CONVENIO INTERADMINISTRATIVO No. 500 de 2020 (20-117 IAvH)

AGENCIA NACIONAL DE HIDROCARBUROS – ANH Y EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT -IAvH

Producto 3.3: Memorias del curso teórico Metabarcoding-Microorganismos

Producto 3.4 Memorias del Curso teórico - demostrativo Metabarcoding-Microorganismos

AGENCIA NACIONAL DE HIDROCARBUROS – ANH Y EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT -IAvH

FECHA: 24 - 27 DE NOVIEMBRE DE 2020

AUTORES: EDUARDO TOVAR…

Tabla de contenidos

I. Justificación del Curso

II. Objetivo de la capacitación

III. Desarrollo de la sesión

IV. Preguntas frecuentes

V. Reflexiones del proceso
(incluir info que se destaque en las evaluaciones)

VI. Conclusiones

VII. Recomendaciones futuras

VIII. Anexos:
- Presentaciones
- Listados de asistencia
- Infografías **

I. Justificación

En Colombia son pocas las instituciones con capacidades instaladas para realizar el levantamiento de líneas base y el monitoreo de la biodiversidad mediante el uso del metabarcoding. A pesar de que la secuenciación del ADN ambiental (o eDNA por sus siglas en inglés) de microorganismos se utiliza cada vez más como una alternativa a la identificación tradicional basada en morfología para caracterizar conjuntos biológicos y monitorear los impactos antropogénicos en los ecosistemas. Es por esta razón que se considera necesario el fortalecimiento de las capacidades asociadas a la captura y análisis de datos así como el monitoreo de la biodiversidad a partir de metabarcoding.

Esta capacitación estuvo dirigida a autoridades ambientales (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible -MADS, Autoridad Nacional de Licencias Ambientales -ANLA y Corporaciones Autónomas Regionales), empresas de hidrocarburos y consultoras que participarán de los Proyectos Piloto de Investigación Integral -PPII. Esto de manera que a futuro las métricas de diversidad a partir de metabarcoding puedan ser incorporadas en la toma de decisiones del sector de hidrocarburos sin inconvenientes por falta de capacidades de las diferentes instituciones.

II. Objetivos

Compartir conocimiento técnico sobre el metabarcoding a partir del entendimiento de los conceptos básicos sobre el uso de herramientas genéticas y el ADN ambiental para estudiar comunidades microbianas, el diseño experimental y los flujos de trabajo, con ejemplos relevantes y casos de estudio aplicados a la biodiversidad. Dirigido a las organizaciones que participarán de los Proyectos Piloto de Investigación Integral -PPII.

III. Desarrollo del curso

1. Primer día – 24 de noviembre

1.1. Presentación: **Bienvenida**
Ponente: **Francisco José Gómez**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

El presente curso se realiza dentro de las actividades planteadas por el Instituto ante la solicitud del Gobierno de aportar información sobre los impactos que puedan generar la exploración de hidrocarburos por métodos no convencionales, con el fin de apoyar la toma de decisiones. Esta información debe estar circunscrita y evaluada en el contexto colombiano, con sus características geográficas, de riqueza natural, culturales, etc. Por esta razón se plantean los Proyectos de investigación que faciliten al estado la toma de decisiones más apropiadas y beneficiosas para el país. Dentro de estos, una propuesta innovadora para generar conocimiento en torno a este tema, ha sido el uso del metabarcoding, que permite generar gran cantidad de información de manera costo-efectiva y en corto tiempo. Esta técnica es una herramienta poderosa que, junto con la experiencia que ha desarrollado el Instituto sobre ésta durante los últimos años, se espera que su implementación permita soportar y argumentar las decisiones que se tomen con base en los resultados obtenidos en las diferentes pilotos.

1.2. Presentación: **Introducción a la agenda del curso, objetivos y resultados esperados. Presentación de instructores y participantes.**
Ponente**:** **Paola Pulido-Santacruz**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

El objetivo del curso fue presentar conceptos básicos sobre el uso de herramientas genéticas para estudiar comunidades microbianas. La aplicación de estas herramientas comprende la elaboración de un diseño experimental, un flujo de trabajo en biología molecular, un proceso de secuenciación de ADN, y finalmente análisis bioinformáticos y ecológicos. Se presentaron diferentes estudios de caso para un mejor entendimiento de las herramientas. Durante el curso también se presentaron videos demostrativos donde se explican los diferentes procedimientos para la toma de muestras

en campo y su procesamiento en laboratorio. (En la charla se explican diferentes pautas para el desarrollo del curso y culmina con la presentación de todos los asistentes al curso).

1.3. Presentación: **Microorganismos y el medio ambiente**
Ponente**:** **Alejandro Salazar**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

Los microorganismos constituyen un grupo muy abundante, diverso, ubicuo y antiguo. Si la historia del planeta se resumiera en 12 horas, el hombre habría aparecido en los últimos 2 segundos (0.2 millones de años); las plantas, en la última hora con 45 minutos (670 millones de años); todos los animales, en las últimas 2 horas (760 millones de años); y los microorganismos, en las últimas 11 horas con 35 minutos (4.000 millones de años). De igual forma, se estima que existen más bacterias que estrellas en el universo, y que su biomasa, sin incluir otros microorganismos, es 1.166 veces mayor que la de los humanos en todo el mundo. La mayoría de la biomasa de los microorganismos se encuentra en los subsuelos, aunque pueden encontrarse en todos los ambientes, desde la troposfera hasta el suelo oceánico a más de 5.700 m. de profundidad.

En cuanto a diversidad, una cucharada de suelo puede contener más de 1.000 millones de bacterias que representan más de 53.000 especies. Aunque los microorganismos no son apreciables a simple vista, juegan un papel imprescindible en nuestras vidas. Aproximadamente el 50% del oxígeno en la atmósfera es producido por microalgas. Son esenciales en el reciclaje de elementos, transformando materia. Son reguladores de las condiciones climáticas. Adicionalmente, son importantes en el control de patógenos, en la degradación de contaminantes, y como bioindicadores de impacto ambiental, entre otros. Es fundamental conocer y entender cómo los procesos microbianos impactan en la vida del hombre y los ecosistemas para poder incorporar todo ese conocimiento en la toma de decisiones.

Caso de estudio: efecto de los metales pesados en comunidades microbianas. Uso de los microorganismos como índices para diagnóstico de contaminación.

1.4. Presentación: **Qué es el ADN ambiental, historia, limitaciones, flujo de trabajo en estudios con ADN ambiental y métodos (metabarcoding, metagenómica)**

Ponente: **Paola Pulido-Santacruz**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

El conocimiento de la biodiversidad es incompleto o no está descrito para numerosos grupos biológicos y regiones geográficas. Los esfuerzos de conservación dependen esencialmente del monitoreo biológico en el espacio y el tiempo. Tradicionalmente este seguimiento se ha basado en la identificación física de las especies, de acuerdo a sus características morfológicas. Sin embargo, esto se dificulta por la similitud de algunas especies, la plasticidad fenotípica, etc. Igualmente, estas técnicas generalmente son invasivas y dependen de la experiencia y conocimiento de las personas que lo realizan. Esto requiere enfoques alternativos, como el monitoreo a partir del ADN ambiental, el cual se basa en la presencia de ADN de una gran diversidad de organismos en el ambiente. Además de los microorganismos están las especies que interactúan con el ambiente y dejan un rastro (pelos, escamas, excrementos, etc.). Una muestra de ADN ambiental está compuesta de material genético intracelular y extracelular, este último como resultado de la muerte de las células que liberan su contenido al ambiente. Las decisiones involucradas en un estudio de metabarcoding se centran en qué (agua, suelo, sedimentos, etc.), y cómo (metabarcoding, metagenómica, metatranscriptómica, etc.) se puede realizar el muestreo. El metabarcoding permite la identificación de los diferentes taxones presentes en la muestra, a través del uso de cebadores (*primers*) específicos en el ADN extraído, que permiten multiplicar una región genética determinada, usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), las cuales son posteriormente secuenciadas. Por su parte, con la metagenómica se realiza la caracterización funcional de las comunidades microbianas, y no involucra un paso de PCR, sino que el ADN extraído es secuenciado directamente. Estas dos técnicas necesitan el uso de base de datos de referencia para su análisis. El flujo de trabajo en estudios con ADN ambiental comprende: un diseño experimental, muestreo en campo, extracción de ADN, amplificación y/o secuenciación del ADN, análisis bioinformático (metagenómica, metabarcoding, ID de especies individuales), e interpretación biológica. Aplicaciones metabarcoding: reconstrucción de ecosistemas antiguos, detección de especies invasoras, interacciones planta polinizador, monitoreo de contaminación, etc. Las principales limitaciones del ADN ambiental: errores en la PCR o secuenciación, bases de datos de referencia incompletas, no permite una estimación precisa del número de organismos en la muestra.

