

ESTUDIO METAGENÓMICO DE LA DIVERSIDAD EUCARIOTA DEL ECOSISTEMA DEL MANGLAR DE LA BAHÍA DE CISPATÁ, SAN ANTERO, CÓRDOBA



Nelson Adrián Casas Velásquez
Lina Vanessa Hurtado Pulido

Asesora
Martha Lucía Posada Buitrago, Ph.D.

Introducción



Diana Rocío Arango López

Manglares



Son considerados como una de las cinco estructuras biológicas más importantes y productivas en el mundo.

Son el hábitat de miles de especies, tanto procariotas como eucariotas. Alberga hongos, bacterias y demás microorganismos que contribuyen a la descomposición de materia orgánica.¹

Bahía de Cispatá, San Antero Córdoba.



Antecedentes

2010



Estudio de Microeucariotas en el manglar de Restinga da Marambaia, Brasil.

Santos et al. evalúan la dinámica de la población y los distintos filotipos que predominan en sedimentos del manglar con y sin contaminación ².

2013



Análisis del potencial celulolítico de algunos eucariotas en dos manglares de Brasil.

eucariotas, aislados de muestras de manglar de Río de Janeiro y Bahía Porto Seguro. En total se aislaron 296 microorganismos, 179 (60.5%) y 117 (39.5%) respectivamente, por lo cual relacionaron esta diferencia con el estado de conservación del manglar³.

2016

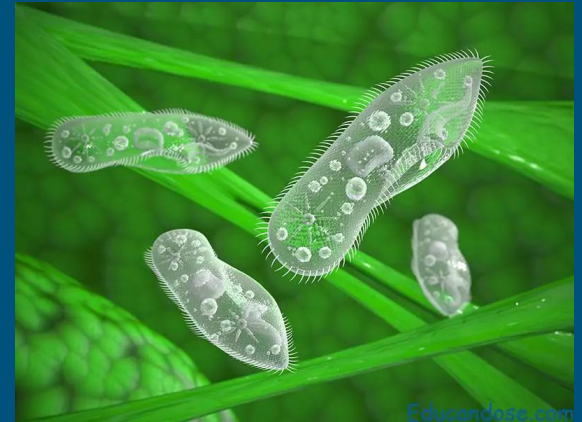


Análisis de las zonas intermedias de las fuentes acuíferas de Perú y Canterbury

Pachiadaki, en el 2016, analizó la actividad fúngica y procariota de la biosfera subsuperficial marina, en Perú y en la cuenca de Canterbury, deducidas de análisis basados en ARN y microscopía⁴

Objetivo General.

Contribuir al conocimiento de la diversidad eucariota del ecosistema del manglar de la bahía de Cispatá, San Antero, Córdoba, Colombia.



Objetivos específicos

Determinar la diversidad microbiana eucariota asociada a sedimentos del ecosistema de manglar de la Bahía de Cispatá, mediante análisis metagenómico, en cinco zonas de diferente uso: Caño Salado, Caño Dago, Caño Navío, Caño Muerto, Desembocadura río Sinú-Brazo Tinajones.

Determinar la diversidad microbiana eucariota asociada a aguas del ecosistema de manglar de la Bahía de Cispatá en cinco zonas de diferente uso, mediante análisis metagenómico.

METODOLOGÍA



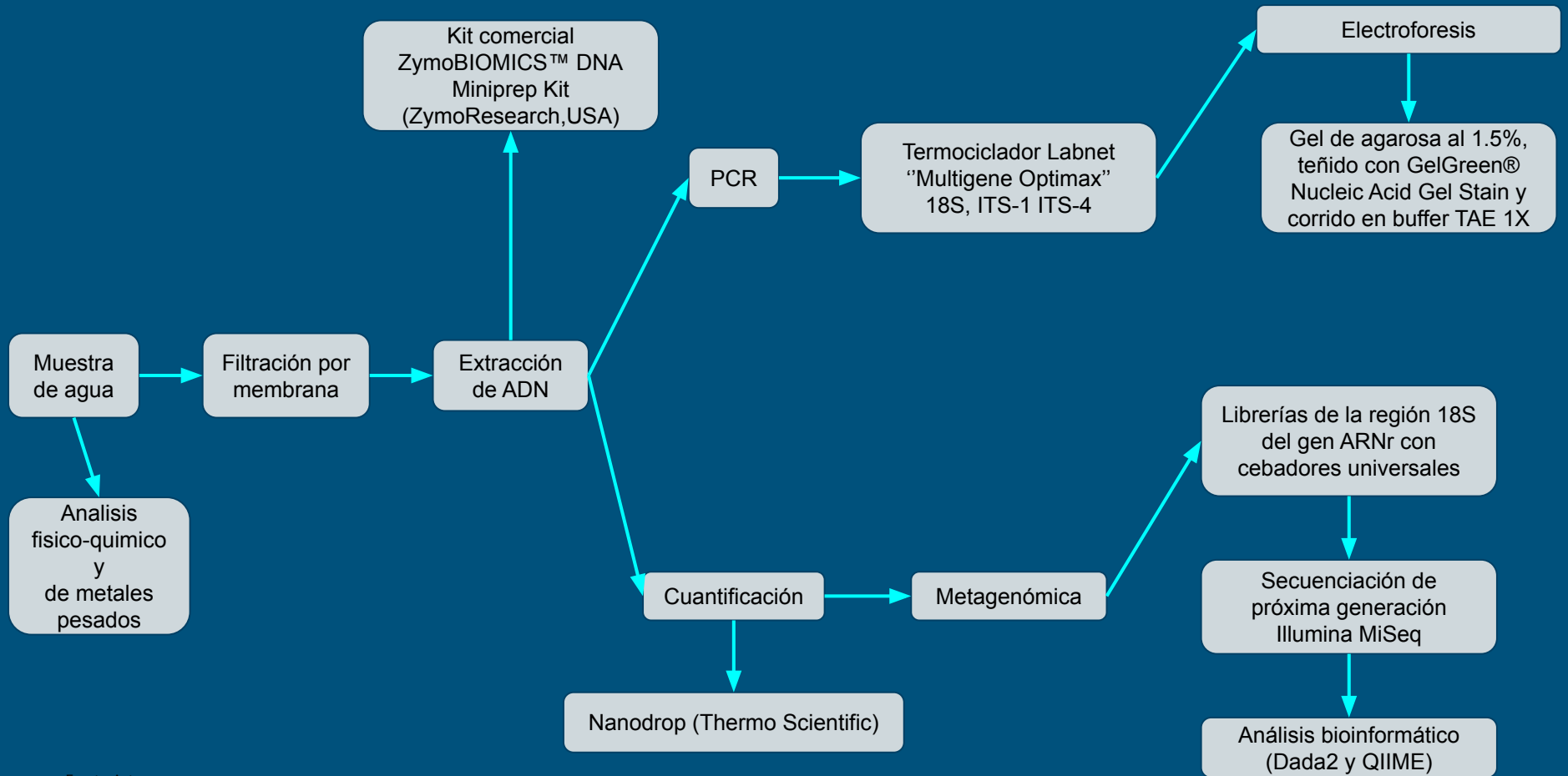
Tomado de Abril Flórez A.L, Alfonso Moyano L.D, Arango López D.R, Bermúdez Macías M.Y, Estudio metagenómico de la diversidad procariota del ecosistema de manglar de la bahía de Cispatá, San Antero, Córdoba, Colombia. UCMC; 2018

