

Aplicaciones de las técnicas de ADN ambiental al estudio y conservación de los recursos naturales

Amador Huerta Vela y Alejandro Centeno-Cuadros.

Resumen— El ADN ambiental (*environmental DNA*, eDNA) es una metodología para analizar el material genético liberado por individuos que han transitado o habitan en el medio muestreado con el objetivo de identificar las especies a las que pertenece dicho material. El tipo de muestreo es no invasivo y permite analizar varios taxones simultáneamente partiendo de una misma muestra. Esta técnica, por lo general, identifica un mayor número de taxones y con menores tasas de error que las técnicas no moleculares. Desde la aparición de los secuenciadores masivos, el número de estudios relacionados con el eDNA ha aumentado exponencialmente debido a la relativa facilidad y abaratamiento de los costes asociados a la secuenciación. Las aplicaciones del eDNA siguen en aumento y diversificándose a través de diversas áreas de conocimiento asociadas a las Ciencias de la Vida. Este trabajo cuantifica y describe la influencia que ha tenido el eDNA en el estudio y conservación de la biodiversidad, prestando especial interés al estudio de ecosistemas antiguos, las interacciones planta-polinizador, el análisis de las dietas, la detección de especies invasoras, las respuestas a la contaminación o el análisis de la calidad del aire.

Palabras Claves— Muestreos no invasivos, *New Generation Sequencing*, Secuenciación Masiva, *barcoding*, *metabarcoding*.



1. INTRODUCCIÓN

El ser humano ha tratado siempre de entender el movimiento de los organismos en la naturaleza para poder antecederse a ellos y mejorar la gestión de los recursos naturales. Hoy día, además, dicha gestión debe de ir estrechamente ligada a la conservación de la biodiversidad. El estudio de la biodiversidad y el movimiento de los organismos se han realizado tradicionalmente mediante muestreos en el campo. En ellos se captura y marca a los individuos para posteriormente liberarles, con el objetivo de recapturarlos e identificarlos en base a su marcaje. Esta metodología ha contribuido notablemente a la Ecología del Movimiento [1], pues la comparación entre las localidades de captura y posteriores recapturas identifica los movimientos de los individuos. Sin embargo, las tasas de captura y proporción de individuos capturados en relación al total de la población utilizando este tipo de muestreos no siempre es suficiente para realizar estudios demográficos, especialmente en especies esquivas [2] o por problemas metodológicos [3]. El radiomarcaje, es decir, el seguimiento de los individuos mediante sistemas de posicionamiento global (GPS) describe con detalle los movimientos de los individuos, pero puede amenazar la supervivencia de las especies por la propia captura y manejo de los individuos (e.g. [4]).

La aplicación de las técnicas genéticas al estudio de la biodiversidad ha contribuido enormemente al estudio de la fauna y flora silvestres. La caracterización y cuantificación de la biodiversidad vivió un fuerte impulso desde la creación del proyecto *Barcoding of life* [5] y *The Consortium for the Barcode of Life* (CBOL). Este proyecto plan-

tea como objetivo identificar toda la biodiversidad mediante el uso de pequeñas secuencias de ADN estandarizadas, utilizando el CBOL como red logística. Desde entonces se han unido más de 200 organizaciones de 50 países diferentes al CBOL e impulsó *The Barcode of Life Data System* (BOLD) para ayudar a la adquisición, almacenamiento, análisis y publicación de todos los datos moleculares enmarcados dentro del CBOL (los llamados “códigos de barras”) [6].

Gracias a los proyectos CBOL y BOLD existe hoy día información molecular disponible para identificar a cientos de miles de taxones, aunque aún queda mucho camino por recorrer. Una de las mayores dificultades a las que se enfrentaron en este proyecto era la puesta a punto de una metodología que permitiese identificar cualquier traza de material genético que se encontrara en una muestra de tierra, agua o aire. Hoy día, existe un conjunto de técnicas de muestreo genético que permiten identificar a los organismos que estén o hayan estado en contacto con la muestra a analizar. Tal ha sido su auge e impacto que se acuñó el término “ADN ambiental” (*environmental DNA* o eDNA) para definirlos y hasta existe ya una revista especializada en este tipo de metodologías (*Environmental DNA*, editorial Wiley). Las técnicas de eDNA dirigidas a cumplir los objetivos de CBOL permiten identificar y monitorizar la biodiversidad presente en una muestra cogida en el medio ambiente, permitiendo ahora con mayor probabilidad y eficiencia trabajar con especies poco abundantes, esquivas y/o en peligro de extinción [7]. Debido a su relevancia y aplicabilidad, así como al amplio abanico de áreas de conocimiento donde se utiliza el eDNA, este trabajo se centra en resumir las metodologías, aplicaciones y perspectivas de futuro del eDNA prestando especial atención a aquellas relacionadas con el

estudio y conservación de los recursos naturales para finalmente cuantificar mediante análisis bibliométricos los trabajos que se han publicado hasta la fecha que hayan basado sus resultados en eDNA.

2. TÉCNICA Y ASPECTOS METODOLÓGICOS

El ADN ambiental es una técnica para la obtención de material genético proveniente del medio (ya sea suelo, agua o aire) para el estudio de las especies o poblaciones que habitan o han habitado en él [8], [9]. El término comenzó a utilizarse a principios de siglo a raíz de unas publicaciones en el área de Microbiología centradas en genómica de microorganismos no cultivados [10] y en la clonación del metagenoma del suelo [11]. Desde entonces el número de trabajos publicados que utilizan esta técnica ha aumentado exponencialmente (ver "Bibliometría") y siguen surgiendo nuevas aplicaciones.

Las técnicas de eDNA se encuentran estrechamente relacionadas con las metodologías para la identificación de especies mediante marcadores moleculares. Estas últimas pueden clasificarse en función de si se identifica una o varias especies simultáneamente (*barcoding* y *metabarcoding*, respectivamente) y el marcador molecular a utilizar dependerá del nivel taxonómico al que se quiera llegar en la identificación (Figura 1). Por tanto, el término *eDNA metabarcoding* se utiliza para el conjunto de técnicas moleculares que se utilizan para analizar muestras medioambientales en las cuales se tiende a identificar varios especímenes simultáneamente, pero cuya identificación suele llegar hasta niveles taxonómicos de género. Para tal fin se utilizan marcadores específicos (marcadores diseñados para un sistema de estudio determinado) ya que los considerados como genéricos (generalmente analizados y propuestos por el CBOL) suelen tener menor éxito de amplificación y, por tanto, plantean problemas técnicos en la secuenciación del material genético [8].