1.5. Presentación: **ADN ambiental como herramienta de monitoreo**

Ponente**:** **Mailyn González**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

El metabarcoding es una herramienta basada en ADN ambiental para la caracterización y monitoreo de la biodiversidad, y se deriva de la técnica de códigos de barras de ADN (barcoding) para caracterización de especies individuales. Los códigos de barras de ADN corresponden a una o varias secuencias genéticas conservadas que permiten atribuir, a través de bases de datos de referencia, una identificación taxonómica a una muestra biológica de manera rápida, estándar y objetiva. Los estudios de biodiversidad tradicionales encuentran limitaciones cuando se analizan ciertos grupos como por ejemplo insectos y hongos, o los organismos microscópicos; o cuando se encuentran en diferentes estadios de vida (huevos, larvas, pupas, etc.). El barcoding es una herramienta útil para superar esas limitaciones. La técnica se basa en las distancias genéticas entre las especies, de tal forma que la región genética, conservada para todos los organismos, presente una mayor divergencia entre especies que dentro de éstas. Esta técnica requiere bases de datos de referencia que deben ser construidas con el conocimiento de taxónomos expertos, de tal forma que se requiere de registros muy bien identificados. En el caso de los códigos de barras de ADN existe la base de datos de referencia pública Barcode of Life Data System (BOLD), la cual posee actualmente alrededor de 9 millones de registros que representan más de 300 mil especies.Las diferentes iniciativas a nivel mundial alimentan las bases de datos de referencia. En el caso de Colombia, esta participa en la red mundial BIOSCAN que reúne instituciones de más de 30 países. A nivel local se estableció la red iBOL Colombia que involucra la participación de expertos de alrededor de 20 instituciones del país. El metabarcoding es una técnica que a través de la amplificación y secuenciación del ADN ambiental permite la identificación de unidades taxonómicas (~especies). A diferencia del barcoding las regiones identificadas son más cortas, por la fragmentación del ADN en el ambiente y por la técnica de secuenciación usada. Las secuencias obtenidas se agrupan por similitud en OTUs (Operational Taxonomic Units) y a estas se les busca su correspondencia taxonómica en bases de datos de referencia. Las regiones genéticas a usar para metabarcoding por grupo biológico son: 16S arqueas y bacterias, y 18S eucariotas. La precisión taxonómica generalmente llega a orden o familia. La información generada en este tipo de estudios es altamente depurada, de tal forma que puede llegarse a descartar cerca del 90%, pero esto garantiza información de mucha mayor calidad. *Estudios de caso*: estudios genéticos realizados en paralelo con los tradicionales han permitido generar modelos predictivos de calidad de agua. Estudios de contaminación por hidrocarburos con base en información de eucariotas con 18S han permitido identificar taxas como bioindicadores

1.6. Presentación: **Estudio de caso: "evaluación del microbioma endófito de plantas comerciales y silvestres del banano frente a la aplicación de la PGPR EA-CB0575" & Unidad de servicios de secuenciación U-EAFIT**

Ponentes: **Javier Correa, Juan Sebastián Solano**
Institución: Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

Resumen

Trabajo preliminar orientado al entendimiento de las dinámicas de las comunidades microbianas en el banano, para la búsqueda de soluciones al sector agrícola desde un punto de vista más amigable con el ambiente. El banano es el tercer producto agrícola más importante de exportación en Colombia. Este cultivo se ve afectado por patógenos como la "Sigatoka negra", "Moko del plátano", y "Fusarium", los cuales amenazan la productividad. Adicionalmente, se prevé que el cambio climático incide negativamente, aumenta el impacto de estas enfermedades. Se ha encontrado que la variedad silvestre no comercial Calcutta 4, posee resistencia a diferentes patógenos. Esta variedad se reproduce sexualmente lo que favorece la diversidad genética en su acervo.

De acuerdo a esto, ¿existe una diversidad diferencial entre la microbiota de la variedad Calcutta 4 y la comercial, que se asocie a la resistencia de los patógenos? El primer paso es estudiar las variedades ancestrales con el propósito de entender el rol de los microorganismos en la evolución y el proceso de domesticación de éstas, que podrían permitir transferir esa microbiota a las variedades comerciales. Por lo anterior, se buscó evaluar y estimar la diversidad de microorganismos endófitos presentes en las diferentes estructuras de la planta del banano (raíces, pseudotallo y hojas), tanto en el comercial como el no comercial. Para ello se realizó un estudio metagenómico de la microbiota, usando el gen 16S completo para bacterias y la región ITS para hongos. Se encontró una gran diversidad de microbiota en las dos variedades, de la cual mucha no había sido reportada anteriormente, en donde el género más abundante fue el *Bacillus*. No se encontró diferencia significativa entre la microbiota de las dos variedades en invernadero. Sin embargo, a nivel de tejidos, la raíz presenta una composición de microbiota muy diferente a la de hojas y pseudotallos, la cuales presentaron resultados muy similares entre sí. Igualmente, se observó que cuando las plantas son afectadas por patógenos la composición de la microbiota cambia.

El Centro de Genómica y Biología Computacional de la EAFIT tiene como objetivo desarrollar y aplicar soluciones basadas en la secuenciación de genomas y la bioinformática, tanto a la industria como a la investigación. Entre las tecnologías disponibles se encuentra la plataforma de secuenciación masiva iSeq 100 de Illumina. También cuenta con 3 secuenciadores MinION de la

compañía Oxford Nanopore. En cuanto a la capacidad de cómputo el centro cuenta con 49 servidores (APOLO). Dentro del portafolio de servicios se encuentra el análisis de comunidades microbianas en 5 regiones del gen 16S, secuenciación y análisis de genomas procariotas, eucariotas y virales, secuenciación y análisis de amplicones y tiempo de cómputo en el servidor.

1.7. Presentación: **Hongos: más allá de simples champiñones. Aproximaciones tecnológicas para el estudio de diversidad fúngica**

Ponente: **Marcela Guevara Suárez**
Institución: Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Resumen

La primera asociación general sobre los hongos es que son especies comestibles. Sin embargo, a nivel de los macromicetos (hongos visibles a simple vista) existe una gran diversidad, muchos de los cuales están relacionados a la biotecnología. Pero donde existe una diversidad mucho mayor, generalmente subestimada, es a nivel de los hongos microscópicos o microhongos. El número de especies ha ido incrementando año tras año, debido principalmente al uso de herramientas moleculares, las cuales permiten superar las limitaciones de la taxonomía clásica, donde la agrupación se realiza con base en la morfología. Estos microhongos aunque no son apreciables tienen grandes impactos en la sociedad. Estos se encuentran dentro del phyllum Ascomycota que puede contener más de 90.000 especies. Los microhongos están divididos en dos tipos: hongos filamentosos y hongos levarudiformes (unicelulares), los cuales se encuentran asociados a procesos de fermentación. La diversidad de estos hongos microscópicos se estima en 2.2 a 3.8 millones de especies, de los cuales no se conoce más del 5%. Más allá de la industria alimentaria (quesos, embutidos) los hongos han contribuido al desarrollo de productos farmacéuticos (antibióticos, enzimas, inmunosupresores), la biotecnología (biocombustibles, degradación de contaminantes) e incluso la industria del petróleo (biorremediación). En estudios de contaminación por hidrocarburos se ha observado que el contaminante era el principal factor que estructuraba no solo la rizosfera, sino también los microbiomas de los tejidos vegetales. En general, la diversidad de especies disminuyó a medida que aumentaba la contaminación. Esta información es importante para diseñar microbiomas vegetales, óptimos para la fitorremediación eficiente de la contaminación orgánica. Para estimar y caracterizar la diversidad fúngica, y microbiana en general, existen diferentes aproximaciones como la genómica (genes), la transcriptómica (ARNm), proteómica (proteínas), y metabolómica (metabolitos).

1.8. Presentación: **Environmental monitoring and assessment of aquatic systems using eDNA metabarcoding**

Ponente: **Anthony Chariton**
Institución: Macquire University, Sidney, Australia

Resumen

Los objetivos de un programa de monitoreo están enfocados a proporcionar evaluaciones científicas costo-efectivas; proteger comunidades acuáticas naturales saludables y delicadas; y apoyar la protección de la integridad química, física y biológica (atributos funcionales y estructurales. Adicionalmente, se busca proporcionar información útil y entendible a los usuarios finales (p. ej. tomadores de decisiones), generar confianza del público general en el comportamiento de la industria, y proporcionar a la industria elementos de soporte sobre el esfuerzo para proteger el ambiente. Desde una perspectiva ecológica lo que se busca es entender cómo cambian las comunidades en el espacio y en el tiempo; cómo reaccionan ante un contaminante, observando sus efectos a corto y largo plazo; y si los patrones de cambio pueden ser predecibles y cambiar en magnitud. Un programa de monitoreo no se basa en muestrear todos los organismos presentes en un ecosistema, sino en los más representativos (no los raros), que permitan obtener una visión general y reproducible del sistema. Todos los estudios tienen limitaciones, sin embargo, siempre hay compensaciones y hay que identificarlas, de tal forma que se logre la más alta precisión y exactitud en los resultados. Para el caso de monitoreo de macrobentos, con el sistema tradicional, existen muchas limitantes, como el alto costo, los largos tiempos para producir resultados, la necesidad de expertos taxónomos, la falta de descripción funcional de los ecosistemas, y la falta de detección de cambios pequeños, entre otros. La aproximación del monitoreo con ADN ambiental, a través del metabarcoding, permite, por otro lado, obtener información con mayor rapidez y eficiencia. En un estudio realizado en 5 estuarios de Australia se utilizó el gen 18S, para detectar cambios en la composición de las comunidades en respuesta a fluctuaciones de agentes físicos y químicos. Se observó que la riqueza de OTUs es mayor en sistemas contaminados, lo cual fue opuesto a lo esperado en un sistema de monitoreo tradicional. Sin embargo, lo que se encontró en este estudio con metabarcoding, es que la alta biodiversidad no es un indicio de la buena salud del ecosistema, sino el producto de la confluencia de diferentes tipos de agua residuales. De acuerdo a la composición de OTUs en cada sistema se puede detectar los que funcionan como bioindicadores, y así empezar a desarrollar modelos predictivos. Con los datos del metabarcoding se observó que los cambios en la estructura de las comunidades responden a variables ambientales y antropogénicas, que llevan a fluctuaciones en los nutrientes (fósforo, nitrógeno), pH, conductividad, turbidez, etc. Los datos del metabarcoding no solo permiten estimar el número de taxones, sino también la representación de las bacterias, a

partir de las cuales se puede inferir las funciones que realizan, de tal forma que cambios estructurales en las comunidades se reflejan en cambios funcionales. Los datos obtenidos a partir de 16S pueden ser usados para realizar inferencias funcionales, sin necesidad de realizar metagenómica. La temporalidad puede tener inconvenientes en el muestreo, de tal forma que no se detectan perturbaciones anteriores al momento del muestreo. Sin embargo, las bacterias dejan una huella en el sistema aún si el agente estresante ha desaparecido.