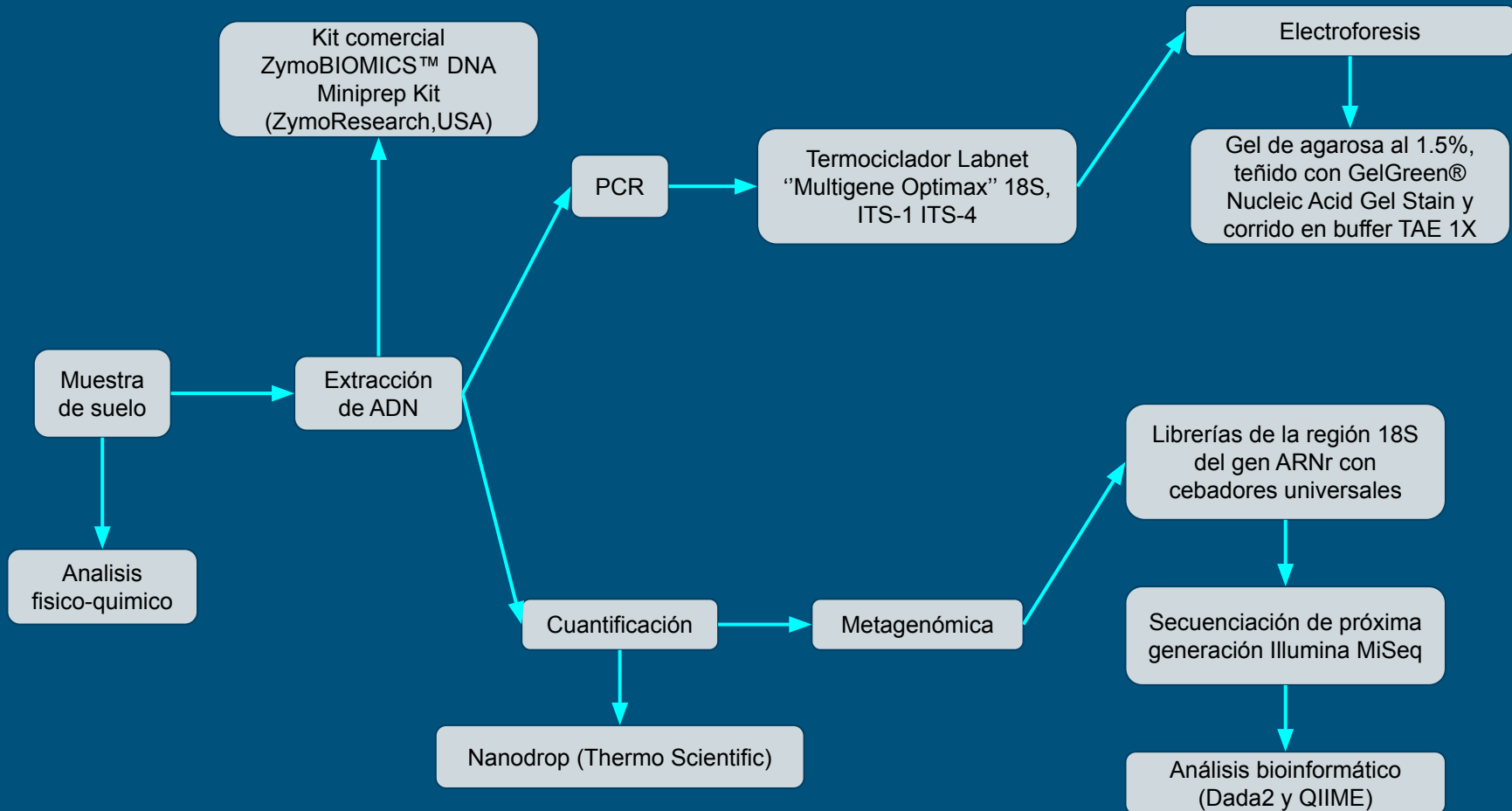
	ZONA	MUESTRA AGUA	MUESTRA SUELO
Zona de preservación	CAÑO SALADO PLATAFORMA	1 L, a 30 cm de distancia de la plataforma de desovamiento.	1200 gr, por el método de profundidad a 15, 30 y 60 cm de la plataforma de desovamiento.
	CAÑO NAVÍO	1 L, a 80 cm de distancia de la orilla.	1200 gr, por el método de profundidad a 15, 30 y 60 cm a 87 cm de distancia de la orilla.
Zona de uso sostenible	CAÑO DAGO PLATAFORMA	1 L, a 60 cm de la plataforma de desovamiento.	2 tubos falcón de 30 gr de fango y 1200 gr de sedimento por el método de profundidad a 15,30 y 60 cm.
	CAÑO MUERTO	1 L, a 400 cm de distancia de la orilla.	1200 gr, por el método de profundidad a 15, 30 y 60 cm a 75 cm de distancia de la orilla.
	DESEMBOCADURA RÍO SINÚ	1 L, a 400 cm de distancia de la orilla.	1200 gr, por el método de profundidad a 15, 30 y 60 cm.

Fuente: Autores

Fuente: Autores

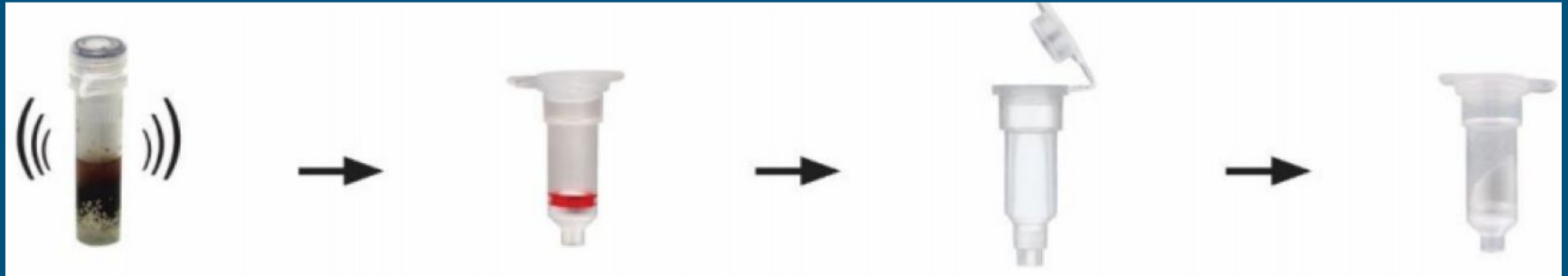
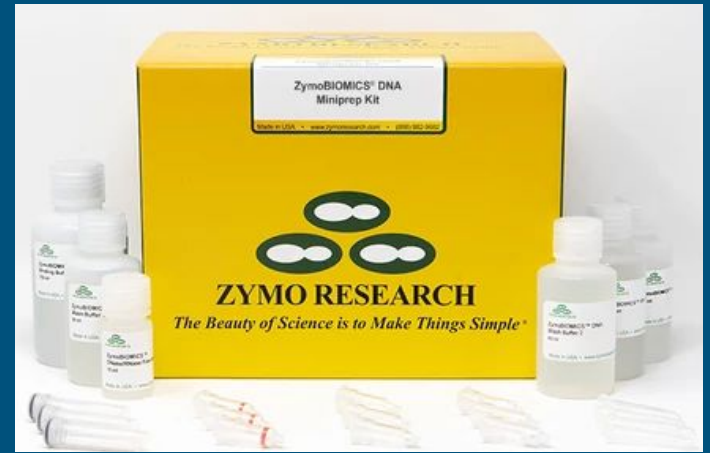
Las mediciones de pH y temperatura se realizaron *in situ* en cada una de las zonas muestreadas.