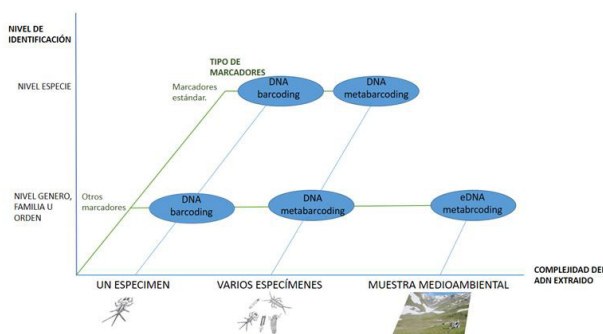


Figura 1. Terminología sugerida para la identificación taxonómica en función de los marcadores moleculares utilizados, el nivel de identificación y la complejidad del ADN extraído. Figura adaptada de [8].

La probabilidad de éxito del eDNA (entendida como la identificación de los especímenes presentes en la muestra original) aumentará siempre que se minimice la degradación del ADN desde la recolección de las muestras hasta el análisis de las mismas en el laboratorio. A continuación, se describen los aspectos clave en la conservación del ADN.

2.1. Muestreo

Una de las principales ventajas del eDNA es que las muestras se obtienen directamente del medio, sin necesidad de observarse a primera vista material biológico. Pueden recolectarse del suelo, agua o aire debido a la premisa de que todos los organismos se desprenden en algún momento de material genético a través de células epiteliales, excreciones, pelo, etc (Figura 2). Por ejemplo, se puede obtener el ADN localizado en muestras de suelo o agua siempre y cuando contengan restos biológicos tales como orina [12], heces [13], piel o cabello [14], hojarasca o los exudados de las raíces [15]. El eDNA forma parte de los denominados muestreos no invasivos, que son aquellos en los que no se interacciona directamente con la especie a analizar para recolectar la muestra [16]. La principal diferencia entre el eDNA con los muestreos no invasivos convencionales es que en el eDNA existe la incertidumbre sobre si existe material genético o no en la muestra recogida mientras que en el resto de muestreos no invasivos siempre se espera recoger algo de material genético aunque sea en concentraciones mínimas o degradado.

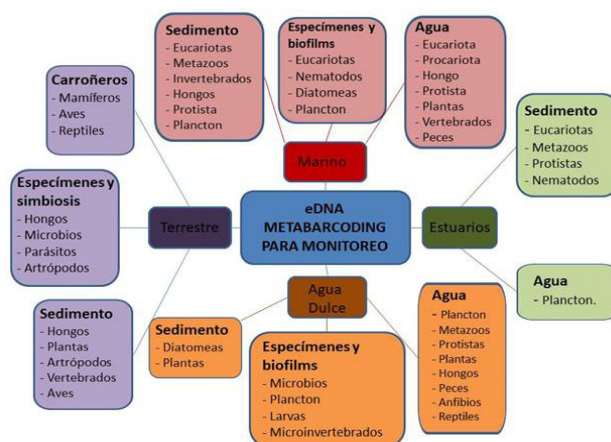


Figura 2. Monitorización de la biodiversidad a través de *eDNA metabarcoding* en diferentes sustratos. Las tonalidades rojas para ambientes marinos, las verdes para estuarios, las naranjas para sistemas de agua dulce y las moradas para terrestres. Figura modificada a partir de [9].

2.2. Conservación del material.

Existe una gran importancia en la conservación que haya tenido el material biológico (y, por tanto, el material genético) desde su liberación en el medio hasta que se recoge la muestra. Todo material orgánico se degrada paulatinamente, pero dependiendo de las condiciones de almacenamiento esta degradación será mayor o menor. Los parámetros que mayor repercusión tienen en la conservación del ADN son el tiempo y la temperatura a la que se conserva el material.

2.2.1. Tiempo

Existen dos etapas clave para la conservación de las muestras. El tiempo que transcurre desde que se libera la

muestra al medio hasta que es recolectada (primera etapa) varía según las condiciones físico-químicas del medio. Así por ejemplo, en aguas templadas las muestras pueden conservar el ADN durante semanas, frente a los miles de años en permafrost seco y frío [17]. Por esta razón, la técnica se ha utilizado en varias ocasiones para analizar diferentes grupos taxonómicos de ADN antiguo, logrando obtener material genético [18]. La conservación y transporte de las muestras una vez colectadas (segunda etapa) cobran especial importancia para la aplicación de las técnicas de eDNA, ya que la cantidad y calidad del material genético en las muestras (dependiendo del sustrato) suele ser menor que el disponible en el material biológico colectado directamente de los individuos. Un método de conservación no apropiado para el tipo de muestra a analizar, por tanto, podría causar una pérdida importante del ADN molde para seguir adelante con el muestreo genético. Existen hoy día numerosas metodologías para tratar de maximizar el rendimiento y calidad del ADN extraído que se deberán escoger con cautela en función del sustrato donde se haya realizado el muestreo (e.g. filtrado de muestras de aguas y/o aire y conservación en condiciones de luz, humedad y temperatura controladas). Las muestras obtenidas se pueden almacenar durante largos periodos de tiempo a baja temperatura, obteniendo como resultado un banco de muestras al que acceder cuando se quiera para volver a analizarlo [19].

2.2.2. Temperatura

Dependiendo de la naturaleza de la muestra, se puede recomendar la preparación para su almacenamiento en congeladores desde el momento en que las mismas sean colectadas. El protocolo de almacenamiento generalmente propuesto consiste en almacenar las muestras inmediatamente a 4°C y trasladarse a congeladores (-20°C) antes de haber pasado 48 horas (si se van a analizar a corto plazo) o a -80°C para ser analizado a largo plazo [19]. Se ha demostrado recientemente que las muestras de agua se podrían conservar a temperatura ambiente hasta 14 días antes de la degradación del ADN que impida su extracción y caracterización [20].