2. Segundo día – 25 de noviembre

2.1. Presentación: **Diseño experimental general**
Ponentes**:** **Bibiana Gómez, Lina Sánchez**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

El diseño de muestreo se puede definir como una combinación de estructura de diseño, estructura de tratamiento, y aleatorización, para responder una pregunta de investigación. Los estudios generalmente inician con observaciones a partir de las cuales se generan modelos e hipótesis que se desean comprobar, y para ello se necesita desarrollar un experimento o muestreo. Este último puede llevar a la obtención de nuevas observaciones, conformando así un ciclo de evaluación y monitoreo. El diseño de muestreo es una etapa del ciclo que surge de la necesidad de información para responder una pregunta o preguntas biológicas, planteadas en el estudio como hipótesis.

Transversal al diseño de muestreo se encuentra una etapa de la gestión de la información, que involucra el tipo de información generada y el lugar de almacenamiento. Las siguientes etapas del ciclo comprenden la recolección de los datos y metadatos, y el análisis e interpretación de éstos de acuerdo al diseño. La estadística inferencial juega un papel importante en el monitoreo por cuanto esta proporciona los métodos y procedimientos para deducir propiedades acerca de la población a partir de una muestra representativa. Existen dos elementos claves para obtener una muestra representativa y controlar la variación son la aleatorización (selección de la muestra) y la replicación (tamaño de la muestra). El objetivo es tratar de obtener datos con la mayor precisión y exactitud posibles con relación a la población total. Un factor importante en el diseño es la potencia de una prueba, que se define como la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando ésta es falsa. Una prueba estadística es buena si es pequeña la probabilidad de rechazar la hipótesis nula siendo verdadera, y grande la probabilidad de rechazarla siendo falsa. Igualmente es importante considerar la manera en que fueron obtenidos los datos, la naturaleza de la población de la que sacó la muestra, y la escala que se empleó. En resumen, las etapas de la

realización de un muestreo o experimento son: formulación de la pregunta, formulación de las hipótesis, formulación de predicciones, diseño del experimento, ejecución o toma de datos, análisis estadístico, e interpretación. En cuanto a las etapas o requisitos del experimento están: diseñar la línea base para conocer el rango de la variabilidad, definir las unidades experimentales, definir los tratamientos, definir el número de réplicas, definir la aplicación de los tratamientos, asignar los tratamientos a las unidades experimentales, definir el arreglo temporal y espacial de los tratamientos, y definir la variable respuesta. Los principios básicos del diseño de muestreo son: reducir la incertidumbre y evaluar el poder estadístico con la incertidumbre restantes, realizar una evaluación integral, y evaluar el impacto inmediato y el impacto potencial por acumulación en el tiempo y el espacio. Los sistemas biológicos se caracterizan por altos niveles de variación aleatoria que diluye las relaciones de interés, por lo tanto, los datos siempre incluyen error e incertidumbre. La realización de simulaciones es importante no se conoce la respuesta, eso permite realizar una mejor estrategia de muestreo.

2.2. Presentación: **Diseño experimental en metabarcoding**

Ponente**:** **Paola Montoya**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

Para el análisis de metabarcoding es imprescindible detectar la variación natural de las comunidades, y cuáles son los factores que afectan dicha variación. Para esto es importante definir la unidad de muestreo o experimental (parcela, transecto, organismo, etc.) que es donde se van a realizar las observaciones. En metabarcoding existen diferentes unidades de muestreo. Para suelos la unidad de muestreo más usada es la parcela, a partir de la cual se pueden tomar varias submuestras. Para estos casos se recomienda tomar más de una submuestra que puede ser de manera sistemática, aleatoria o agregada, de tal forma que al final la unidad de muestreo esté representada por una o dos muestras (dos mediciones). Para cuerpos de agua la unidad de muestreo son generalmente transectos y se recomienda que al menos se tomen 3 medidas o submuestras. Al final el resultado es una sola medición de la unidad de muestreo con una incertidumbre asociada. Cada submuestra representa una extracción de ADN, y cada extracción 3 amplificaciones de las regiones genéticas de interés (réplicas técnicas), esto con el fin de controlar el ruido o variabilidad introducido por otros factores. De esta forma, 1 unidad de muestreo con 3 réplicas biológicas, cada una de estas con 3 réplicas técnicas, para 3 grupos biológicos, va a representar 27 muestras para secuenciación. Para la amplificación de la región de interés generalmente se usan los cebadores (primers) 16S para bacterias y arqueas, ITS para hongos, y 18S para eucariotas. Por otro lado, la selección de los cebadores depende de la resolución

taxonómica (especie, género, familia, orden) a la que se desea llegar. Un cebador con mayor espectro o cobertura va a tener una menor resolución. Para el monitoreo se deben usar siempre los cebadores seleccionados desde el inicio del estudio para no introducir variación adicional, lo que no permitiría realizar comparaciones. El número de unidades muestrales va a depender del sistema donde se quiere realizar el análisis, mientras más heterogéneo sea este mayor número de unidades muestrales debería incluir el estudio., esto con el fin de determinar el efecto del factor de interés (p. ej. pH, oxígeno disuelto, fósforo, etc.). Una recomendación es realizar estudios piloto, que ayudan a definir a capturar el efecto del factor o variable de interés, y con ello estructurar un adecuado diseño de muestreo. Las simulaciones son igualmente útiles para este propósito. La preservación adecuada de las muestras antes de la extracción de ADN es esencial para no introducir variación que altere los resultados y comparaciones. Factores como temperatura, humedad, radiación UV y actividad enzimática afectan adversamente las muestras.

Existen diferentes maneras de preservar las muestras como el uso de hielo, soluciones de preservación, desecación, etc. Se recomienda realizar el procesamiento de las muestras dentro de las siguientes 24 horas. El uso de controles en las diferentes etapas del estudio es esencial para controlar el ruido de las técnicas u otros factores intrínsecos desconocidos, los cuales son eliminados de los análisis a través de la bioinformática. Entre estos están los controles de filtración del agua, de extracción de ADN, controles positivos con mezcla de ADN de organismos y cantidades conocidas, y blancos de secuenciación. La cantidad de controles puede representar entre el 10-20% del total de muestras del estudio.

2.3. Presentación: **Recolección y procesamiento de muestras de suelo, agua y sedimento en campo**

Ponente**:** **Maria Claudia González**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

Presentación del video demostrativo realizado por el Instituto que explica los diferentes pasos para la recolección y procesamiento en laboratorio de muestras de suelo, agua y sedimento. En el video se explican diferentes pautas para la toma, preservación y procesamiento de las muestras con el fin de reducir errores y posible contaminación.

2.4. Presentación: **Extracción de ADN ambiental para metabarcoding**

Ponente**:** **Paola Pulido-Santacruz**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

Presentación del video demostrativo realizado por el Instituto que explica los pasos y recomendaciones para la extracción de ADN ambiental en el laboratorio. Existen diferentes protocolos de extracción de ADN en los cuales varía la eficiencia en la recuperación de ADN y la remoción de inhibidores de la amplificación. No existe un protocolo único o estándar, se debe buscar el protocolo que se adecue a las necesidades y al objetivo del estudio. El ADN ambiental representa una mezcla compleja de material genético de muchos organismos diferentes y material celular. Este contiene tanto ADN extracelular (células muertas) como intracelular (células vivas, principalmente microorganismos). Con las técnicas de metabarcoding o metagenómica se aísla todo el ADN contenido en la muestra sin separación por grupos biológicos u organismos.