Extracción de ADN

5 muestras de agua
5 muestras de suelo



Lisis libre de sesgo utilizando tubos de lisis de perlas de ZR

Filtrar lisado

Rendimientos e integridad superiores con la tecnología Zymo-Spin

Elimina inhibidor de PCR como el ácido húmico / fúlvico y la melanina

Cálculos Master Mix

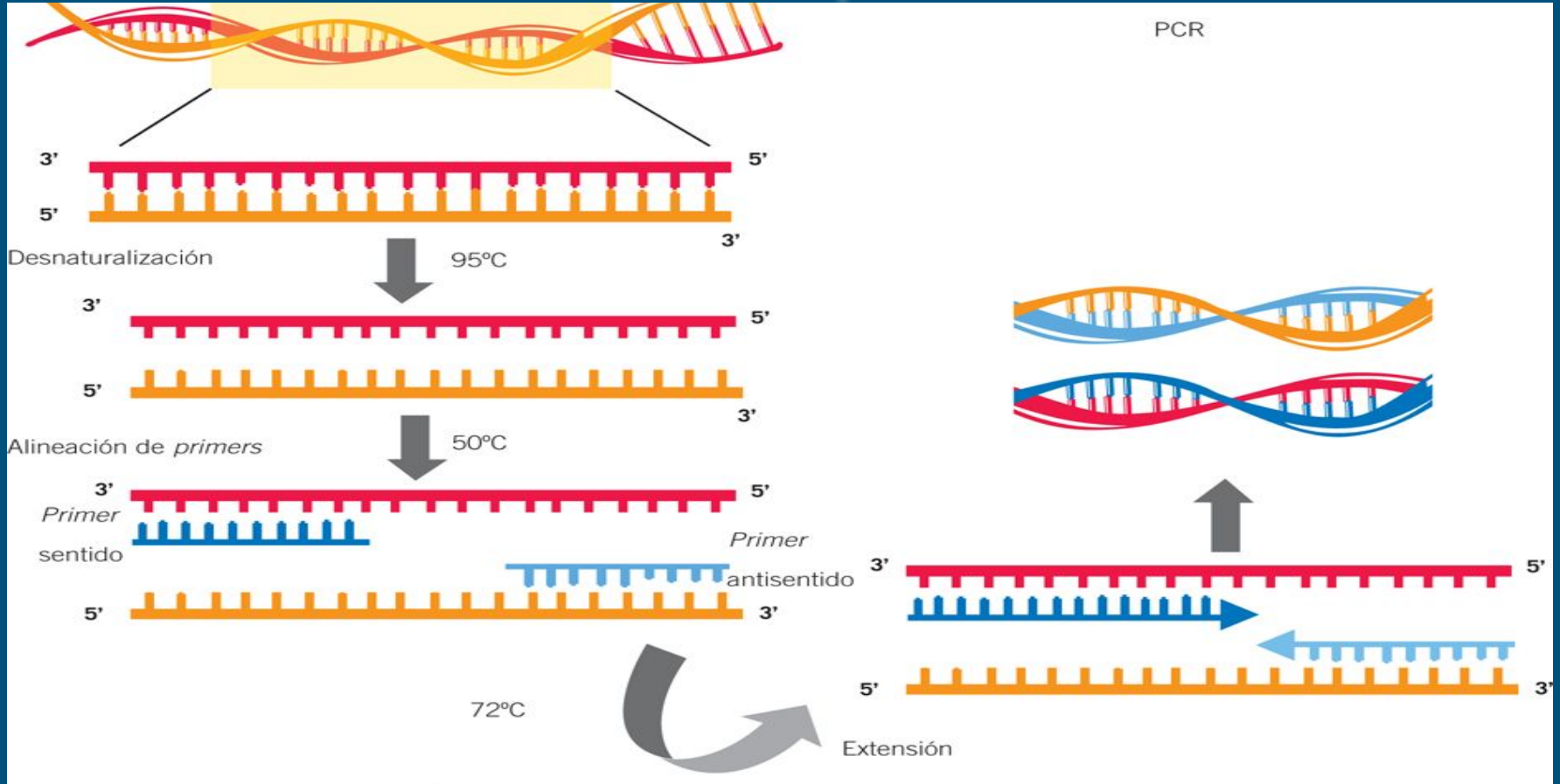
Cálculos para la Master Mix (PCR con 0.6 µL de ADN)				
Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen total para 1 muestra	Volumen total para 13 muestras
GoTaq® Green Master Mix PROMEGA CORPORATION.	2X	1X	7.5 µL	97.5 µL
Primer ITS 1	10 µM	0.1 µM	0.3 µL	3.9 µL
Primer ITS 4	10 µM	0.1 µM	0.3 µL	3.9 µL
H ₂ O	----	----	6.3 µL	81.9 µL
ADN	----	----	0.6 µL	7.8 µL
VOLUMEN FINAL			15 µL	195 µL

Fuente: Autores

ITS usados

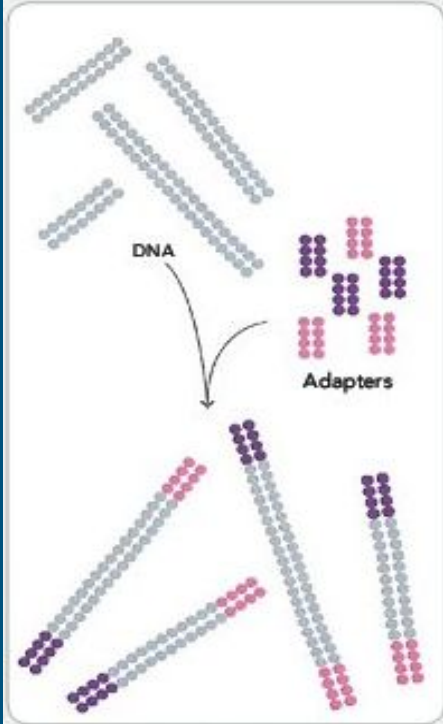
PRIMER	DIRECCIÓN	SECUENCIA (5' - 3')	SITIO DE UNIÓN DEL OPERÓN DE ARNr
ITS-1	Sentido	<i>CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA</i>	Subunidad pequeña
ITS-4	Antisentido	<i>TCCTCCGCTTATTGATATGC</i>	Subunidad grande

Condiciones para la PCR



Secuenciación Illumina

1. PREPARE GENOMIC DNA SAMPLE



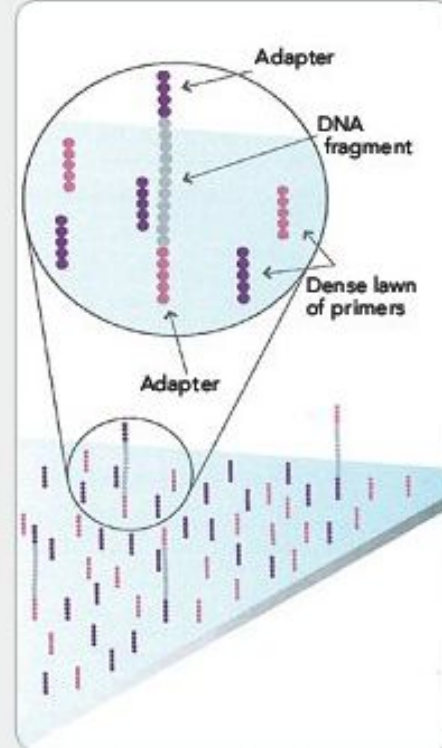
Randomly fragment genomic DNA and ligate adapters to both ends of the fragments.