Existen dos protocolos para envíos que no tarden más de tres días de muestras que se vayan analizar en otro laboratorio. Por un lado, si las muestras se congelaron o liofilizaron se deben mantener en los congeladores a -20°C con el hielo seco que se utilizará para enviar hasta su destino. Por otro lado, las muestras conservadas en etanol al 75% se pueden mantener a temperatura ambiente [21]. Sin embargo, para determinados tipos de muestras (e.g. heces o determinados tipos de agua) [22] se recomienda no realizar la extracción de ADN nada más recolectarlas, sino almacenarlas por diferentes métodos de enfriamiento, secado [23] (pero ver Hartb, Bainarda, & Klironomosb (2010) como excepción para ADN fúngico), liofilización o adición de conservantes para posteriores análisis [19].

2.3. Análisis de las muestras

En función de la naturaleza de la muestra puede ser neces-

sario realizar un preprocesamiento antes de la extracción del ADN para mejorar la calidad de secuenciación [25]. Lear et al., (2018) recomiendan para estos preprocesamientos el uso de kits Qiagen DNeasy PowerSoil y PowerMax para la extracción de ADN de suelo, sedimento, heces y hojarascas, DNeasy PowerSoil para la extracción de ADN del tejido vegetal, DNeasy Blood y Tissue para la extracción en tejido animal en general y DNeasy PowerSoil para macroorganismos de agua y hielo.

Los estudios de eDNA pueden centrarse en una o varias especies (*Figura 1*), para lo cual se utilizan cebadores específicos o genéricos, respectivamente [17]. Los cebadores utilizados deben de tener una longitud en pares de bases lo suficientemente corta para poder unirse a fragmentos degradados de ADN que idealmente sean idénticas pero variables entre especies [26]. Para los trabajos de *eDNA metabarcoding*, por tanto, se recomienda i) multiplexar los cebadores (es decir, combinar varias parejas de cebadores en una misma reacción), ii) que los organismos que se intente identificar sean recíprocamente monofiléticos y, en la medida de lo posible, iii) que coincidan con las bases de datos existentes para los grupos taxonómicos que se quieran estudiar [27].

3. ADN AMBIENTAL EN LA ERA DE LA GENÓMICA

El avance de las tecnologías de secuenciación automática junto a la creciente necesidad de secuenciación masiva que minimice los tiempos y costes promovió el desarrollo de la denominada secuenciación masiva (*New Generation Sequencing*, NGS) [8]. Las técnicas NGS son un conjunto de técnicas de secuenciación genética de alto rendimiento que permiten secuenciar de forma rápida secuencias largas (Mb) del genoma y en paralelo (es decir, varias muestras simultáneamente). Con NGS se obtienen decenas de miles de pares de bases reduciendo a unas cuantas horas el tiempo que hasta hace pocos años requeriría meses de trabajo [28]. Por tanto, NGS ofrece un salto cualitativo y cuantitativo del rendimiento adquirido con las técnicas de secuenciación previas. Los secuenciadores NGS redujeron el tiempo empleado y aumentaron la longitud de los fragmentos secuenciados, todo ello a costes más reducidos (pasando de 10\$ por nucleótido en 1990 utilizando secuenciación automática de Sanger a 0,01\$ utilizando secuenciadores NGS en 2005), aumentando de este modo el rendimiento.

4. APLICACIONES DEL ADN AMBIENTAL

El número de estudios relacionados con el ADN ambiental creció de manera exponencial a partir de 2012, fundamentalmente por el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva y la competencia en el mercado de las distintas plataformas de secuenciación. Una consecuencia directa fue el aumento exponencial (ver Bibliometría) del número de aplicaciones de esta técnica a diversas disciplinas dentro de las Ciencias de la Vida. Todas tienen en común la misma finalidad (identificar especies o conocer sus hábitos -e.g. dieta-) y las difiere el contexto y apli-

cación de la metodología. Por ejemplo, una muestra de excremento se puede utilizar para identificar la dieta del animal que la defecó (análisis de dieta) o para identificar al propio animal que la defecó. En este último caso, la identificación taxonómica puede servir para contribuir a la conservación de unas especies [29], [30] o, por el contrario, para evitar en la medida de lo posible el establecimiento de otras no deseadas (e.g. especies invasoras). Con la información recogida se puede describir y analizar la distribución y diversidad de especies y comunidades [31] o identificar organismos que estén o hayan estado de tránsito y que pasen desapercibidos con las técnicas de muestreo tradicionales [19]. A continuación, se detallan algunas de las principales aplicaciones del eDNA transversales a las diferentes áreas dentro de las Ciencias de la Vida.

4.1. Ecosistemas antiguos

Conocer cómo fueron los ecosistemas en tiempos pasados y compararlos con los actuales resulta de utilidad para la gestión y conservación de la biodiversidad. Estas aplicaciones cobran especial interés en el marco de un mundo afectado por el cambio global y la amenaza de introducción de especies invasoras [9]. Por ejemplo, se pudo reconstruir la historia florística local en torno a un lago analizando el ADN sedimentario [32]. Francesco Ficetola y compañeros estudiaron [33] el impacto de una especie invasora animal (el conejo europeo) sobre las comunidades de plantas en las Islas Kerguelen (un remoto archipiélago subantártico). En este estudio, los autores monitorizaron el deterioro de las comunidades vegetales desde el momento en que trazas del ADN de una especie de conejo invasor comenzó a detectarse mediante muestreos y técnicas de eDNA. El eDNA también es útil para el análisis de la evolución en el tiempo de la dinámica ecológica en poblaciones, comunidades o ecosistemas [34].

En general, se recomienda la combinación de técnicas de *metabarcoding* junto a las de eDNA para minimizar errores asociados a ambas metodologías en el estudio y reconstrucciones de ecosistemas antiguos [35], [36], puesto que el tiempo y las diferencias climáticas provocan un aumento en la degradación del ADN.