2.5. Presentación: **Comparativa de métodos y costos, mapeo de capacidades**

Ponente**:** **Nicolás Franco**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

El flujo de trabajo de metabarcoding comprende dos fases: la de campo (recolecta de muestras), y la de laboratorio (analítica). Sin embargo, antes de iniciar el trabajo se debe realizar el diseño del experimento. Para la fase de campo es importante garantizar la asepsia en la toma de muestras, para disminuir el riesgo de contaminación cruzada; y garantizar la cadena de frío o la preservación de la muestra, con el fin de mantener la composición microbiana del instante de la toma de la muestra, así como para evitar la degradación del ADN. Esta fase debe realizarse por personal capacitado. En la fase de laboratorio, igualmente se debe garantizar la asepsia en la manipulación de las muestras, materiales y equipos; mantener la preservación de las muestras hasta el momento de la extracción de ADN; llevar un registro de los procedimientos; e incluir controles. En el laboratorio se realiza el preprocesamiento de las muestras (filtración de muestras de agua, pesaje de muestras de agua y sedimentos), la extracción y amplificación del ADN, y la secuenciación, que generalmente se realiza a través de laboratorios externos especializados en ofrecer ese tipo de servicios. El preprocesamiento y la extracción de ADN de las muestras puede ser realizada en campo (*in situ*) en un área acondicionada para ello. Esto ayuda a mantener la integridad de la muestra en caso de no poder mantener las condiciones necesarias de preservación hasta la empresa o laboratorio donde finalmente serán procesadas.

Para la amplificación y secuenciación del ADN es importante realizar la correcta selección de los cebadores (16S bacterias, ITS hongos, y 18S eucariotas), e incluir réplicas técnicas y controles de PCR. Estos controles consisten en muestras que contienen todos los reactivos excepto ADN, los cuales ayudarán en la depuración de la información durante el análisis bioinformático. Posteriormente se realiza la preparación de librerías (etiquetación de productos de PCR) y secuenciación de las muestras, lo cual permite transformar la información molecular en datos o archivos de texto, que contienen la composición de las regiones de ADN amplificadas. La secuenciación puede ser realizada a través de diferentes plataformas, sin embargo, la más frecuente es la de Illumina, con capacidad de procesar gran cantidad de muestras y producir millones de datos en corto tiempo. Con los datos obtenidos en la secuenciación se realiza la fase de *procedimiento in silico* o bioinformática, que consiste en realizar los análisis de la información obtenida para organizarla, estructurarla y finalmente interpretarla durante los análisis ecológicos. Es fundamental que todos los procedimientos realizados en las diferentes etapas se articulen desde su concepción hasta los análisis finales.

3. Tercer día – 26 de noviembre

3.1. Presentación: **Procesamiento de muestras y análisis del ADN ambiental por metabarcoding**

Ponente**:** **Amaia Iribar**

Institución: Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS, Francia

Resumen

El ADN ambiental es ADN procedente de diferentes organismos extraído de muestras ambientales (p. ej. agua, suelo, polen, heces, etc.). El ADN recuperado en las muestras puede ser tanto extracelular como intracelular. A partir de este ADN se puede obtener información cualitativa, aplicando técnicas de laboratorio como qPCR y ddPCR, donde se estima el número de copias de un gen de un organismo; e información cuantitativa, como el caso del metabarcoding, que permite la detección de grupos taxonómicos presentes en la muestra. El metabarcoding es una técnica que permite la identificación de un pool de especies a través de un gen barcode. La aplicación más frecuente de esta técnica es el estudio rápido de la biodiversidad basado en el ADN ambiental. El metabarcoding comprende todas las etapas desde el muestreo en campo hasta la asignación taxonómica de las secuencias obtenidas. El trabajo se puede dividir en dos bloques: el *wetlab* o trabajo en laboratorio, y el *in silico* que involucra todos los análisis computacionales. El primer bloque de trabajo o *wetlab*, inicia con la fase de muestreo. Para el caso específico de suelos se utilizan parcelas de 100 m^2 donde se realiza una cuadrícula, tomando muestras cada 20 m, en donde en cada una se toman 4 submuestras o puntos. Al final se obtienen 16 muestras de 80 puntos. Cada muestra está constituida por 200 g de suelo, 15 de los cuales se utilizan para la extracción de ADN, y el restante para análisis físico-químicos. La siguiente fase es la extracción del ADN, que para este caso se realiza para el ADN extracelular. El ADN extracelular es un método rápido y económico que representa adecuadamente la biodiversidad presente en la muestra.

Adicionalmente, permite tener una cobertura de muestreo a gran escala y detectar ADN de organismos distantes o antiguos. La tercera etapa consiste en la amplificación del ADN o PCR, la cual permite obtener múltiples copias de la región de interés para el estudio. Para esto se realiza la selección de los *primers barcode*, que deben estar en una región conservada que, a pesar de ser común a todos los organismos, permita diferenciar los diferentes taxas presentes en la muestra. A estos *primers* se les debe agregar una etiqueta (*tag*) de 8 nucleótidos que permita identificarlos en el proceso de secuenciación, por cuanto todos los *primers* están presentes al mismo tiempo en la reacción de secuenciación, lo cual es denominado como multiplexado. Cada evento de amplificación incluye controles positivos y negativos para detección de contaminación cruzada. La última fase del *wetlab* es la secuenciación. Esta fase inicia con la preparación de librerías, que

consiste en adecuar los productos de amplificación para poder ser leídos por el equipo de secuenciación. Una vez verificada la librería se cuantifica a través de qPCR. Posteriormente las librerías se normalizan, se organizan en pools, y se llevan a una de las plataformas de secuenciación de Illumnia (MiSeq, HiSeq, NovaSeq), las cuales se diferencian en la capacidad de generación de datos y el tamaño de las lecturas.

3.2. Presentación: **Estudios de diversidad microbiana en la cadena de suministro de petróleo**

Ponentes: **Adriana Torres-Ballesteros, Natalia Sierra-García**
Institución: Mind the Microbes, Inglaterra

Resumen

Existen diferentes niveles de información para entender el mundo que nos rodea. A nivel molecular se estudian principalmente tres tipos de moléculas: ADN, ARN, y proteínas. Estas moléculas proporcionan información sobre la identidad y función de los microorganismos presentes en ellos ecosistemas. El estudio de estas moléculas se realiza a través de técnicas que permitan obtener las secuencias de éstas. A través de la secuenciación se puede obtener información sobre la taxonomía (gen 16S) y función (gen *alkB*) de las comunidades de microorganismos que componen un ecosistema. El término metagenómica es el estudio de los genes de interés de todos los microorganismos presentes en una muestra (agua, suelo, etc.).

Diversidad microbiana en la cadena de suministro del petróleo. Esta cadena involucra todas las actividades que están relacionadas con la industria del petróleo y que comprende las actividades *upstream* (exploración, perforación y producción), *midstream* (tratamiento, almacenamiento y transporte), *downstream* (refinamiento, distribución y marketing). Los microorganismos están presentes en esas diferentes etapas del petróleo y hacen parte de éste, además de los más de 20.000 tipos de hidrocarburos que lo componen, los cuales constituyen la fuente de energía de los microorganismos. La biodegradación del petróleo por parte de los microorganismos puede ser tanto de naturaleza aeróbica (con presencia de oxígeno) como anaeróbica (sin presencia de oxígeno), dependiendo de la profundidad a la que estos se encuentren, por cuanto a medida que se desciende existen otros compuestos diferentes al oxígeno, haciendo que cambie el tipo de metabolismo de los microorganismos. La degradación de hidrocarburos en anaerobiosis ocurre por asociación de bacterias fermentativas y arqueas metanogénicas. Estudios realizados en reservorios de petróleo tanto explotados (alterados) como no explotados (prístinos, sin alteración) a través de estudios de metabarcoding y metagenómica con 16S para bacterias y

arqueas, revelaron composiciones microbianas y funciones asociadas, muy diferentes entre ambos pozos, encontrando igualmente correlaciones entre la temperatura y la profundidad con el tipo de comunidades microbianas. En otro estudio, realizado en un derrame accidental de petróleo, se analizaron muestras a lo largo del gradiente de dispersión del contaminante y a diferentes profundidades. Se observó que algunos grupos de microorganismos están presentes en todas las muestras y en todas las profundidades, sin embargo, su abundancia variaba de acuerdo a la distancia del derrame y la profundidad, siendo esta última variable donde más correlación se observó.

3.3. Presentación: **Procesamiento bioinformático para datos de metabarcoding**

Ponente**:** **Nicolás Franco**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

El objetivo del procesamiento bioinformático, una vez filtrada y depurada la información, es obtener tablas de comunidades clasificadas en OTUs en términos de abundancias relativas para cada una de las muestras o unidades muestrales. Recapitulando las etapas del metabarcoding están la extracción del ADN ambiental a partir de las muestras; amplificación de la región objetivo (p. ej. 16S) para los grupos biológicos de interés, con 3 réplicas técnicas de PCR; preparación de librerías con el kit específico para la plataforma de secuenciación; secuenciación de las muestras; y generación de lecturas para las dos cadenas del ADN de la región objetivo (sentido *forward* y *reverse*), que consisten en archivos de texto plano con la composición nucleotídica de los fragmentos de ADN secuenciados. Dentro de esta última fase, de procesamiento bioinformático, se realiza la identificación de las muestras de acuerdo a la etiqueta que se haya adherido al cebador o primer. A su vez, el procesamiento bioinformático se divide en cuatro etapas, las cuales siguen un procedimiento y uso de programas de manera general, independientemente del estudio que se esté realizando con metabarcoding. Sin embargo, hay decisiones que son específicas para el estudio. La etapa uno, manipulación básica de los datos, consiste el procesamiento de las lecturas obtenidas del secuenciador para obtener las secuencias que se van a analizar. En esta etapa se lleva a cabo la demultiplexación de los cebadores para identificar las muestras; el ensamblaje de las dos lecturas obtenidas para la región (*forward* y *reverse*), con el fin de generar una secuencia consenso; se depuran los errores producidos durante la amplificación y secuenciación; y se filtran las lecturas de acuerdo al tamaño. Las lecturas deben tener un tamaño consistente con la región obtenida con los *primers* seleccionados. En la segunda etapa, clasificación de secuencias, se realizan análisis de agrupamiento para agrupar las secuencias de acuerdo a su similitud, ya sea con base en la información obtenida de las bases de datos de referencia, obteniendo grupos

taxonómicos, o sin bases de datos de referencia, generando OTUs. En bacterias, todas las secuencias que sean similares en un 97% se consideran del mismo grupo (OTU). En la tercera etapa, comparaciones experimentales, se utilizan los diferentes controles y réplicas (técnicas y biológicas) para depurar y remover información, y llegar así a la tabla de comunidades con las abundancias relativas. La última etapa comprende los análisis ecológicos, donde se obtienen índices de abundancia, diversidad, y otros parámetros que permitan realizar comparaciones. Estos análisis pueden complementarse con mediciones obtenidas de variables físico-químicas. Es fundamental tener una buena comprensión del experimento para realizar un buen análisis e interpretación de los resultados.