Se fragmenta el DNA

Se reparan los extremos

Se agregan los adaptadores

2. ATTACH DNA TO SURFACE

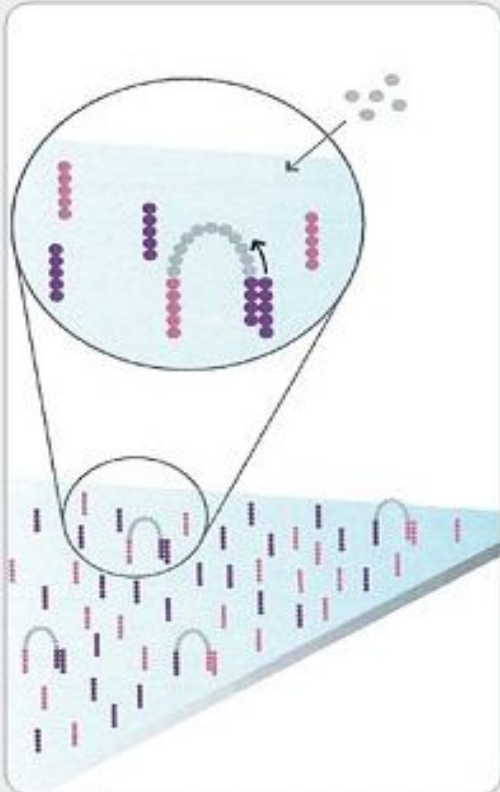


Bind single-stranded fragments randomly to the inside surface of the flow cell channels.

Se agrega el DNA a la placa

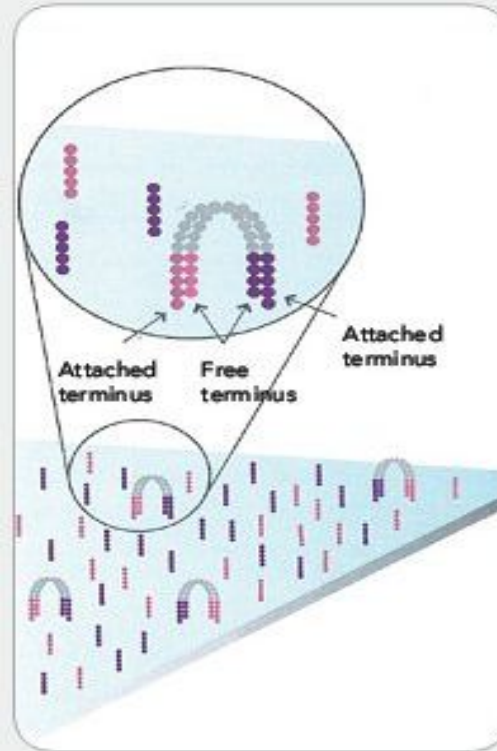
Se hibrida aleatoriamente con los adaptadores que están en la placa

3. BRIDGE AMPLIFICATION



Add unlabeled nucleotides and enzyme to initiate solid-phase bridge amplification.

4. FRAGMENTS BECOME DOUBLE STRANDED

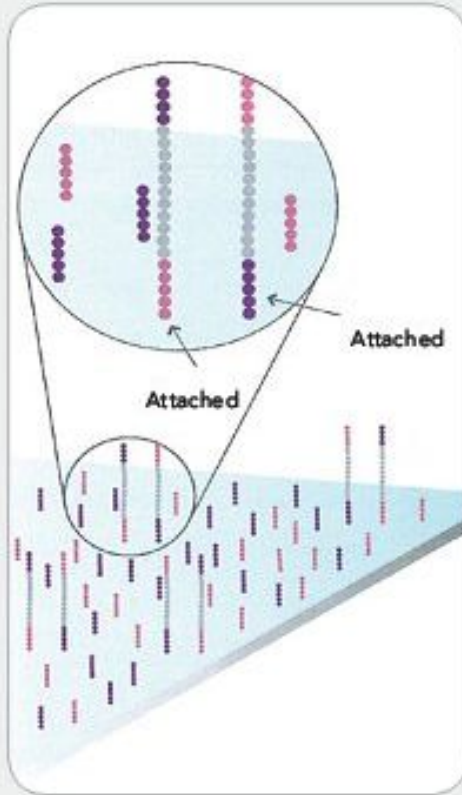


The enzyme incorporates nucleotides to build double-stranded bridges on the solid-phase substrate.

Se agregan NTPs sin marcar y DNA polimerasa.

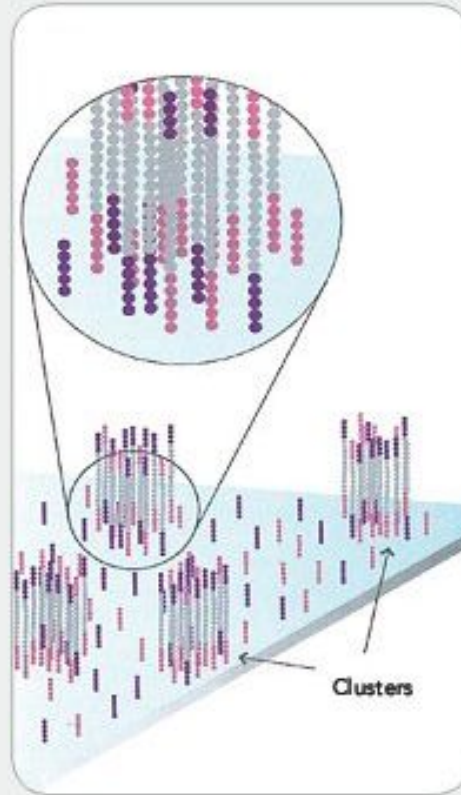
Comienza la amplificación en puente

5. DENATURE THE DOUBLE-STRANDED MOLECULES



Denaturation leaves single-stranded templates anchored to the substrate.

6. COMPLETE AMPLIFICATION

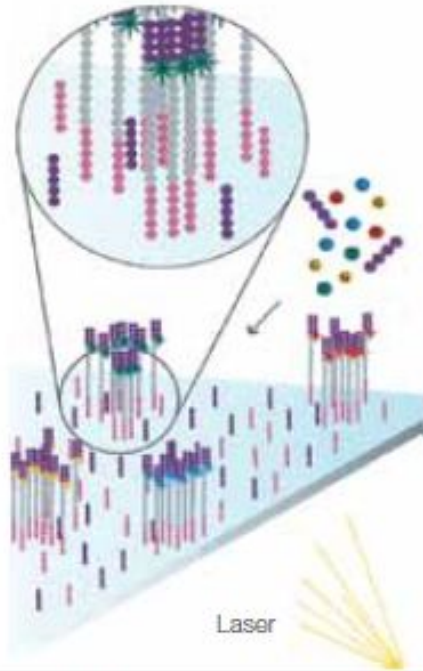


Several million dense clusters of double-stranded DNA are generated in each channel of the flow cell.

Se denatura el DNA y se vuelve a realizar la amplificación puente.

Se han generado millones de Clusters en la placa.

Figure 8: Determine First Base



The first sequencing cycle begins by adding four labeled reversible terminators, primers, and DNA polymerase.

Se agregan los dNTPs, cada uno posee un fluoróforo de color particular:
G - Amarillo.
C - Azul
A - Rojo
T - Verde

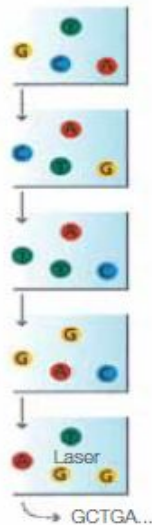
Figure 9: Image First Base



After laser excitation, the emitted fluorescence from each cluster is captured and the first base is identified.

Se excita con un láser y se captura una imagen.
La imagen capturada en una posición específica corresponde al primer nucleótido

Figure 12: Sequencing Over Multiple Chemistry Cycles



The sequencing cycles are repeated to determine the sequence of bases in a fragment, one base at a time.

Los ciclos de secuenciación se repiten hasta determinar la secuencia del templado, una base a la vez.