4.2. Interacción planta-polinizador

Las especies polinizadoras son esenciales para la continuidad de la vida humana y su diversidad se está viendo reducida notablemente en las últimas décadas [9]. La aplicación de eDNA al estudio de las interacciones planta-polinizador ha contribuido a la conservación de ambos mutualistas, siendo el estudio del polen transportado por los polinizadores mediante eDNA la mayor contribución a esta aplicación. Las metodologías anteriores requieren de grandes inversiones de tiempo y esfuerzo debido a que se basaban en observaciones directas en el campo, además de requerir una gran formación y experiencia en identificación taxonómica de plantas a través del polen recolectado [9].

Un estudio comparativo entre los métodos tradicionales y

el *metabarcoding* concluyó que la aplicación del eDNA para los taxones más abundantes no suponía una gran ventaja, puesto que la coincidencia en los resultados entre ambos métodos era del 92% [37]. La verdadera contribución del eDNA se observó al considerar los taxones con menor representación relativa, puesto que la coincidencia entre ambos métodos se redujo por debajo del 50%, encontrando especies en un método que el otro omitía.

4.3. Análisis de dieta

Las técnicas tradicionales para el análisis de la dieta se basan en la identificación de especies utilizando material alimenticio parcial o totalmente digerido. Estas metodologías son especialmente complicadas en el estudio de dieta de especies raras, acuáticas o nocturnas (entre otros) debido a la dificultad de encontrar muestras de estas especies. [38]. Asimismo, la degradación parcial o total de los restos biológicos digeridos causa que la identificación de los mismos requiera de especialistas y, en numerosas ocasiones, sea imposible. La aplicación del *metabarcoding* al análisis de dieta se ha postulado como una técnica más fiable debido a la resolución taxonómica que se consigue a partir del material biológico obtenido en los restos de dietas [39]. Esta afirmación es más relevante aún en el estudio de herbívoros y depredadores donde la adición de un cebador especial de bloqueo a la PCR reduce la amplificación de ADN no diana. [40][41]. El eDNA permite, además, identificar especies incluso sin necesidad de encontrar trazas de material genético de estas sino, por ejemplo, identificando parásitos de las especies depredadas en la muestra. [42]

El eDNA no solo se ha utilizado para la caracterización de la dieta sino también para estudios relacionados con la ecología de la alimentación y el control de la alimentación suplementaria [43]. Además, la aplicación de técnicas de eDNA han mostrado su eficacia en el análisis de la capacidad de carga de un ecosistema. Por ejemplo, utilizando técnicas de eDNA, se concluyó que el aumento en el número de individuos de una especie en un ecosistema determinado agotaba los recursos alimenticios y tenía consecuencias negativas para el equilibrio ecosistémico [42].

4.4. Detección de especies invasoras

Las especies invasoras son aquellas que se encuentran fuera de su área de distribución natural y que pueden causar alteraciones en los ecosistemas. Se consideran, además, "exóticas" si han sido introducidas por el ser humano y suponen una de las mayores amenazas para los ecosistemas y biodiversidad [9]. Por ejemplo, las aguas de arrastre transportadas por grandes buques [44] fuerzan el movimiento de especies a regiones donde no se encontraban de forma natural, causando alteraciones de las interacciones ecológicas (especies acuáticas invasoras). Se realizó un muestreo en barco desde el Mar del Norte hasta los trópicos y analizaron las aguas de lastre en su viaje descubriendo que sí se transportaban especies que se consideran invasivas en sus áreas de introducción [45]. Ese

mismo año, se publicaron dos artículos donde se comparaban las técnicas tradicionales (monitoreo de rutina y análisis morfológicos visuales) con el *metabarcoding*, este último consiguió identificar un mayor número de especies [46], [47].

Uno de los mayores problemas para la erradicación de estas especies acuáticas invasoras es la dificultad para identificarlas en estados larvarios y juvenil, por lo que pasan desapercibidas en las primeras fases de invasión y dificultan enormemente su erradicación cuando existen adultos reproductores. [48]. El eDNA ofrece una detección temprana, permite identificar ADN aun estando en un porcentaje inferior al 0.5% del total de la muestra [48], tiene la capacidad de detectar taxones diferentes simultáneamente y se puede utilizar tanto en aguas dulces como en aguas saladas. Pese a esto, se recomienda precaución a la hora de interpretar los resultados y especialmente al cuantificar la biodiversidad utilizando información de presencia/ausencia de las especies [49] [48]. En la identificación de especies invasoras mediante eDNA son frecuentes los falsos positivos y negativos debido a la presencia de material genético de individuos muertos o errores en la resolución taxonómica (relacionados con la especificidad de los cebadores), entre otros [50]. Los errores en la identificación de especies pueden tener consecuencias negativas tanto en la inversión económica (dinero mal invertido) como en la gestión de los ecosistemas (falsos negativos de especies invasoras suelen finalizar con una invasión que se podría haber evitado) [51], [52].

4.5. Respuesta a la contaminación.

El eDNA también puede aplicarse al estudio de las respuestas del medio ambiente ante los cambios provocados por la contaminación. Se usa, además, para averiguar las probabilidades de una especie de sobrevivir o no a un contaminante y así obtener información sobre la gravedad del mismo [9]. Un claro ejemplo del efecto de los contaminantes sobre los ecosistemas y la biodiversidad es el efecto de las prospecciones petroleras sobre los ecosistemas marinos. Gracias a los estudios que utilizan eDNA se concluyó que los metazoos son los más afectados por la contaminación derivada de la actividad petrolífera, hallándose cambios en las estructuras de las comunidades existentes en el sedimento que rodea la plataforma, que incluían metazoos así como algunos taxones protistas [53].

Se ha observado, además, que existen bacterias que pueden utilizarse como bioindicadores, al sobrevivir en áreas expuestas a los hidrocarburos (que explotan como recurso trófico). La identificación de estas bacterias mediante eDNA permite categorizar el grado de contaminación de un área determinada [54]. Del mismo modo estudiaron las comunidades fúngicas y bacterianas de suelo de la rizosferas de sauces (*Salix* spp.) y del suelo de una antigua planta petroquímica, obteniendo como resultado cambios drásticos en las comunidades fúngicas y una disminución de la diversidad bacteriana [55]. Los residuos nucleares también son susceptibles de ser identificados e incluso cuantificados mediante eDNA. Así por

ejemplo, utilizaron las comunidades microbianas para cuantificar el grado de contaminación por residuos nucleares, y concluyeron, que estas comunidades microbianas pueden ser usadas como marcadores ambientales para evaluar el impacto de los residuos nucleares [56].