3.4. Presentación: **Análisis ecológicos de metabarcoding**

Ponente**:** **Paola Montoya**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

Realizada la depuración de los datos obtenidos de la secuenciación, se obtiene la matriz de comunidades, que está compuesta por los OTUs o por categorías taxonómicas, y las muestras o unidades de muestreo, con las mediciones de abundancia relativa, obtenidas a partir del número de lecturas, que no son una medida del número de individuos. Los OTUs son variantes moleculares que se obtienen por la agrupación de secuencias con un porcentaje de similitud que no necesariamente corresponde a un nivel taxonómico como familia, orden, etc. Estos OTUs son comparables entre diferentes muestras. Debido a la alta variación en el número de lecturas de las muestras, algunas sin mediciones, se utilizan las curvas de rarefacción, en las cuales se analiza la relación del número de lecturas con el número de agrupamientos (OTUs, grupos taxonómicos). Mientras más lecturas se obtengan mayor es la probabilidad de obtener más agrupamientos, lo cual puede ser problemático en la mayoría de datos, ya que la desigualdad puede resultar en análisis ecológicos erróneos. Para controlar esta variación se estima el número de lecturas que representen bien a todas las muestras, con el fin de que las comparaciones sean equiparables. Sin embargo, la desventaja de dicho análisis es la pérdida de información, que se puede reflejar en la disminución del número de OTUs. De acuerdo a las preguntas que se hayan planteado desde el inicio del diseño del experimento, se realizarán los análisis ecológicos respectivos. No obstante, se pueden realizar análisis generales que pueden ayudar a responder algunas preguntas, entre estos están las estimaciones de diversidad. Las estimaciones de diversidad pueden ser dentro de la localidad (diversidad alfa), o entre localidades (diversidad beta). La diversidad alfa puede estimarse como la riqueza de OTUs observados de acuerdo a diferentes índices de diversidad, los cuales puede variar por ejemplo, en cuanto uno le puede otorgar más peso a los OTUs raros,

mientras que otro a los OTUs más abundantes. Para metabarcoding el más recomendado es el índice de Shannon. Por cuanto los índices representan un valor descriptivo, con el fin de efectuar comparaciones es necesario realizar una prueba estadística (AMOVA, PERMANOVA, ANOSIM). Se debe resaltar que en este tipo de estudios más estimar cuánta diversidad se tiene, es quién la representa, es decir la composición microbiana. La diversidad beta, que implica comparaciones entre localidades, generalmente requiere una transformación de los datos. Estas comparaciones pueden realizarse a través de diferentes análisis como análisis de agrupamiento (clustering), análisis de componentes principales, escalamiento multidimensional no métrico, y análisis de correspondencia. Un análisis adicional, es la detección de especies indicadores (por afectaciones, cambios, estrés, etc) que se pueden realizar con TITAN (Threshold Indicator Taxa Analysis), Dufrene (Legendre Indicator Analysis), y aproximaciones por machine learning.

3.5. Presentación: **Herramientas metagenómicas y metabarcoding para el estudio de diversidad taxonómica y funcional en microbiomas ambientales bajo selección con hidrocarburos**

Ponente: **Howard Junca**
Institución: Microbiomas Foundation, Colombia

Resumen

En suelos y otros ambientes los microorganismos son los más abundantes y constituyen la mayoría de la biomasa (más del 90%). Los ambientes extremos son dominados prácticamente por microorganismos ya que son los únicos que pueden resistir esas condiciones. Las comunidades microorganismos de suelos son altamente complejas por la gran cantidad de especies presentes, lo que dificulta discernir sus orígenes e identificar sus funciones. A través de herramientas como la metagenómica y el metabarcoding se obtienen grandes cantidades de información a través de las cuales se puede llegar a determinar la composición microbiana, sus funciones, rutas metabólicas, filogenia, etc. Aunque la mayoría de los microorganismos no son cultivables el desarrollo de este tipo de técnicas moleculares han permitido identificar cada vez más tipos de bacterias no cultivables. De igual manera, este tipo de herramientas ha sido muy útil para comprender el efecto de muchas afectaciones al ambiente causadas por parte del hombre. Uno de los grandes problemas asociados al hombre son los xenobióticos, o sustancias químicas encontradas en los organismos que no hacen parte de su constitución, o que están presentes en concentraciones mucho más altas de lo esperado. Los xenobióticos pueden agruparse como carcinogénicos, medicamentos, contaminantes ambientales, aditivos alimenticios, hidrocarburos y pesticidas. En este contexto se han identificado muchos tipos de microorganismos que son capaces de degradar

contaminantes, al utilizarlos como fuente de energía. Una estrategia de uso de microorganismos para contrarrestar afectaciones es la biorremediación. Esta tecnología incluye diferentes métodos, como el "landfarming", para suelos contaminados, que consiste en realizar un arado frecuente y mezcla superficial de suelo, para permitir aireación, y acceso y selección de microbios del suelo no afectado. Por otro lado, existe el "bioventing", a través del cual se inyecta oxígeno al suelo para favorecer la degradación aerobia. Para desarrollar este tipo de tecnologías es muy importante identificar los microorganismos que participan en el proceso y saber cómo funcionan, es decir, determinar el gen o genes que están involucrados, para lo cual la metagenómica y el metabarcoding juegan un papel importante. Con secuenciación masiva y transcriptómica es posible identificar los genes y rutas metabólicas involucradas en la degradación de contaminantes. Igualmente, los microorganismos tienen el potencial de detectar reservorios de petróleo y gas, de acuerdo a la expresión de determinados genes.

3.6. Presentación: **Aprendizaje de máquina y exploración de crudo**

Ponente**:** **Juan Manuel Anzola**
Institución: Universidad Central - Corporación CORPOGEN, Colombia

Resumen

La clasificación es un proceso (innato en el hombre) que permite organizar, identificar y facilitar la comunicación. A través de la clasificación se asignan etiquetas para identificar un objeto de manera inequívoca, lo cual le atribuye un valor predictivo. Para el caso de los microorganismos los sistemas de clasificación por morfología no son aplicables, por lo cual se utilizan sus características moleculares, como por ejemplo secuencias de ADN. En metabarcoding se utilizan regiones de ADN específicas para identificar y diferenciar especies u organismos. De esta forma, a partir de una muestra ambiental, se realiza la secuenciación de todo el ADN presente en dicha muestra, y con el uso de herramientas bioinformáticas se clasifican los diferentes grupos de microorganismos, a partir de los cuales puedo realizar comparaciones entre diferentes muestras, y así interpretar los resultados en un contexto biológico. La base de dicha clasificación se basa en la implementación de algoritmos que realizan comparaciones de secuencias (alineamientos) contra una base de datos de referencia (secuencias de ADN conocidas). Por otro lado, se están empezando a implementar métodos que no implican alineamientos, en donde un algoritmo produce un vector de identificación a partir de la descomposición de la secuencia en palabras cortas (características). Este método facilita el desarrollo del aprendizaje de máquina para trabajar con ADN. A partir de las palabras obtenidas de las secuencias, se conforma un mapa de características a través del cual se entrena un modelo predictivo que finalmente permite clasificar la información obtenida. El aprendizaje de máquina se basa en el entrenamiento de un modelo con

un grupo de datos conocidos de tal forma que permita realizar predicciones sobre datos desconocidos. Usualmente el 70% de los datos proporcionados son usados para el entrenamiento del modelo, y el 30% restante para evaluar el modelo. A partir de dicho modelo predictivo se realiza la clasificación de los microorganismos presentes en la muestra. En aprendizaje de máquina existen diferentes algoritmos para realizar la clasificación, de las cuales una de las más usadas son las redes neuronales, que son modelos de inteligencia artificial que buscan reproducir el funcionamiento de un cerebro humano en un computador. Actualmente se viene desarrollando un método de aprendizaje profundo, que contiene un número mucho mayor de funciones de activación ("neuronas"), lo que aumenta significativamente el valor predictivo. Sin embargo, para este último método se requiere una mayor cantidad de datos, donde es probable que un estudio de metagenómica no aporte la suficiente información; e igualmente se requiere computación de alto desempeño. El proyecto MetaSUB, el cual busca la incorporación de los ecosistemas microbianos en diseño de ambientes urbanos y ciudades, está aplicando el aprendizaje profundo para, a partir de muestras metagenómicas obtenidas de superficies de transporte masivo, generar un sistema de clasificación que permita determinar su posible origen geográfico. En el contexto de exploración de hidrocarburos, el aprendizaje de máquina podría permitir obtener clasificadores que identifiquen, con un alto grado de confianza, regiones con potenciales reservorios. Debido a la alta complejidad de desarrollar aprendizaje profundo en cada escenario, se está desarrollando el "transfer learning", que permite adaptar de uso de redes neuronales profundas para correlacionar datos de diferentes sistemas. El aprendizaje de máquina es una herramienta muy poderosa que comienza a ser explorada en áreas de ecología, conservación, y bioprospección de zonas asociadas con la explotación de hidrocarburos; y su potencial para reconocimiento de patrones y predicción es superior al de otras técnicas tradicionales de análisis.

