology, 41(6), 2323-2329. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2323-2329.2003>

Hsieh, T. C., Ma, K. H., & Chao, A. (2016). Inext: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (hill numbers). Methods in Ecology and Evolution, 7(12), 1451-1456. [doi:10.1111/2041-210X.12613](https://doi.org/10.1111/2041-210X.12613)

Hunter, E., Gibbs, J. P., Cayot, L. J., & Tapia, W. (2013). Equivalency of Galapagos giant tortoises used as ecological replacement species to restore ecosystem functions. Conservation Biology, 27(4), 701-709. <https://doi.org/10.1111/cobi.12038>

IUCN. (2021). The iucn red list of threatened species. Version 2021-2. <https://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 01 november 2021.

Jurado, V., Fernandez-Cortes, A., Cuezva, S., Laiz, L., Cañaveras, J. C., Sanchez-Moral, S., & Saiz-Jimenez, C. (2009). The fungal colonisation of rock- art caves: experimental evidence. *Naturwissenschaften*, 96(9), 1027–1034. Doi:10.1007/s00114-009-0561-6

Khoruts, A., & Sadowsky, M. J. (2016). Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nature reviews gastroenterology & hepatology*, 13(9), 508-516.

Kisová, Z., Planý, M., Pavlović, J., Bučková, M., Puškárová, A., Kraková, L., ... & Šoltys, K. (2020). Biodeteriogens characterization and molecular analyses of diverse funeral accessories from xvii century. *Applied sciences*, 10(16), 5451.

Leggett, R. M., Alcon-Giner, C., Heavens, D., Caim, S., Brook, T. C., Kujawska, M., ... & Clark, M. D. (2020). Rapid minion profiling of preterm microbiota and antimicrobial-resistant pathogens. *Nature microbiology*, 5(3), 430-442.

López Da, L., & Mejía G, C. (2012). Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Mvz Córdoba*, 17(3). <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v17n3/v17n3a11.pdf>

Mafune, K. K., Godfrey, B. J., Vogt, D. J., & Vogt, K. A. (2019). A rapid approach to profiling diverse fungal communities using the Minion™ nanopore sequencer. *Biotechniques*, 68(2), 72-78.

Márquez, C., Wiedenfeld, D., Snell, H., Fritts, T., Flyway Belen, M., Macfarland, C., ... & Naranjo, S. (2004). Estado actual de las poblaciones de tortugas terrestres gigantes (*Geochelone* spp., Chelonia: Testudinae) en las islas Galápagos. *Ecología aplicada*, 3(1-2), 98-111.

Martinez Vargas, D. (2022). Análisis molecular de la diversidad microbiana de suelos de dos fincas bajo manejo agroecológico en la isla santa cruz, galápagos [tesis de grado]. Universidad técnica estatal de quevedo.

Mejía Vargas, C. A. (2017). Efecto de borde sobre la composición de quirópteros filostómidos en el derecho de vía, del proyecto poliducto pascuales cuenca, en un tramo del bosque san josé, cañar ecuador [trabajode titulación]. Universidad central del ecuador.

Mosquera, R. V. (2005). *Marcadores moleculares y la extracción de ADN*. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117966>

Nielsen, H. B., Almeida, M., Juncker, A. S., Rasmussen, S., Li, J., Sunagawa, S., ... & Ehrlich, S. D. (2014). Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nature biotechnology*, 32(8), 822-828.

Nieto-Claudin, A., Esperón, F., Blake, S., & Deem, S. L. (2019). Antimicrobial resistance genes present in the faecal microbiota of free-living Galapagos tortoises (*Chelonoidis porteri*). *Zoonoses and public health*, 66(8), 900-908.

Nieto-Claudin, A., Deem, S. L., Rodríguez, C., Cano, S., Moity, N., Cabrera, F., & Esperón, F. (2021). Antimicrobial resistance in galapagos tortoises as an indicator of the growing human footprint. *Environmental pollution*, 284, 117453.

Nucleic acid quantification support—getting started | thermo fisher scientific - nl. (s. F.). <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/technical-resources/technical-reference-library/nucleic-acid-purification-analysis-support-center/nucleic-acid-quantification-support/nucleic-acid-quantification-support-getting-started.html?open=zx1>

Osorio, J., Pachajoa, H., & Hurtado, P. (2011). Concentración y pureza del adnde muestras sanguíneas en papel whatman fta almacenadas entre 1 a 3



años\*. Revista estomatología y salud, 21 (1), 35-38.  
<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/01/877727/7-osorio-concentracion-pureza-adn.pdf>

Padilla, L. R., Gottdenker, N., Deem, S. L., & Cruz, M. (2018). Domestic and peridomestic animals in galapagos: health policies and practices. In disease ecology (pp. 269-291). Springer, cham.