Irvine, California, Estados Unidos

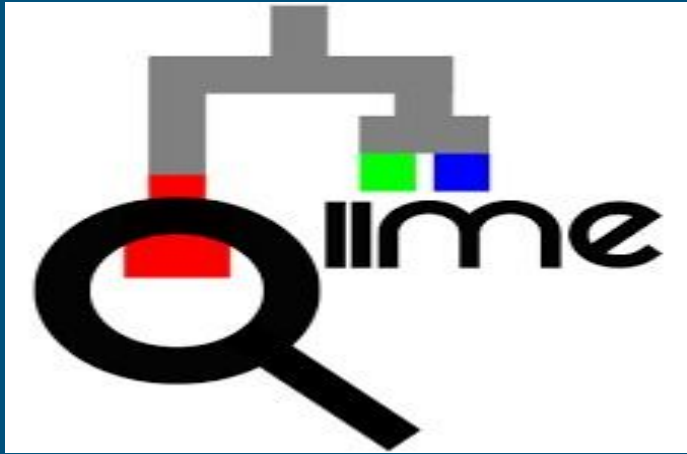


Análisis Bioinformático



Tomado de: <https://github.com/benjjneb/dada2/issues/352>

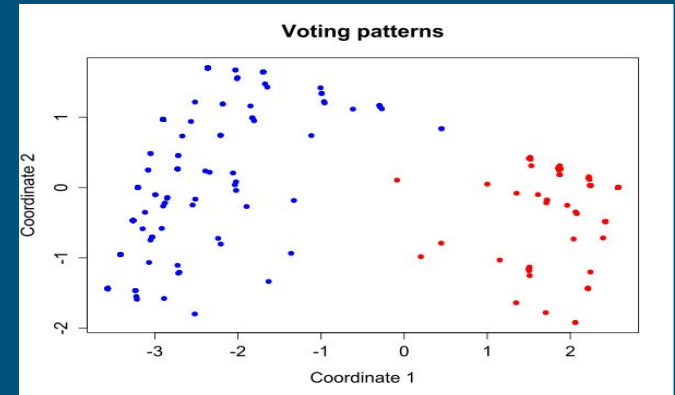
1. Filtrar y recortar
2. Dereplica
3. Aprende las tasas de error
4. Infiere la composición de muestra
5. Combina lecturas emparejadas
6. Hace tabla de secuencia
7. Elimina quimeras



Tomado de <https://www.milanuncios.com/software/instalacion-y-configuracion-de-qiime-2-241561118.htm>

- Realiza un control de calidad sobre las lecturas de secuenciación de entrada
- Agrupa las secuencias de nucleótidos del gen marcador a un nivel filogenético solicitado
- Taxonómicamente los anota buscando secuencias similares en una base de datos de referencia

Otras herramientas...
Cálculos de rarefacción , diversidad alfa y diversidad beta ,
visualizaciones como análisis de coordenadas principales.



Tomado de : https://en.wikipedia.org/wiki/Multidimensional_scaling

Resultados y discusión



ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE AGUA

Muestra	Caño Salado (A1)	Caño Dago (A2)	Caño Navío (A3)	Caño Muerto (A4)	Desembocadura río Sinú-Tinajones (A9)
Temperatura	28°C	30°C	30°C	30°C	28°C
pH	6	4	7	6	6

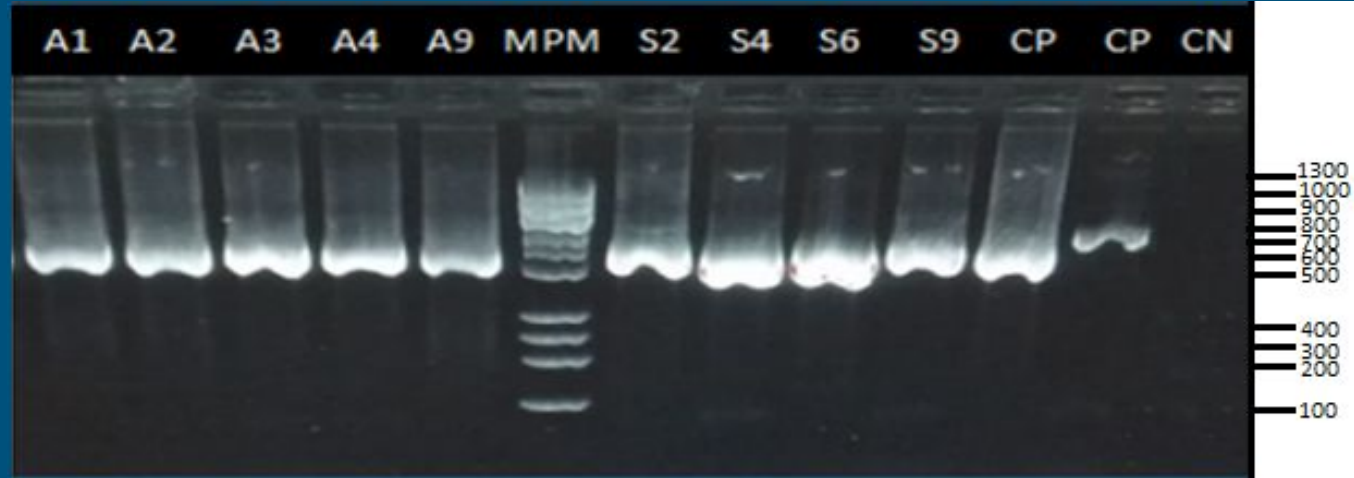
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE SEDIMENTO

Muestra	Caño Salado (S4)	Caño Dago (S2)	Caño Navío	Caño Muerto (S6)	Desembocadura río Sinú-Tinajones (S9)
Temperatura	28°C	30°C	30°C	30°C	28°C
PH	6	4	7	6	6

Electroforesis productos de PCR

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con GelGreen® Nucleic Acid Gel Stain y corrido en buffer TAE 1X.

Voltaje 110V,
Tiempo 30 minutos.



Muestra de agua.

A1:Caño Salado, A2: Caño Dago, A3:
Caño Navío, A4: Caño Muerto, A9:
Desembocadura río Sinú-Brazo Tinajones.

MPM: Marcador de peso molecular (100
bp DNA Step Ladder)

S: Muestra de sedimento.

S2: Caño Dago, S4: Caño Salado, S6:
Caño Muerto, S9: Fondo
Desembocadura río Sinú-Tinajones,
CP: Control positivo (Paecilomyces y
Mucor), CN: Control negativo (H2O
destilada).

Cuantificación de ADN

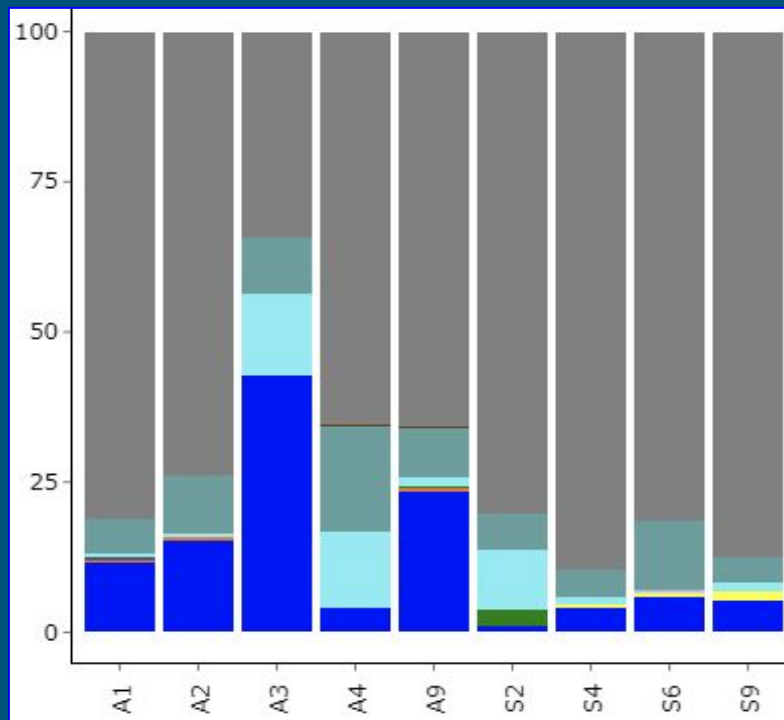
Muestra	Concentración ng/ μ l	260/280	260/230
S2	36	1,51	0,81
S4	46,1	4,28	1,03
S6	19,2	1,6	1,36
S9	32,5	1,43	1,15
A1	103,7	1,44	0,66
A2	65,1	1,45	0,72
A3	98,6	1,55	1,01
A4	56,7	1,59	0,58
A9	118,9	1,5	0,58