4. Cuarto día – 27 de noviembre

3.1. Presentación: **DNA-based monitoring for biodiversity assessment in an Amazonian gas project**

Ponente**:** **Kath Bruce**

Institución: Nature Metrics- AquaNet, Inglaterra

Resumen

El metabarcoding constituye una herramienta importante para generar nueva y valiosa información para la gestión ambiental y apoyar a los tomadores de decisiones, ayudando a reducir la brecha entre investigación y política. La iniciativa Nature Metrics es uno de los proveedores más grandes de metabarcoding, con 32 empleados, más de 150 clientes alrededor del mundo, y más de

10.000 muestras procesadas hasta el momento. La organización proporciona el servicio de principio a fin para muestras de aguas, suelos, sedimentos e insectos en masa. Igualmente, presta asesoría para desarrollar el proyecto, incluyendo el diseño experimental para la toma de muestras. Nature Metrics se especializa en metabarcoding y busca desarrollar métodos confiables y prácticos, que en la medida puedan aplicarse a todos los proyectos, independientemente de la pregunta de investigación; establecer marcos sólidos de control de calidad; y lograr la participación de múltiples partes interesadas, incluyendo investigadores, académicos, competidores, y tomadores de decisiones, entre otros. En cuanto a la toma de muestras para ADN ambiental, se siguen procedimientos estándar establecidos por la Agencia Europea, que implican el uso de filtros cerrados (con el fin de reducir el riesgo de contaminación) con membrana hidrofílica con un tamaño de poro de hasta 1 um. Igualmente, el ADN presente en las muestras es preservado con medios líquidos que no sean inflamables. El muestreo en campo es realizado por el cliente para lo cual proporcionan la capacitación y el kit de materiales para realizarlo, el cual no involucra el uso de bombas de vacío y/o sistema de refrigeración. Este kit no solo reduce la contaminación, sino que permite preservar las muestras por varios meses sin ninguna refrigeración. Para el análisis bioinformático, existen bases de datos de referencia bien desarrolladas para el Reino Unido y Europa, sin embargo, para los trópicos existe una muy alta y diferente diversidad, para la cual existen pocos datos de referencia. Adicionalmente, otros retos que se han identificado para los clientes, y que se buscan superar a corto plazo, son el tiempo y los costos para generar líneas bases, el desplazamiento de profesionales a zonas inhóspitas y peligrosas, y la dificultad de replicar el estudio con fines de monitoreo y detectar los cambios. Sin embargo, los estudios de metabarcoding presentan grandes ventajas sobre los tradicionales. En un estudio realizado en el río Amazonas en Perú, se lograron establecer alrededor de 700 especies de mamíferos, entre las cuales se encontraron mamíferos terrestres y aves. Este estudio se realizó en un muy corto tiempo y con pocas personas involucradas en el muestreo, sin necesidad de ser profesionales especializados. Igualmente, una gran ventaja es que este tipo de estudios no implica muestreos invasivos. En el estudio se lograron detectar especies de interés para conservación por su estado de amenaza. Por otro lado, se logró establecer la estructura y conectividad del hábitat para las comunidades de peces.

3.2. Presentación: **Indicadores en biodiversidad acuática con Metabarcoding**

Ponente**:** **Jan Pawlowski**
Institución: Universidad de Ginebra, Ginebra, Suiza

Resumen

DNAqua-net es la plataforma establecida para desarrollar herramientas genéticas en Europa, con el objetivo de lograr un manejo sostenible de los ecosistemas acuáticos. Aunque este tipo de estudios se puede realizar de la manera tradicional, la cual se basa en la recolección de organismos e identificación taxonómica, se pueden utilizar metodologías basadas en ADN para obtener resultados similares y complementarios. Sin embargo, existen varios retos que surgen al implementar el ADN para biomonitoreo. Uno de ellos es el concepto de la técnica como tal, por cuanto las muestras y los datos obtenidos son diferentes a los del método tradicional. Igualmente, se encuentran los problemas asociados a la técnica como la preservación de las muestras, el desarrollo de las bases de datos de referencia, la identificación de ruido que afecte los resultados, etc. Las actividades antropogénicas generan impacto en el ambiente, las cuales se miden normalmente por parámetros físico-químicos para obtener una valoración cualitativa del estado (escala de colores). Complementario a esto se encuentra el uso de bioindicadores, en el cual se evalúan cambios en las comunidades de ciertos organismos, como una medida del impacto generado. Los estudios de ADN ambiental surgen como una aproximación complementaria a los dos métodos anteriores, con la característica de ser una herramienta efectiva en costo y tiempo para biomonitoreo. El tipo de sustrato (agua, suelos, sedimentos, etc.) y los grupos taxonómicos elegidos para estudiar dentro de un proyecto van a depender de los objetivos de la investigación. Entre las aplicaciones del ADN ambiental se encuentra la detección de especies (qPCR, dPCR), estudios de biodiversidad (metabarcoding), y biovaloración o valoración del impacto ambiental (índices bióticos). El laboratorio (del ponente) se ha enfocado en el monitoreo béntico o del suelo marino, a través del cual se evalúa la calidad del ambiente marino usando macroinvertebrados bénticos (anélidos, moluscos, equinodermos, etc.). Este tipo de monitoreo tradicionalmente involucra la separación y organización de los macroinvertebrados del sedimento, y la identificación de éstos por morfología. Este método consume mucho tiempo y es costoso. Un método alternativo más rápido y económico es el metabarcoding. Este tipo de monitoreo se viene aplicando para evaluar el impacto en el ambiente de dos tipos de industrias: la de acuacultura (criaderos de salmones), evaluando el enriquecimiento orgánico asociado a esta actividad; y la de explotación de gas y petróleo, estudiando la contaminación química asociada a la extracción de éstos. Los monitoreos son realizados bajo los dos abordajes (tradicional y metabarcoding) ya que solo de esta forma se pueden validar y calibrar los métodos. Por su parte, las muestras deben ser recolectadas a través de gradientes con el fin de detectar diferencias y establecer los índices bióticos. El uso del metabarcoding ha podido evidenciar claramente el impacto en el ambiente de este tipo de industrias. Sin embargo, un reto que se ha identificado en estos estudios es que la macrofauna se encuentra subrepresentada en los sedimentos y la abundancia de datos de secuencias no es confiable. Por su parte, la meiofauna y los microorganismos están muy bien representados en las muestras de sedimentos, pero carecen de identificación taxonómica, así como de información sobre su valor ecológico. Entre las posibles soluciones se encuentran la generación de nuevos índices, buscar nuevos bioindicadores entre la meiofauna y los

microorganismos, y la utilización de inteligencia artificial (machine learning) para predecir el valor ecológico de las muestras.

3.3. Presentación: **Uso y caracterización molecular de sustratos para aumentar eficiencia de biorremediación**

Ponente: **Santiago Cardona**
Institución: Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Resumen

El problema de biorremediación es muy complejo, se ha podido abordar, para poder gestionarlo, conocerlo y poderlo controlar de la manera más adecuada mediante el desarrollo de un concepto que denominamos "el suelo contaminado como un reactor biogeoquímico" este concepto une herramientas importantes como lo son la microbiología del suelo y la biología molecular. Con esto se busca tratar de conceptualizar el suelo como algo que tiene una frontera de tal manera que se pueda controlar, gestionar y direccionarlo, en este caso disminuir la contaminación generada por hidrocarburos y acelerar la biodegradación. La biorremediación como disciplina es difícil de conceptualizar, ya que en este término confluyen diversas disciplinas desde ciencias básicas, física, ingenierías, electrónica, mecánica, química (entre otros) y tiene una parte constitutiva que integra hidrogeología (i.e cambio estaciona, ciencia del suelo, conductividad hidráulica), gestión de sitios contaminados (i.e análisis químicos, ecotoxicología, protocolos, caracterización), procesos biológicos (i.e diseño de biorreactores, bioquímica, microbiología, biología celular) y técnicas analíticas y monitoreo (i.e especiación química, métodos de campo y laboratorio, degradación). Otras de las herramientas que complementan el proceso de biorremediación es el sistema que existe en la naturaleza y se conoce como biomimesis de biodegradación de material orgánico, que una vez estabilizado (después de 1 a 4 años) este material orgánico produce una serie de ácidos húmicos y fúlvicos que son añadidos al sitio a recuperar, este material es muy reactivo y de superficie grande por lo cual presenta muchos ecosistemas bacterianos que ayudan a el balance carbono – nitrógeno que genera la contaminación por hidrocarburo, otra características de estos ácidos es que absorben contaminantes orgánicos, metales y nutrientes. Para tener un reactor y poderlo secuenciar y controlar de manera de la biomimesis con este sistema de compuestos húmicos y fúlvicos añadirlos de manera sintética proveniente del compostaje de materia orgánica que no tiene tóxicos ni patógenos, de tal manera que se inocula y se inocula se hace una réplica lo que ocurre en la naturaleza, generando estabilidad en el suelo a largo plazo, y como es de origen natural hay bacterias entrenadas con compuestos similares a los que existen en la petroquímica e industrial y la naturaleza "los hace de forma similar", que a su vez lo pueden degradar. Se ha descubierto que las bacterias tienen sistemas de amortiguación y de adaptación para los sistemas