Otro ejemplo de la aplicación del eDNA para la evaluación del impacto ambiental causado por las actividades humanas es su aplicación para el estudio de las zonas aledañas a las piscifactorías. Pawlowski y colaboradores demostraron que los foraminíferos son un sistema de estudio óptimo para determinar el impacto de la acuicultura y otras actividades en el medio marino [57]. Entre otras conclusiones de su trabajo, mostraron que la riqueza específica (i.e. el número de especies) disminuía cuanto más cerca de la piscifactoría se estimara dicho índice. Las comunidades bacterianas pueden ser también buenas indicadoras del impacto producido por las piscifactorías, debido a que la composición bacteriana está muy relacionada con el enriquecimiento orgánico de la zona [58].

Los metales pesados destacan entre los contaminantes más agresivos y con mayor impacto ambiental. La microbiota del suelo es fundamental para su productividad y los efectos de la contaminación son determinantes para la estructura de estas comunidades. Azarbad y compañeros [59] estudiaron los efectos del zinc y plomo sobre la microbiota en un suelo contaminado y concluyeron que estos metales pesados afectaban a la estructura, pero no a la variabilidad taxonómica o la composición de la comunidad. El mercurio es otro de los metales más contaminantes en los suelos. Sus efectos sobre la biodiversidad se han demostrado tanto en medios terrestres [60] como marinos [61], en estudios centrados en las comunidades de hongos y foraminíferos bentónicos (respectivamente).

4.6. Análisis de la calidad del aire

La contribución del eDNA en el campo de la biomedicina ha sido especialmente notoria, puesto que las técnicas tradicionales son demasiado laboriosas y poco eficaces [62]. El análisis del aire se realiza tanto en ambientes naturales, como en ambientes cerrados (e.g. hospitales) [63] y suele centrarse en la caracterización del microbioma, comunidades fúngicas y/o polen en suspensión. El estudio del microbioma existente en el aire permite evaluar sus posibles efectos sobre la salud humana y el medio ambiente. Relacionado con el ámbito de la salud pública está el estudio de la diversidad taxonómica de las comunidades fúngicas en el aire por sus efectos tóxicos y/o alérgicos [64]. Los estudios anteriores al eDNA se centraban en las propiedades físicas y químicas y la mayoría de los datos existentes sobre las comunidades microbianas en el aire son a nivel familiar o de género y no dan información sobre sus potenciales alérgenos y patógenos. Por el contrario, con el eDNA sí se consigue identificar a nivel de especie. Al analizar el aire de Pekín durante un evento de smog fotoquímico se logró identificar la mayoría de los taxones llegando a nivel de especie y detectaron alérgenos y otros patógenos microbianos respiratorios [65].

El metabarcoding ha demostrado ser una herramienta

útil a la hora de identificar polen en el aire de muestras ambientales, por eso, Leontidou y colaboradores [66] propusieron un protocolo de preparación de muestras y extracción de ADN para el polen de muestreos de aire. Los autores concluyeron que el metabarcoding tiene una mayor resolución taxonómica incluso en muestras complejas.

4.7. Inconvenientes comunes para las aplicaciones

Existen algunas conclusiones transversales a todas las aplicaciones anteriormente descritas. Por un lado, si bien se observa una mayor resolución taxonómica con respecto a las técnicas tradicionales [64], [67] se recomienda que se usen conjuntamente debido al sesgo en la identificación inherente a cada técnica [35] [68][69]. En general, este sesgo suele deberse a que el eDNA identifica peor las moléculas encontradas en menor proporción debido al sesgo en la amplificación y secuenciación de ADN, problema que se está logrando solventar [48]. A modo de resumen, se puede afirmar que las aplicaciones del eDNA suelen verse limitadas por la propia generación de las bibliotecas genéticas, las tasas de degradación del ADN dependiendo de la especie y el sustrato muestreado y la contaminación de las muestras [9], [32], [70], [71] (Ver “Técnica y aspectos metodológicos”).

5. BIBLIOMETRÍA

El análisis del impacto del eDNA en materias relacionadas con los recursos naturales se realizó mediante un análisis bibliométrico de publicaciones en la base de datos *Web Of Science* (WoS) (www.webofknowledge.com). Dado que el número de publicaciones anteriores al año 1980 suponen un escaso 1.1% y que estas publicaciones no tienen una relación real con la técnica, se restringió la búsqueda al periodo de tiempo comprendido desde 1980 hasta la actualidad. Con estas palabras clave se obtuvieron 2867 publicaciones sin filtrar por el área de conocimiento (Figura 3). La extensión y aplicación del eDNA en el dominio de Ciencia y Tecnología queda constatado al observarse un importante crecimiento exponencial a lo largo de esta última década, llegando a cuantificarse en un 308.9% el incremento del número de publicaciones en el periodo de 2014 a 2018.



Figura 3. Publicaciones basadas en eDNA por años

El eDNA se ha utilizado de manera similar en las seis

áreas de conocimiento estudiadas (1958.14 ± 119.87) (media \pm desviación estándar), si bien destacan levemente las áreas de Biología ($n= 2174$) y Microbiología ($n= 2070$). Se seleccionaron las áreas de Biogeografía y Biodiversidad, Biología, Botánica, Cambio Climático, Ecología, Microbiología y Zoología) ya que son disciplinas basadas en las ciencias experimentales y, como tal se basan en datos recogidos de muestreos (Figura 4). Dado que en todas ellas se han descrito sesgos debido a errores de muestreo, es lógico, que sean también aquellas disciplinas que más hayan tratado de adaptar el eDNA a sus intereses.

6. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Dado que la obtención de genomas está siendo cada vez factible y económico, los trabajos ahora se dirigen a reducir las tasas de error de secuenciación, mejorar las técnicas bioinformáticas que permitan ensamblar las secuencias obtenidas y a las mejoras tecnológicas. Ya existen algunos de estos instrumentos como el “Biomeme two3” de la empresa “Biomeme, Inc.”, un dispositivo para PCR de mano con la capacidad de detectar hasta tres taxones diferentes [73] o secuenciadores masivos como los desarrollados por la empresa británica “Oxford Nanopore” que ya ha comercializado “MinION”, un secuenciador masivo del tamaño de una memoria USB.

La importancia de reducir el tamaño hasta poder utilizarlo como material portátil, que puedan detectar, amplificar e incluso secuenciar eDNA, resulta útil sobre todo en entornos remotos [74]. La reducción en el tamaño de los dispositivos permitiría realizar muestreos de eDNA de forma automática (como las boyas de muestreo de derrames de petróleo), combinando la tecnología para transmitir datos en vivo con el proyecto de mapeo en 3D de la superficie de la Tierra. Esto, llevado a gran escala, permitirá realizar muestreos remotos a lugares inaccesibles, como el Ártico o las profundidades de los océanos.

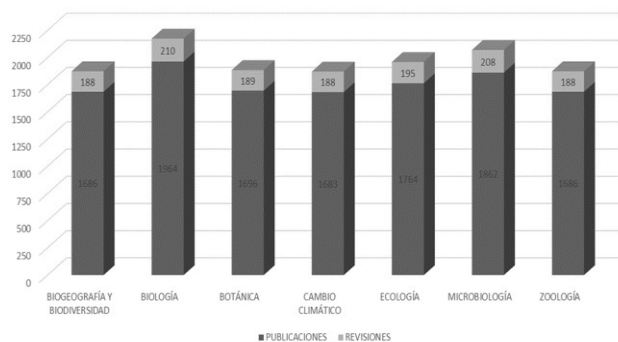


Figura 4. Número de publicaciones y revisiones por área de conocimiento indexadas en WoS desde 1980

REFERENCIAS

- [1] R. Nathan *et al.*, “A movement ecology paradigm for unifying organismal movement research,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 49. pp. 19052–19059, 09-Dec-2008.
- [2] A. J. Piaggio *et al.*, “Detecting an elusive invasive species: a

- diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA," *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 14, no. 2, pp. 374–380, Mar. 2014.
- [3] C. P. Meyer and G. Paulay, "DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling," *PLoS Biol.*, vol. 3, no. 12, pp. 1–10, Nov. 2005.
- [4] J. Theuerkauf, S. Rouys, and C. Chatreau, "Mortality of radio-tracked wild rats in relation to transmitter weight and resilience of transmitters in relation to their design," *J. R. Soc. New Zeal.*, vol. 37, no. 3, pp. 85–90, 2007.
- [5] P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. DeWaard, "Biological identifications through DNA barcodes," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 270, no. 1512, pp. 313–321, Feb. 2003.
- [6] S. Ratnasingham and P. D. N. Hebert, "BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding," *Mol. Ecol. Notes*, vol. 7, no. 3, pp. 355–364, Jan. 2007.
- [7] K. Bohmann *et al.*, "Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring," *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 29, no. 6, pp. 358–367, 2014.
- [8] P. Taberlet, E. Coissac, M. Hajibabaei, and L. H. Rieseberg, "Environmental DNA," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1789–1793, Apr. 2012.
- [9] K. M. Ruppert, R. J. Kline, and M. S. Rahman, "Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA," *Global Ecology and Conservation*, vol. 17, Elsevier, p. e00547, 01-Jan-2019.
- [10] J. Handelsman, "Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 68, no. 4, pp. 669–685, 2004.
- [11] M. R. Rondon *et al.*, "Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 6, pp. 2541–2547, 2000.
- [12] N. Valiere and P. Taberlet, "Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification," *Mol. Ecol.*, vol. 9, no. 12, pp. 2150–2152, Dec. 2000.
- [13] N. Kurose, R. Masuda, and M. Tataru, "Fecal DNA Analysis for Identifying Species and Sex of Sympatric Carnivores: A Noninvasive Method for Conservation on the Tsushima Islands, Japan," *J. Hered.*, no. 6, pp. 688–697, 2005.
- [14] P. Henry and M. A. Russello, "Obtaining high-quality DNA from elusive small mammals using low-tech hair snares," *Eur. J. Wildl. Res.*, vol. 57, no. 3, pp. 429–435, Jun. 2011.
- [15] N. G. Yoccoz *et al.*, "DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 15, pp. 3647–3655, Aug. 2012.
- [16] P. Taberlet and G. Luikart, "Non-invasive genetic sampling and individual identification," in *Biological Journal of the Linnean Society*, 1999, vol. 68, no. 1–2, pp. 41–55.
- [17] P. F. Thomsen and E. Willerslev, "Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity," *Biological Conservation*, vol. 183, Elsevier, pp. 4–18, 01-Mar-2015.
- [18] P. F. Thomsen *et al.*, "Non-destructive sampling of ancient insect DNA," *PLoS One*, vol. 4, no. 4, 2009.
- [19] G. Lear *et al.*, "Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples," *N. Z. J. Ecol.*, 2018.
- [20] B. J. Wegleitner, C. L. Jerde, A. Tucker, W. L. Chadderton, and A. R. Mahon, "Long duration, room temperature preservation of filtered eDNA samples," *Conserv. Genet. Resour.*, vol. 7, no. 4, pp. 789–791, Dec. 2015.
- [21] D. Straube and A. Juen, "Storage and shipping of tissue samples for DNA analyses: A case study on earthworms," *Eur. J. Soil Biol.*, vol. 57, pp. 13–18, Jul. 2013.
- [22] J. Spens *et al.*, "Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter," *Methods Ecol. Evol.*, vol. 8, no. 5, pp. 635–645, 2017.
- [23] A. M. Nsubuga, M. M. Robbins, A. D. Roeder, P. A. Morin, C. Boesch, and L. Vigilant, "Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method," *Mol. Ecol.*, vol. 13, no. 7, pp. 2089–2094, May 2004.
- [24] M. M. Hartb, L. D. Bainarda, and J. N. Klironomosb, "Differential effect of sample preservation methods on plant and arbuscular mycorrhizal fungal DNA," *J. Microbiol. Methods*, vol. Volume 82, 2010.
- [25] C. Wittwer, C. Nowak, D. A. Strand, T. Vrålstad, M. Thines, and S. Stoll, "Comparison of two water sampling approaches for eDNA-based crayfish plague detection," *Limnologica*, vol. 70, pp. 1–9, May 2018.
- [26] L. S. Epp *et al.*, "New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: Potential for studying past and present ecosystems," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1821–1833, Apr. 2012.
- [27] A. J. Drummond *et al.*, "Evaluating a multigene environmental DNA approach for biodiversity assessment," *Gigascience*, vol. 4, no. 1, p. 46, Dec. 2015.
- [28] S. Shokralla, J. L. Spall, J. F. Gibson, and M. Hajibabaei, "Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research," *Molecular Ecology*, vol. 21, no. 8, pp. 1794–1805, 2012.
- [29] C. Qu and K. A. Stewart, "Evaluating monitoring options for conservation: comparing traditional and environmental DNA tools for a critically endangered mammal," *Sci. Nat.*, vol. 106, no. 3–4, p. 9, Apr. 2019.
- [30] J. Biggs *et al.*, "Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*)," 2015.
- [31] K. Bohmann *et al.*, "Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring," *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 29, no. 6, Elsevier Current Trends, pp. 358–367, 01-Jun-2014.
- [32] M. W. Pedersen *et al.*, "A comparative study of ancient environmental DNA to pollen and macrofossils from lake sediments reveals taxonomic overlap and additional plant taxa," *Quat. Sci. Rev.*, vol. 75, pp. 161–168, Sep. 2013.
- [33] G. F. Ficetola *et al.*, "DNA from lake sediments reveals long-term ecosystem changes after a biological invasion," *Sci. Adv.*, vol. 4, no. 5, May 2018.
- [34] M. Bálint *et al.*, "Environmental DNA Time Series in Ecology," *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 33, no. 12, Elsevier Ltd, pp. 945–957, 01-Dec-2018.
- [35] T. Jørgensen *et al.*, "Islands in the ice: Detecting past vegetation on Greenlandic nunataks using historical records and sedimentary ancient DNA Meta-barcoding," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1980–1988, Apr. 2012.
- [36] J. H. Sonstebo *et al.*, "Using next-generation sequencing for molecular reconstruction of past Arctic vegetation and climate," *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 10, no. 6, pp. 1009–1018, Nov. 2010.
- [37] J. Hawkins *et al.*, "Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: A new tool for investigating honey bee foraging preferences," *PLoS One*, vol. 10, no. 8, Aug. 2015.
- [38] S. Boyer, S. D. Wratten, A. Holyoake, J. Abdelkrim, and R. H. Cruickshank, "Using Next-Generation Sequencing to Analyse the Diet of a Highly Endangered Land Snail (*Powelliphanta*