A1: Caño Salado
A2: Caño Dago
A3: Caño Navío
A4: Caño Muerto
A9: Desembocadura río
Sinú-Brazo Tinajones

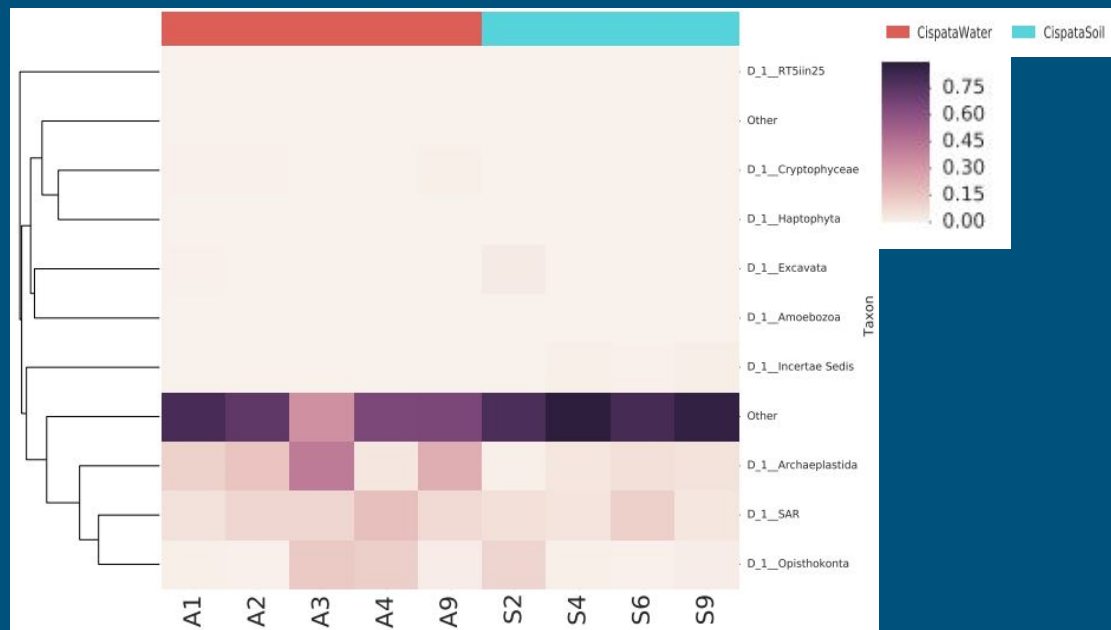
S2: Caño Dago
S4: Caño Salado
S6: Caño Muerto
S9: Fondo Desembocadura
río Sinú-Tinajones

Muestra	Secuencias crudas	Secuencias recortadas	Análisis DADA2	Secuencias quiméricas	Secuencias libres de secuencias quiméricas	Secuencias después de la filtración de tamaño	Secuencias únicas	OTUs
A1	110688	110114	53853	613	53240	51766	473	235
A2	89866	89388	43954	250	43704	43006	267	140
A3	122134	121442	59910	88	59822	58961	355	194
A4	139102	138376	67585	170	67415	66051	527	285
A9	135524	134834	66233	623	65610	64283	501	282
S2	256362	255016	125489	622	124867	122360	777	464
S4	163138	162178	78460	2974	75486	70236	888	585
S6	155338	154508	74459	3189	71270	68050	899	591
S9	130374	129672	61109	4411	56698	54169	824	547
TOTAL	1302526	1295528	631052	12940	618112	598882	5511	3323

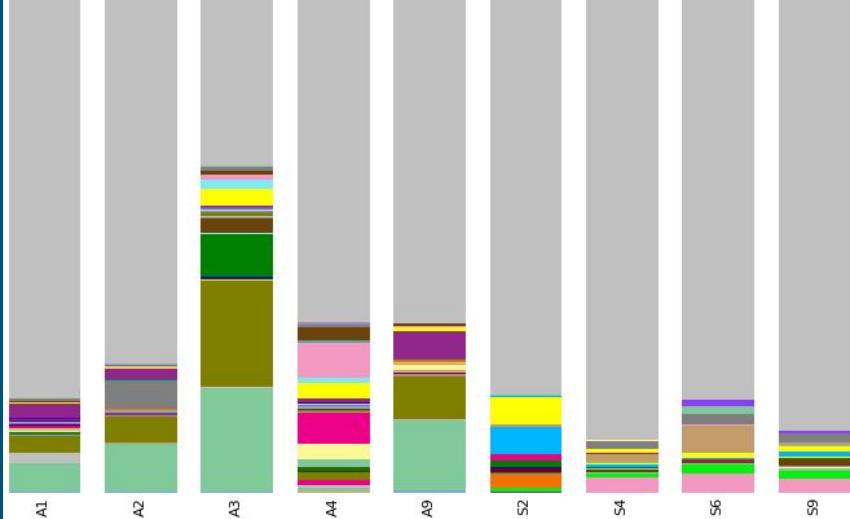
Gráfica, mapa de calor y tabla de composición a nivel de filo



Unassigned;Other
D_0__Eukaryota;D_1__Archaeplastida
D_0__Eukaryota;D_1__SAR
D_0__Eukaryota;D_1__Opisthokonta



		Total	A1	A2	A3	A4	A9	S2	S4	S6	S9
Legend	Taxonomy	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	Unassigned, Other	73.2%	81.1%	73.9%	34.1%	65.5%	65.8%	80.1%	89.4%	81.3%	87.5%
	Archaeplastida	12.6%	11.5%	15.4%	42.6%	4.2%	23.4%	0.9%	4.0%	6.0%	5.3%
	SAR	8.6%	5.8%	9.7%	9.4%	17.7%	8.2%	6.1%	4.7%	11.7%	4.1%
	Opisthokonta	4.7%	0.8%	0.4%	13.8%	12.4%	1.7%	9.9%	1.0%	0.5%	1.6%