de biorremediación y biodegradación. Para este tipo de procesos se requiere saber hasta cuando las bacterias pueden metabolizar ciertos compuestos y como iban a aclimatar y adaptar a condiciones climáticas y de concentración, a partir de probar diferentes procesos se trató de definir una triada (fuente de nitrógeno biodisponible, fuente de carbono y energía y fuente de fósforo biodisponible) que puede lograr degradar un contaminante y con esto comenzar a evaluar lo que podría estar ocurriendo en el ecosistema microbiano, si estos estaban influenciados por los parámetros del suelo, efectivamente se encontró que algunas bacterias se inactivan debió a condiciones con presencia de ciertos metales, cambios en el pH, conductividad eléctrica, exceso de humedad hacían que las bacterias no metabolizaran, a partir de ajustes se podía determinar que caracterizando en un sitio contaminado estos parámetros se podía tener una viabilidad para direccionar el tratamiento y definir qué bacterias se querían poner a crecer en campo. Se encontraron algunos metabolitos secundarios más tóxicos que generan estancamiento en el crecimiento de las bacterias, se estudiaron las unidades bioquímicas y se determinó que se pueden trasladar del compostaje a el sitio contaminado, al compostaje se le hace seguimiento microbiano y se aplica al sitio contaminado en diferentes dosis para acelerar el proceso y que se mantenga de forma constante en el tiempo. En los diferentes estudios se evidenció que con el tiempo las bacterias disminuyen su actividad de biodegradación, por lo cual se comenzó a aplicar de manera periódica tensoactivos que además de que hacen más soluble el hidrocarburo, ayudan a las bacterias a degradar el petróleo.

3.4. Presentación: **Estudios de caso metabarcoding Instituto Humboldt**

Ponente**:** **Mailyn González**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen
El Instituto Alexander von Humboldt ha desarrollado una serie de estudios con metabarcoding a través de los últimos años. Esta experiencia ha representado una curva de aprendizaje que hoy en día resulta en una serie de recomendaciones para la aplicación de la herramienta. En esta conferencia se muestran tres ejemplos de casos desarrollados durante la consolidando la iniciativa de metabarcoding.

El primer proyecto se realizó en el 2014 dentro del sistema área protegidas de Colombia, en el páramo de Iguaque, con el objetivo de evaluar el cambio de diversidad en un gradiente de elevación. Se tomaron muestras de suelo desde los 3200 msnm hasta los 3700 msnm, en tres coberturas vegetales (bosque, transición y páramo) buscando recuperar cuatro grupos biológicos (bacterias, hongos, plantas y otros eucariotas). Con los datos generados por metabarcoding se observó una disminución de la riqueza con la elevación en los cuatro grupos. Cuando se evaluó la

similitud de las comunidades en términos de la elevación, en plantas se encontró una agrupación de las muestras de bosque y otra agrupación de las muestras de transición y páramo, corroborando la similitud del subpáramo al páramo. Sin embargo, en bacterias se encontró una señal diferente, siendo recuperados un grupo conformado por las muestras de páramo y otro conformado por las muestras de bosque y transición. En hongos y otros eucariotas se recuperaron tres grupos, uno de muestras de bosque, otro de transición y otro de páramo, y al igual que en bacterias, las muestras de bosque fueron más similares a las de transición que a las de páramo. Este estudio muestra que según el grupo biológico de interés se puede encontrar una señal diferente de acuerdo con la pregunta que se plantea. El segundo ejemplo es un estudio de metabarcoding relacionado al derrame de petróleo en la Quebrada Lizama en el año 2018. El Instituto tomó muestras de suelo, agua y sedimento en el área de contingencia, tres meses después del evento, para caracterizar la diversidad de bacterias de las áreas potencialmente afectadas. Se comparó la diversidad y la composición de las comunidades en áreas afectadas y puntos control a lo largo de la Quebrada Lizama. En ese momento no se contó con información de referencia o línea base sobre la diversidad del sitio antes de la emergencia. Las comparaciones de la diversidad alfa entre sitios afectados y controles no mostraron diferencias significativas en muestras de agua y sedimento, pero sí en suelo, siendo significativamente menor la diversidad de sitios afectados. Análisis de similitud de la composición de las comunidades, agruparon las muestras por sustrato (agua, suelo y sedimento) cuando se evaluaron los datos de forma conjunta. Cuando el análisis se realizó por sustrato, no se encontró agrupación de las muestras de sitios afectados versus controles. En términos de las abundancias relativas de los órdenes taxonómicos presentes, solo en suelos se encontraron diferencias entre las muestras de sitios afectadas y controles. En suelos afectados se encontraron grupos de bacterias que metabolizan metano, por lo que probablemente el derrame sí causó un cambio en estas comunidades, favoreciendo la abundancia de aquellos organismos que pueden usar compuestos derivados de petróleo como fuente de energía. Adicionalmente, en colaboración con la Universidad de los Andes, se realizó una caracterización e identificación taxonómica de hongos cultivables, y se encontraron organismos relacionados a grupos reportados en la literatura como degradadores de hidrocarburos. Estos organismos también fueron encontrados en algunos sitios control, sugiriendo que todo el sistema ha estado expuesto por un período prolongado a presencia de hidrocarburos. El tercer y último ejemplo, se basa en un monitoreo a través de metabarcoding de un área de explotación de hidrocarburos de Gran Tierra Energy, que actualmente está siendo objeto de limpiezas. El objetivo del estudio es comparar la diversidad antes y después de la limpieza. Se incluyeron muestras de agua, suelo y sedimento de 39 puntos de muestreo en áreas contaminadas y potencialmente no contaminadas. Sin embargo, al iniciar las labores de limpieza en el área se encontró rastro de crudo en todo el sistema, el cual aparentemente, fue transportado por el agua a través de las inundaciones naturales del área. Se realizaron tres extracciones de ADN de cada sustrato por cada punto de muestreo, con 3 réplicas de PCR para bacterias y hongos. Se realizaron comparaciones de las

muestras de acuerdo con las categorías de calidad de hábitat obtenidas con datos de macro-invertebrados acuáticos. En diversidad alfa, se encontró que en hongos las categorías de calidad más baja fueron significativamente menos diversas que las demás categorías. Al analizar la composición de estas muestras, se encontró que aquellas de calidad baja presentaban una alta dominancia de pocos grupos taxonómicos. En bacterias no se encontraron diferencias en la diversidad de las muestras de acuerdo con la categoría de calidad. A nivel general tanto en hongos como en bacterias, se encontraron diferencias en la composición de las comunidades de acuerdo con el sustrato, y en todos los sustratos se encontraron grupos reportados como degradadores de hidrocarburos. En este momento, este proyecto se encuentra en la primera fase, y es clave comprender que la línea base no es por sí solo un monitoreo, si no es la base para detectar cambios en las comunidades en diferentes momentos.

3.5. Presentación: **Estudio de microorganismos en ambientes con hidrocarburos**

Ponente**:** **Jhorman Niño**
Institución: Instituto Colombiano de Petróleos, Colombia

Resumen

En la industria del petróleo los microorganismos se encuentran presentes a lo largo de la cadena de producción del petróleo, desde la exploración hasta el producto final, desempeñando diferentes roles, que pueden ser tanto beneficiosos como desfavorables. Las herramientas genéticas han ayudado a explorar el potencial de las comunidades microbianas que participan en el proceso, así como para desarrollar o mejorar las estrategias de diagnóstico, control y prevención, cuando éstas producen efectos no deseados. En los procesos que se realizan dentro de este sector, los microorganismos producen moléculas de interés para la elaboración de biosurfactantes, biosensores, biopolímeros y biocombustibles, entre otros. Para desarrollar estas aplicaciones es necesario caracterizar a nivel genético y funcional las comunidades microbianas, lo cual es posible a través de herramientas moleculares basadas en la secuenciación. En cuanto a los efectos desfavorables de los microorganismos en la industria del petróleo, se encuentran el agriamiento, producido por el aumento del sulfuro de hidrógeno que afecta la calidad del crudo, y la corrosión, que deteriora los equipos y estructuras usadas en la explotación del petróleo. Los costos de los daños producidos por la corrosión pueden llegar a representar el 1-5% del Producto Interno Bruto del país. Los microorganismos involucrados en este proceso son altamente diversos y complejos y no pueden ser identificados en su totalidad por métodos tradicionales. Los diagnósticos errados conllevan a tratamientos ineficientes. Las técnicas que implican la generación de secuencias, como la metagenómica y el metabarcoding, han permitido identificar, a un menor costo y en menor tiempo, las comunidades microbianas involucradas en el proceso de

biocorrosión. La información generada a través de estas herramientas permite realizar un diagnóstico más preciso y oportuno, lo cual posibilita establecer mecanismos de acción más apropiados. Por otro lado, la metagenómica ha permitido la caracterización de agua de vertimientos de estaciones de tratamiento para su uso con propósitos agrícolas y agroforestales, enfocados por ejemplo a la producción de biomasa y captura de CO_2. Igualmente, el uso de estas herramientas permite conocer, por medio de la comparación de zonas afectadas y no afectadas, el impacto de un derrame en el ambiente. La comparación de las comunidades de micro y macroorganismos entre zonas, permite entender el proceso de recuperación natural de las áreas impactadas por hidrocarburos. Así mismo, ayuda a identificar potenciales especies degradadoras para utilizar en procesos de biorremediación.