- augusta) Feeding on Endemic Earthworms," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, Sep. 2013.
- [39] N. Guilleraut, S. Bouletreau, A. Iribar, A. Valentini, and F. Santoul, "Application of DNA metabarcoding on faeces to identify European catfish *Silurus glanis* diet," *J. Fish Biol.*, vol. 90, no. 5, pp. 2214–2219, May 2017.
- [40] H. Vestheim and S. N. Jarman, "Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples - A case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs," *Front. Zool.*, vol. 5, 2008.
- [41] J. C. McInnes, R. Alderman, B. E. Deagle, M. A. Lea, B. Raymond, and S. N. Jarman, "Optimised scat collection protocols for dietary DNA metabarcoding in vertebrates," *Methods Ecol. Evol.*, vol. 8, no. 2, pp. 192–202, Feb. 2017.
- [42] E. Jakubavičiute, U. Bergström, J. S. Eklöf, Q. Haenel, and S. J. Bourlat, "DNA metabarcoding reveals diverse diet of the three-spined stickleback in a coastal ecosystem," *PLoS One*, vol. 12, no. 10, Oct. 2017.
- [43] R. Kowalczyk *et al.*, "Influence of management practices on large herbivore diet-Case of European bison in Białowieza Primeval Forest (Poland)," *For. Ecol. Manage.*, vol. 261, no. 4, pp. 821–828, Feb. 2011.
- [44] W. A. Gerhard and C. K. Gunsch, "Metabarcoding and machine learning analysis of environmental DNA in ballast water arriving to hub ports," 2019.
- [45] A. Ardura, A. Zaiko, J. L. Martinez, A. Samuiloviene, Y. Borrell, and E. Garcia-Vazquez, "Environmental DNA evidence of transfer of North Sea molluscs across tropical waters through ballast water," *J. Molluscan Stud.*, vol. 81, no. 4, pp. 495–501, 2015.
- [46] A. Zaiko, A. Samuiloviene, A. Ardura, and E. Garcia-Vazquez, "Metabarcoding approach for nonindigenous species surveillance in marine coastal waters," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 100, no. 1, pp. 53–59, Nov. 2015.
- [47] A. Zaiko, J. L. Martinez, J. Schmidt-Petersen, D. Ribicic, A. Samuiloviene, and E. Garcia-Vazquez, "Metabarcoding approach for the ballast water surveillance - An advantageous solution or an awkward challenge?," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 92, no. 1–2, pp. 25–34, Mar. 2015.
- [48] X. Pochon, N. J. Bott, K. F. Smith, and S. A. Wood, "Evaluating Detection Limits of Next-Generation Sequencing for the Surveillance and Monitoring of International Marine Pests," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, Sep. 2013.
- [49] C. Hatzenbuehler, J. R. Kelly, J. Martinson, S. Okum, and E. Pilgrim, "Sensitivity and accuracy of high-throughput metabarcoding methods for early detection of invasive fish species," *Sci. Rep.*, vol. 7, Apr. 2017.
- [50] L. M. Fletcher *et al.*, "Bilge water as a vector for the spread of marine pests: a morphological, metabarcoding and experimental assessment," *Biol. Invasions*, vol. 19, no. 10, pp. 2851–2867, Oct. 2017.
- [51] J. A. Darling and A. R. Mahon, "From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments," *Environ. Res.*, vol. 111, no. 7, pp. 978–988, Oct. 2011.
- [52] G. F. Ficetola *et al.*, "Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data," *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 15, no. 3, pp. 543–556, May 2015.
- [53] A. Lanzén, K. Lekang, I. Jonassen, E. M. Thompson, and C. Troedsson, "High-throughput metabarcoding of eukaryotic diversity for environmental monitoring of offshore oil-drilling activities," *Mol. Ecol.*, vol. 25, no. 17, pp. 4392–4406, Sep. 2016.
- [54] O. Laroche, S. A. Wood, L. A. Tremblay, J. I. Ellis, G. Lear, and X. Pochon, "A cross-taxa study using environmental DNA/RNA metabarcoding to measure biological impacts of offshore oil and gas drilling and production operations," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 127, pp. 97–107, Feb. 2018.
- [55] T. H. Bell *et al.*, "Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny," *ISME J.*, vol. 8, no. 2, pp. 331–343, Feb. 2014.
- [56] M. B. Smith *et al.*, "Natural bacterial communities serve as quantitative geochemical biosensors," *MBio*, vol. 6, no. 3, pp. 1–13, May 2015.
- [57] J. Pawlowski, P. Esling, F. Lejzerowicz, T. Cedhagen, and T. A. Wilding, "Environmental monitoring through protist next-generation sequencing metabarcoding: Assessing the impact of fish farming on benthic foraminifera communities," *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 14, no. 6, pp. 1129–1140, Nov. 2014.
- [58] E. Dowle, X. Pochon, N. Keeley, and S. A. Wood, "Assessing the effects of salmon farming seabed enrichment using bacterial community diversity and high-throughput sequencing," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 91, no. 8, 2015.
- [59] H. Azarbad *et al.*, "Microbial community composition and functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 91, no. 1, 2015.
- [60] A. Durand, F. Maillard, J. Foulon, H. S. Gweon, B. Valot, and M. Chalot, "Environmental Metabarcoding Reveals Contrasting Belowground and Aboveground Fungal Communities from Poplar at a Hg Phytomanagement Site," *Microb. Ecol.*, vol. 74, no. 4, pp. 795–809, Nov. 2017.
- [61] F. Frontalini *et al.*, "Assessing the effect of mercury pollution on cultured benthic foraminifera community using morphological and eDNA metabarcoding approaches," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 129, no. 2, pp. 512–524, Apr. 2018.
- [62] K. Kraaijeveld *et al.*, "Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing," *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 15, no. 1, pp. 8–16, Jan. 2015.
- [63] X. Tong *et al.*, "High diversity of airborne fungi in the hospital environment as revealed by meta-sequencing-based microbiome analysis," *Sci. Rep.*, vol. 7, Jan. 2017.
- [64] E. Banchi *et al.*, "DNA metabarcoding uncovers fungal diversity of mixed airborne samples in Italy," *PLoS One*, vol. 13, no. 3, Mar. 2018.
- [65] C. Cao *et al.*, "Inhalable microorganisms in Beijing's PM2.5 and PM10 pollutants during a severe smog event," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 48, no. 3, pp. 1499–1507, Feb. 2014.
- [66] K. Leontidou, C. Vernesi, J. De Groeve, F. Cristofolini, D. Vokou, and A. Cristofori, "DNA metabarcoding of airborne pollen: new protocols for improved taxonomic identification of environmental samples," *Aerobiologia (Bologna)*, vol. 34, no. 1, pp. 63–74, Mar. 2018.
- [67] S. Boessenkool *et al.*, "Use of ancient sedimentary DNA as a novel conservation tool for high-altitude tropical biodiversity," *Conserv. Biol.*, vol. 28, no. 2, pp. 446–455, 2014.
- [68] R. T. Richardson, C. Lin, J. O. Quijia, N. S. Riusech, K. Goodell, and R. M. Johnson, "Rank-based characterization of pollen assemblages collected by honey bees using a multi-locus metabarcoding approach," *Appl. Plant Sci.*, vol. 3, no. 11, p. 1500043, Nov. 2015.
- [69] R. T. Richardson, C.-H. Lin, D. B. Sponsler, J. O. Quijia, K. Goodell, and R. M. Johnson, "Application of ITS2 Metabarcoding to Determine the Provenance of Pollen Collected by Honey Bees in an Agroecosystem," *Appl. Plant Sci.*, vol. 3, no. 1, p. 1400066, Jan. 2015.
- [70] E. Bellemain *et al.*, "Fungal palaeodiversity revealed using high-throughput metabarcoding of ancient DNA from arctic