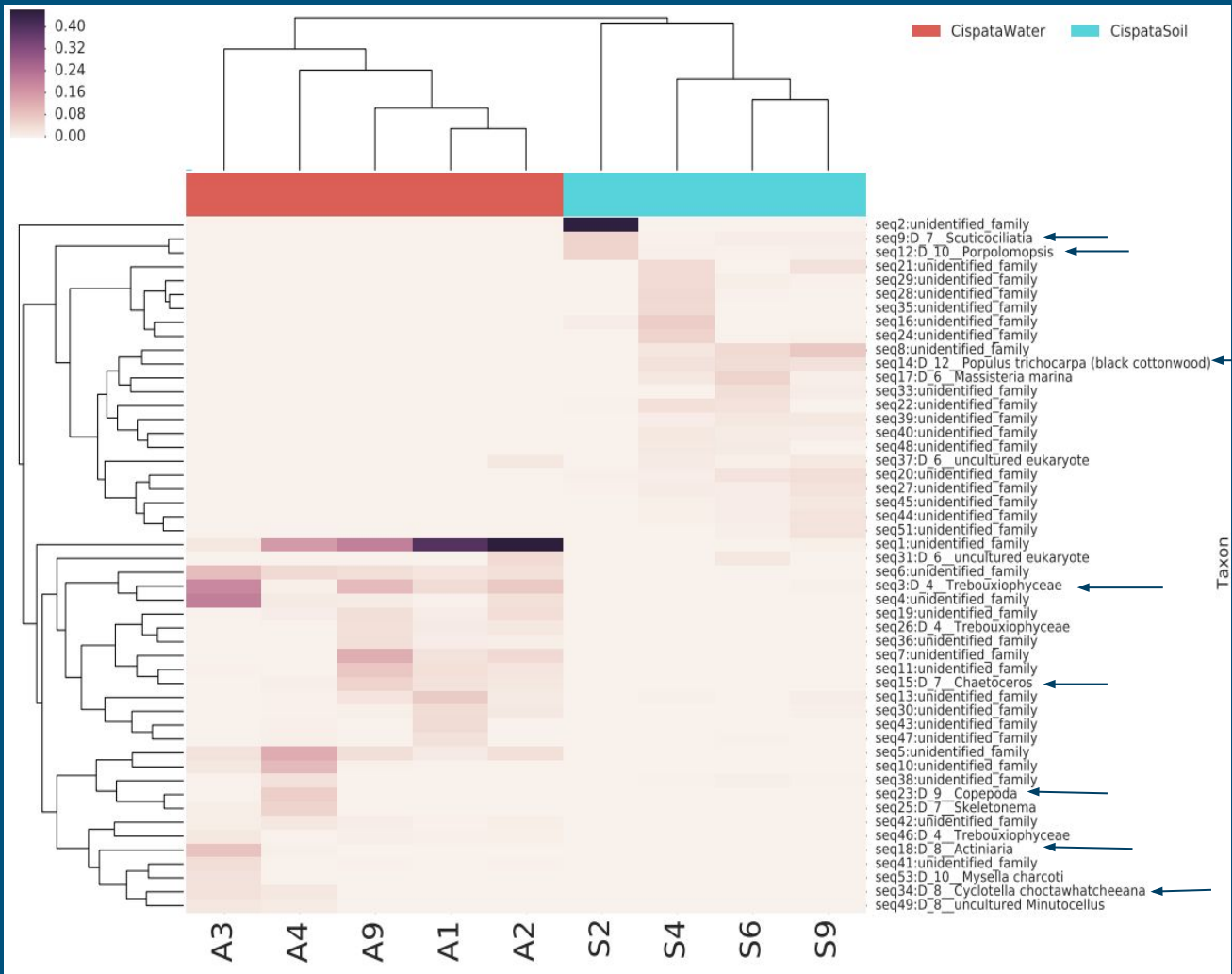


Gráfica y tabla de composición a nivel de género

A1: Caño Salado
 A2: Caño Dago
 A3: Caño Navío
 A4: Caño Muerto
 A9: Desembocadura río Sinú-Brazo Tinajones
 S2: Caño Dago
 S4: Caño Salado
 S6: Caño Muerto
 S9: Fondo Desembocadura río Sinú-Tinajones

	Total	A1	A2	A3	A4	A9	S2	S4	S6	S9	
Legend	Taxonomy	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
	Unassigned, Other	73.2%	81.1%	73.9%	34.1%	65.5%	65.8%	80.1%	89.4%	81.3%	87.5%
	<i>Trebouxiophyceae</i>	5.7%	5.7%	9.7%	20.9%	0.7%	13.9%	0.0%	0.0%	0.1%	0.5%
	<i>Chlorophyta</i>	4.5%	3.5%	5.4%	21.3%	1.6%	8.7%	0.0%	0.0%	0.1%	0.2%
	<i>Populus</i>	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.0%	3.9%	2.9%
	<i>Chaetoceros</i>	1.3%	2.9%	2.2%	0.3%	0.7%	5.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	<i>Cyclotella</i>	0.9%	0.4%	0.3%	3.3%	3.1%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	<i>Scuticociliatari</i>	0.9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	5.5%	0.3%	1.0%	1.0%
	<i>Actinaria</i>	1.0%	0.0%	0.0%	8.6%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	<i>Porpolomopsis</i>	0.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	5.4%	0.4%	0.3%	0.7%
	<i>Copepoda</i>	0.7%	0.0%	0.0%	0.1%	6.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Mapa de calor a nivel de género



Trebouxiophyceae

5.7 %



<https://www.taxateca.com/images/dominioeukaryota/Reinoplantae/filochlorophyta/clasetrebouxiophyceae/Oocystis2.jpg>

Chloroplast phylogenomic analysis resolves deep-level relationships within the green algal class Trebouxiophyceae

Claude Lemieux, Christian Otis, and Monique Turmel

Biocombustibles

Secuestro biológico de CO₂

Tratamiento de aguas residuales

Como aditivo alimentario y para acuicultura

Populus

Álamos y Sauces del Estado de Aguascalientes

* Biól. Margarita Elia de la Cerda Lemus

1.1 %



Madera

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7d/Populus_trichocarpa_05897.JPG

Chaetoceros



1.3 %

http://oceandatacenter.ucsc.edu/PhytoGallery/images_AM/diatom/chaeto_sized.jpg

A Comparison of Morphological and Molecular-Based Surveys to Estimate the Species Richness of *Chaetoceros* and *Thalassiosira* (Bacillariophyta), in the Bay of Fundy

Sarah E. Hamsher, Murielle M. LeGresley, [...], and Gary W. Saunders

Production of Biodiesel from Lipid of Phytoplankton *Chaetoceros calcitrans* through Ultrasonic Method

Raymond Kwangdinata, Indah Raya, and Muhammad Zakir

Lípido: 16.4% en peso seco de biomasa

Cyclotella



0.9 %

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/05/Cyclotellameneghiniana.jpg/290px-Cyclotellameneghiniana.jpg>

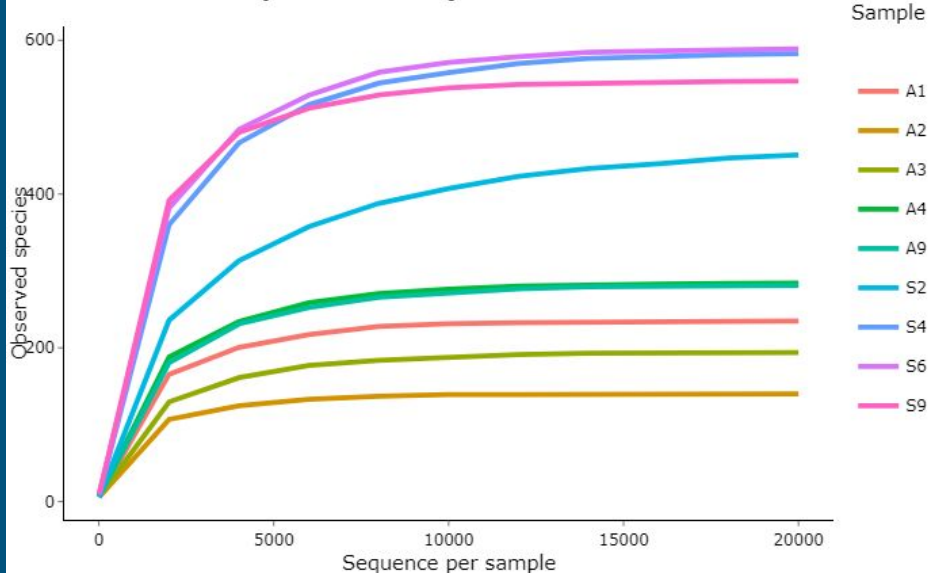
Screening of Diatom Strains and Characterization of *Cyclotella cryptica* as A Potential Fucoxanthin Producer