3.6. Presentación: **Alcance del monitoreo genético en otros organismos (macroinvertebrados acuáticos, insectos)**

Ponente**:** **Nathalie Baena**
Institución: Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia

Resumen

Los macroinvertebrados acuáticos son animales pequeños que por sus características biológicas y sensibilidad a factores ambientales cumplen un papel en la indicación de calidad del agua. Estos organismos son esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, cumpliendo roles como fuente de alimento o en el ciclo de nutrientes y de materia orgánica. Su uso como bioindicadores se basa en la aplicación de índices y análisis de la diversidad presente para evaluar la contaminación, estos índices varían entre regiones y países y se estandarizan de acuerdo a la biodiversidad residente en las fuentes hídricas de cada región. En Colombia, se utilizan principalmente una adaptación del índice "Biological monitoring working party", conocido en el país como BMWP/COL y el índice EPT, que recibe su nombre de los órdenes de insectos que analiza (Ephemeroptera, Plecoptera y Trichoptera). Estos índices son de amplio uso y entre sus ventajas está la practicidad y simplicidad.

Existen métodos para el monitoreo del agua con ADN, e incluso se puede integrar el uso de índices tradicionales con el uso de códigos de barras de ADN, los códigos permiten reconocer especies y asignar estos números a potenciales especies nuevas. Al comparar el método de monitoreo tradicional con morfología, y los métodos con ADN de metabarcoding y metagenómica, se ha planteado que los métodos con ADN pueden agilizar la obtención de resultados de monitoreos al evitar ciertos pasos. Entre las ventajas del metabarcoding esta que se cuenta con fuentes de

referencia para la identificación taxonómica, aunque precisamente este factor lo hace dependiente de las bases de datos y debilita su uso en particular en países como Colombia, donde aún hay baja representatividad de secuencias de ADN para grupos como Ephemeroptera, Plecoptera y Trichoptera. Adicionalmente, se reconoce como una desventaja del metabarcoding el desempeño no universal de los *primers* para diferentes marcadores moleculares y grupos de organismos. En contraste, el uso de metagenómica muestra gran potencial para ampliar la resolución taxonómica de organismos estudiados y sobresale por no estar limitado al uso de *primers* para PCR.

El ADN ambiental (eDNA) se puede utilizar para monitorear los macroinvertebrados en ecosistemas de agua dulce. Este método de monitoreo tiene una gran ventaja y es que disminuye la perturbación de los ecosistemas en el proceso de toma de muestras, pues es menos invasivo al tomar muestras de agua en lugar de especímenes. Por esta razón está sujeto a factores que pueden afectar la detección del ADN en el agua. Entre estos está la dependencia a la producción de ADN que proviene de los organismos (tamaño del organismo, densidad de la población, etc.), el movimiento del agua que puede ayudar a distribuir el ADN a lo largo y ancho del río o por el contrario si son aguas lenticas potencialmente puede mantener el ADN sectorizado y por ende menos distribuido. El ADN puede degradarse por exposición a temperaturas altas, cambios de pH, luz UV y actividad microbiana. Asimismo, el eDNA puede arrojar datos de presencia de organismos de fuentes alóctonas. El gran interés por monitorear y conocer la calidad del agua a partir de eDNA ha llevado a un reciente y creciente número de estudios que buscan integrar el uso de este con los índices morfológicos. De esta forma se ha ido encontrando que, aunque los resultados no son idénticos si se asemejan, muestran patrones temporales y como es de esperar el eDNA revela una mayor diversidad de macroinvertebrados e incluso puede llegar a ser más sensible a contaminantes orgánicos.

VI. Conclusiones y puntos de reflexión.

- Las bacterias, arqueas, hongos y otros eucariotas son esenciales en el buen funcionamiento del ecosistema y pueden ser utilizados como bioindicadores de cambios en el ambiente, en particular en presencia de sustancias tóxicas.

- Los microorganismos representan una oportunidad para la industria.

- Metagenómica es el "total" de la información genética --enlace más directo entre estructura y función. Metabarcoding se enfoca en regiones genéticas particulares y según composición nos permite explorar funciones.

- Factores como la estacionalidad, el pH, el Oxígeno disuelto entre otros pueden afectar la diversidad de comunidades y deben ser tomados en cuenta al momento de plantear un estudio.

- La línea base es un t0. Pero el monitoreo comprende la caracterización de un sistema en una serie de tiempo t1, t2, tx.

- Los fluidos usados en fractura hidráulica pueden alterar la composición y funcionamiento de comunidades de microorganismos ambientales p.ej. en el suelo. Por lo cual es importante monitorear suelos.

- Diseño experimental – Clave comprender qué se pone a prueba.

- Preservación adecuada de las muestras para el procesamiento.

- Presencia de controles negativos y positivos en la fase de laboratorio e importante mantener a lo largo del monitoreo.

- Monitoreo de aguas subterráneas y en superficie - p.ej. arqueas como bioindicadores de dinámicas microbiológica en el subsuelo y/o de cambios en la composición de comunidades en suelo, sedimento y/o agua.

- Las comunidades pueden cambiar en la columna de agua.

- La importancia de continuar enriqueciendo las bases de referencia.

- Metabarcoding: herramienta clave en el presente y futuro del biomonitoreo.

Glosario

ADN (Ácido desoxirribonucleico): molécula portadora de la información genética, que posibilita su transmisión de una generación a la siguiente.

Amplicón: fragmento de ADN objetivo obtenido en el proceso de amplificación o PCR.

Bentos: especies de plantas y animales que viven dentro o sobre el fondo marino, ya sea desplazándose por este, adheridas a un sustrato o inmersas en las arenas o lodos del fondo marino.

Cebadores, *primers* (inglés), u oligonucleótidos: secuencias cortas de nucleótidos que se utiliza en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la creación de moléculas más largas de ADN.

Códigos de barras de ADN (*barcoding*): técnica a través de la cual se realiza la identificación de una especie con base en su secuencia de ADN. Este ADN generalmente comprende una región corta, conservada y universal.

Machine learning: rama de la inteligencia artificial en la que una computadora genera reglas subyacentes o basadas en datos en bruto que han sido introducidos en ella previamente. Comprende algoritmos de aprendizaje automático que utilizan estadísticas para encontrar patrones en cantidades masivas de datos.

Meiofauna: el componente de la fauna del lecho marino o lacustre que comprende animales pequeños (pero no microscópicos), como gusanos y crustáceos diminutos.

Metabarcoding: método por el cual se secuencian en paralelo los códigos de barras de ADN de muchos organismos diferentes presentes en una muestra. El metabarcoding utiliza la secuenciación de alto rendimiento del ADN para identificar diversos taxones en una sola reacción.

Metagenómica: La metagenómica es la técnica que permite recuperar el genoma microbiano directamente de las muestras ambientales, independientemente de la naturaleza de la muestra y de la abundancia de entidades microbianas

PCR (*Polymerase Chain Reaction* = reacción en cadena de la polimerasa) (ampificación): procedimiento que genera millones de copias de un segmento corto de ADN mediante ciclos repetidos de: 1) desnaturalización del ADN, 2) acoplamiento de los oligonucleótidos y 3) extensión mediante la acción de la ADN polimerasa. La PCR es un procedimiento muy común en los estudios de genética molecular y se puede utilizar para: 1) generar una cantidad suficiente de ADN para realizar determinadas pruebas (p. ej. análisis de la secuencia, rastreo de mutaciones); o 2) puede ser una prueba diagnóstica en sí misma (por ejemplo, amplificación específica del alelo, cuantificación del número de repeticiones de trinucleótidos).

PCR digital o dPCR: es una modificación del método de qPCR que puede emplearse para cuantificar objetivos de ácidos nucleicos definidos con precisión. La técnica se basa en el concepto de diluciones límite, que implica la división de una reacción PCR en múltiples subreacciones, de manera que cada subreacción no contiene ninguna, o una, o más dianas de ADN.

PCR en Tiempo Real o qPCR (PCR cuantitativa): método basado en la PCR para la detección, cuantificación y tipificación de una región de ADN.

Secuenciación de ADN: proceso para determinar la composición de una molécula de ADN, es decir, determinar el orden de los nucleótidos que la conforman.

Surfactante: sustancia, como un detergente, que puede reducir la tensión superficial de un líquido y así permitirle hacer espuma o penetrar en los sólidos.

Wet lab: laboratorio equipado con la plomería, la ventilación y el equipo apropiados para permitir la investigación y la experimentación científica práctica.