- permafrost," *Environ. Microbiol.*, vol. 15, no. 4, pp. 1176–1189, Apr. 2013.
- [71] S. Boessenkool *et al.*, "Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1806–1815, Apr. 2012.
- [72] S. Boessenkool *et al.*, "Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1806–1815, Apr. 2012.
- [73] A. A. Coble, C. A. Flinders, J. A. Homyack, B. E. Penaluna, R. C. Cronn, and K. Weitemier, "eDNA as a tool for identifying freshwater species in sustainable forestry: A critical review and potential future applications," *Sci. Total Environ.*, vol. 649, pp. 1157–1170, Feb. 2019.
- [74] J. A. Russell, B. Campos, J. Stone, E. M. Blosser, N. Burkett-Cadena, and J. L. Jacobs, "Unbiased Strain-Typing of Arbovirus Directly from Mosquitoes Using Nanopore Sequencing: A Field-forward Biosurveillance Protocol," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018.



Amador Huerta Vela obtuvo el título de de Técnico Superior de Laboratorio de Diagnóstico Clínico y se graduó en 2020 en Ciencias Ambientales por la Universidad de Cádiz. Este artículo es una adaptación de su trabajo de fin de grado.



Alejandro Centeno-Cuadros es Doctor en Biología y profesor en el Área de Genética de la Universidad de Cádiz. Sus intereses de investigación se centran en la aplicación de técnicas moleculares al estudio de los patrones de cambio evolutivo a nivel genómico y al estudio y conservación de la biodiversidad.