Parra Rojas, J. P. (2015). Análisis del procesamiento del arn mensajero de atbzp60 bajo distintos tratamientos que activan la respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en arabidopsis thaliana usando electroforesis capilar (doctoral dissertation, universidad andrés bello).  
<https://repositorio.unab.cl/xmlui/handle/ria/4547>

Pearman, J. K., Keeley, N., Wood, S. A., Laroche, O., Zaiko, A., Thomson-Laing, G., Biessy, L., Atalah, J., & Pochon, X. (2020). Comparing sediment dna extraction methods for assessing organic enrichment associated with marine aquaculture. Peerj, 8, e10231. <https://doi.org/10.7717/peerj.10231>

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

Red Nacional de Biobancos - ISCIII, Orfao de Matos, A., Pinto Labajo, R., Pascual Sánchez, J., Aragall, E., Pedrosa Berrio, E., Solloso Banobre, A., Posadade la Paz, M., Ars Criach, E., Vieítez González, I., Martínez Santamaría, J., Bellmunt, E., Isidro Marrón, P., Coya Guerrero, R., Aguilar Quesada, R., Martínez Marín, R., & Escámez, T. (2010). *PNT extraccion de Acidos nucleicos*. Red Biobancos Instituto de Salud Carlos III. <https://redbiobancos.es/wp-content/uploads/pnt-extraccion-acidos-nucleicos.pdf>

Research, s. (2022, 30 septiembre). Rendimiento analítico del microvolumen de ácido nucleico utilizando el espectrofotómetro epoch - summit research. Summit research. <https://www.summit-research.com.ar/rendimiento->

analitico-del-microvolumen-de-acido-nucleico-con-el-espectrofotometro-epoch/

Ruales, A., De La Torre, M. E., Martínez, C. G., Baquero, C. M., & Casart, Q. Y. (2020). Evaluación de métodos de extracción de adn genómico para la identificación de leptospira spp en muestras de orina bovina mediante por pcr. Revista de investigaciones veterinarias del Perú. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.15522>

Runtuwene, L. R., Tuda, J. S., Mongan, A. E., & Suzuki, Y. (2019). On-site minion sequencing. Single molecule and single cell sequencing, 143-150.

Sosa-Amay, F. E., Rodríguez, H. N., & Castro, J. R. (2017). Comparación de dos métodos para aislar adn genómico humano a partir de discos de papel filtro impregnados con sangre total. Conocimiento amazónico, 8(1), 51-56. <https://revistas.unapiquitos.edu.pe/index.php/conocimientoamazonico/article/download/183/318>

Sperling, T., O'neil, D., Nieciecki, V., Smith, P., Schroeer, S., Scholle, N., Polidori, M., & Sprenger-Haussels, M. (s. F.). Novel procedure for improved results in soil microbiome analysis using the dneasy® powersoil® pro kit. Qiagen moscow.

Suares Contreras, L. Y., & Yañez Meneses, L. F. (2018). Extracción de ADN de bacterias conservadas en el Banco de cepas de la Universidad Francisco de Paula Santander Sede Campos Elíseos. *Respuestas*, 23(S1), 24-28. <https://doi.org/10.22463/0122820x.1496>

Sutton, D. A., Marín, Y., Thompson, E. H., Wickes, B. L., Fu, J., García, D., ... & Guarro, J. (2013). Isolation and characterization of a new fungal genus and species, *aphanoascella galapagosensis*, from carapace keratitis of a galapagos tortoise (*chelonoidis nigra microphyes*). *Medical mycology*, 51(2), 113-120.

*The IUCN red list of threatened species.* (2023). IUCN Red List of Threatened Species.

<https://www.iucnredlist.org/search?taxonomies=170515&searchType=species>

Tosco Herrera, E. (2019). Análisis de datos en biocomputación: tecnología minion y herramientas bioinformáticas.

Van Burik, N., Schreckhise, N., White, N., Bowden, N., & Myerson, N. (1998). Comparison of six extraction techniques for isolation of dna from filamentous fungi. *Medical mycology*, 36(5), 299-303. <https://doi.org/10.1046/j.1365-280x.1998.00161.x>

Vásconez Robalino, J. N. (2018). Evaluación del periodo de residualidad de semillas en el aparato digestivo de tortugas gigantes (*chelonoidis* spp.), que permanecen en cuarentena a su ingreso a programas de repatriación o reproducción en cautiverio del centro de crianza "fausto llerena", isla santa cruz-galápagos (bachelor's thesis, quito: uce).

Vázquez-Euán, R., Escalante-Herrera, K. S., & Rodríguez-Fuentes, G. (2017). Partial gene sequencing of *cyp1a*, vitellogenin, and metallothionein in mosquitofish *gambusia yucatana* and *gambusia sexradiata*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 98, 41-45.

Vélez, D. U. (2009). Metagenómica ¿una oportunidad para el estudio de la diversidad microbiana en colombia? *Revista colombiana de biotecnología*, 11(2), 4-7.

Vera-Loor, M. A., Cabrera, A. B., Vera-Coello, D., Leiva-Mora, M., & De Villegas, L. M. D. (2020). Identificación de bacterias endófitas formadoras de endosporas asociadas a *theobroma cacao* l. En quinindé, esmeraldas,

ecuador. Centro agrícola, 47, 63-67. [Http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v47s1/0253-5785-cag-47-s1-63.pdf](http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v47s1/0253-5785-cag-47-s1-63.pdf)

Walsh, S. J., & Mena, C. F. (2013). Science and conservation in the galapagos islands: frameworks & perspectives (vol. 246). New york: springer.

Watkins, G., & Oxford, P. (2009). Galapagos: the two sides of the coin. Puertoayora, galapagos, galapagos national park & charles darwin foundation.

Wooley, J. C., Godzik, A., & Friedberg, I. (2010). A primer on metagenomics. *Plos computational biology*, 6(2), e1000667.

Yackulic, C. B., Blake, S., & Bastille-Rousseau, G. (2017). Benefits of the destinations, not costs of the journeys, shape partial migration patterns. *Journal of Animal Ecology*, 86(4), 972-982. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12679>

Zuñiga Guevara, E. (2014). El descubrimiento de adn. Gobierno de canarias. Recuperado 18 de mayo de 2023, de <https://www3.gobiernodecanarias.org/medusa/ecoblog/aldiamor/files/2014/04/el-descubrimiento-del-adn.pdf>