Bingbing Guo, Bin Liu, [...], and Feng Chen

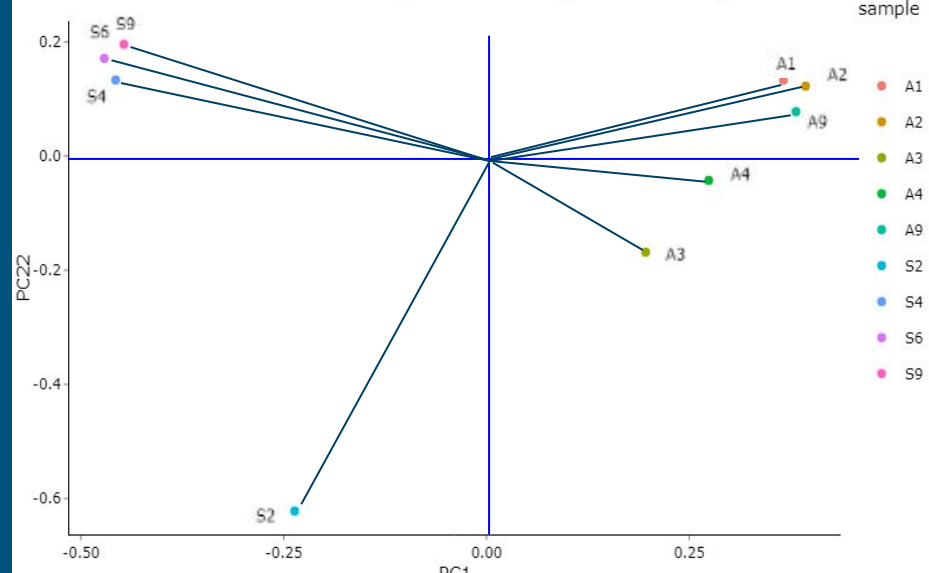
Carotenoide específico no provitamínico A

Previene la obesidad y la diabetes.
Anticancerígeno, antialérgico, antiinflamatorio, antioxidante, y actividades anti osteoporóticas.

Alpha Diversity Rarefaction Plot



Beta Diversity PCoA Plot (PC1 vs PC2)



OTU:
 S6: 589
 S4: 582
 S9: 546

S6: Caño Muerto
 S4: Caño Salado
 S9: Fondo
 Desembocadura río
 Sinú-Tinajones

S2: Caño Dago
 S4: Caño Salado
 S6: Caño Muerto
 S9: Fondo
 Desembocadura río
 Sinú-Tinajones

A1: Caño Salado
 A2: Caño Dago
 A3: Caño Navío
 A4: Caño Muerto
 A9: Desembocadura
 río
 Sinú-Brazo Tinajones

ANÁLISIS DE METALES PESADOS AGUAS

Metal	Unidad	Caño Salado	Caño Dago	Caño Navío	Caño muerto
Cadmio	mg/L Cd	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Cromo	mg/L Cr	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
Mercurio	mg/L Hg	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Plomo	mg/L Pb	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Zinc	mg/L Zn	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050

0.05
mg/L

0.001
mg/L

0.025
mg/L



Espectroscopia de absorción atómica

Absorción de radiación de una longitud de onda determinada

Efectuar una transición en los átomos del elemento analizado.



Interpretar

Temperatura (combustión) y así se favorezca la formación de átomos a partir de los componentes en solución.

Separe la radiación de longitud de onda de interés

Transforma las señales de intensidad de radiación electromagnética, en señales eléctricas

Conclusiones

- El estudio metagenómico de las muestras de sedimento de la bahía de Cispatá, San Antero, Córdoba, mostró una alta diversidad eucariota, con la presencia de los supergrupos como *Archaeplastida*, *SAR* y *Opisthokonta*, donde la mayor abundancia fue la de *Archaeplastida*, que incluye las plantas superiores y las algas verdes y pardas.
- Se pudo observar diferentes filos, géneros y especies en las muestras de agua, esto evidenciando que a pesar de las condiciones salobres y cambios en el pH que presentan las cinco fuentes de agua analizadas, pueden convertirse en el hábitat de muchas especies de algas, diatomeas, protistas, tales como los pertenecientes al grupo *Archaeplastida*, *SAR* y *Opisthokonta*, los más relevantes dentro de este estudio.

- Se logró comparar por análisis estadístico la diversidad microbiana de las cinco zonas de manglar, los resultados obtenidos en las diferentes zonas estudiadas demuestra que los sedimentos presentan una mayor diversidad que las aguas, y que la zona con mayor intervención antropogénica ha sido ampliamente afectada en su diversidad, disponibilidad de nutrientes, entre otros.

- Es importante resaltar el alto número de OTU sin identificar, esto debido a la poca investigación, tanto de microbiología clásica como de biología molecular, de eucariontes en manglares, por lo tanto, la información en las bases de datos es insuficiente y dificulta la determinación taxonómica de las mismas.

Limitaciones y perspectivas

Limitaciones

No identificación de OTUs encontradas en mayor proporción, es pertinente generar nuevas búsquedas en bases de datos alternas como ENA (European Nucleotide Archive), o bases de datos específicas para metagenomas como la Metagenomic Rapid Annotations (MG-RAST) o Taxonomer.

También influye en los resultados la poca información existente sobre los organismos del ecosistema

Perspectivas

Posterior al registro de los metagenomas en las respectiva bases de datos se espera poder ahondar en análisis de metales en los microorganismos eucariotas, además de la aplicación de estos en temas relacionados con la bioprospección.

Participaciones




Nado Bogotá Cnd.
17 años

XVII ENCUENTRO REGIONAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN

Inclusión y Equidad en la Investigación Formativa




LUGAR: FUNDACIÓN UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COLOMBIA **FECHA:** 8-10 MAYO



XXII ENCUENTRO NACIONAL Y XVI INTERNACIONAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN

Valledupar del 8 al 12 octubre de 2019




Semana de Internacionalización

Jornada de Investigación Formativa del Programa - Grupos de Investigación
Mayo de 2019

Referencias Bibliográficas

1. Colombia. Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. Manglares. minambiente [internet]. 2016 [Citado 06 de mayo de 2018]. Disponible en:
<http://www.minambiente.gov.co/index.php/bosques-biodiversidad-y-servicios-ecosistematicos/ecosistemas-estrategicos/manglares>
2. Santos HF, Juliano CC, Carmo FL, Rosado AS, Peixoto RS, 18S rDNA Sequences from Microeukaryotes Reveal Oil Indicators in Mangrove Sediment. Plos One [internet].2010 [Citado 23 de febrero de 2018];5(8). Disponible en:
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012437>.
3. Thompson CE, Beys-da-Silva WO, Santi L, Berger M, Vainstein MH, Guima Rães JA, et al. A Potential Source for Cellulolytic enzyme discovery and environmental aspects Revealed Through Metagenomics of Brazilian mangroves. SpringerOpen Journal [internet]. 2013 [Citado 23 de febrero de 2018];3. Disponible en:
<https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/2191-0855-3-65>
4. Pachiadaki MG, Rédou V, Beaudoin DJ, Burgaud G, Edgcomb VP. Fungal and prokaryotic activities in the marine subsurface biosphere at the Peru margin and Canterbury basin inferred from RNA based analyses and microscopy. Frontier in microbiology [internet] 2016 [Citado 23 de febrero de 2018]; vol 7 (846).

AGRADECIMIENTOS

