



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS AISLADAS DE ECOSISTEMAS  
DULCEACUÍCOLAS DE LA SIERRA Y AMAZONÍA DEL ECUADOR  
MEDIANTE EL SISTEMA DE CÓDIGO DE BARRAS DE ADN

“Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología”

Profesora guía:

MSc. María Alejandra Cruz Salazar

Autora:

Paulina Isabel Terán Amores

Año:

2019

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

"Declaro haber dirigido el trabajo, Identificación de microalgas aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la Sierra y Amazonía del Ecuador mediante el sistema de código de barras de ADN, a través de reuniones periódicas con la estudiante Paulina Isabel Terán Amores, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

María Alejandra Cruz Salazar

Máster en Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología

CI: 1719928572

## **DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO**

“Declaro haber dirigido científicamente a la estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

---

María Cristina Guamán Burneo  
Máster en Microbiología Industrial  
CI:1103959513

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

"Declaro haber revisado este trabajo, Identificación de microalgas aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la Sierra y Amazonía del Ecuador mediante el sistema de código de barras de ADN, de Paulina Isabel Terán Amores, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

María Isabel Ballesteros Redondo

Doctora en Biología

CI: 1757168610

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Paulina Isabel Terán Amores

CI: 1725050809

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis más sinceros agradecimientos a las docentes: Cristina Guamán Burneo, Nory González, Alejandra Cruz y María Isabel Ballesteros, por brindarme la oportunidad de ser parte del equipo y por guiarme durante la ejecución y redacción del presente trabajo de titulación con sus conocimientos y experiencia.

A la Dirección General de Investigación por su gestión y apoyo al proyecto.

## **DEDICATORIA**

A mi familia por su incondicional apoyo en mi crecimiento personal y académico.

A mis amigos: Marito, May, Gis y Ale, por su compañía, motivación e inspiración.

## RESUMEN

Las microalgas comprenden un grupo polifilético de microorganismos fotosintéticos cuya identificación morfológica es de alta complejidad ante la presencia de los mismos caracteres en múltiples taxones y cambios morfológicos dependientes de fases de ciclos vitales y entornos de crecimiento. Como alternativa destaca el Sistema de Código de Barras de ADN, basado en la comparación de secuencias de regiones estandarizadas del ADN de un individuo con las existentes en bases de datos. Dada la reproducibilidad y facilidad de interpretación de resultados, el Sistema de Código de Barras fue seleccionado para identificar microalgas procariotas y eucariotas aisladas de ecosistemas de agua dulce. Como regiones estandarizadas para la identificación de cianobacterias, se emplearon fragmentos del gen de ARNr 16S (615 pb) y del Espaciador Interno Transcrito (ITS) 16S-23S (92-159 pb), infiriéndose dos unidades taxonómicas operativas moleculares (MOTUs), microscópicamente diferentes. Para la identificación de microalgas eucariotas, se analizaron fragmentos parciales de las regiones V1-V3 (525-527 pb) y V4 (282-285 pb) del ARNr 18S, a partir de las cuales se infirieron diez MOTUs en los cultivos analizados. Los organismos con evidentes diferencias nucleotídicas y morfológicas se discriminaron adecuadamente. En contraste, ante la presencia de especies crípticas y el espectro de especificidad de los cebadores, no se logró una clasificación óptima de varios miembros de las familias Scenedesmaceae y Trebouxiophyceae. Si bien, el análisis de otras regiones del genoma o plastoma permitiría una mayor discriminación a nivel de taxones inferiores, el uso del cistrón de ARNr aún no puede descartarse ya que su universalidad facilita el diseño de cebadores de amplio espectro, aplicables a la gama de organismos analizados. A su vez, hay más secuencias de ARNr en las bases de datos. En general, los resultados obtenidos corroboran que por sí solo el análisis de secuencias no es un criterio definitivo para la correcta asignación de organismos y que debe acompañarse de la evaluación de expertos en taxonomía, registros geográficos y pruebas fisiológicas.



**Palabras clave:** Microalgas, identificación molecular, taxonomía, ARN ribosomal, unidad operativa taxonómica molecular.

## ABSTRACT

Microalgae comprise a polyphyletic group of photosynthetic microorganisms whose morphological identification represents many challenges such as presence of same characters in different taxa and morphologic variation among life stages and environmental conditions. In contrast, DNA Barcoding is considered an accurate and easy-to-interpret alternative for classification of organisms. It is based on comparisons between sequences of standardized DNA regions of the target organism with sequences previously submitted to databases. Hence, a DNA Barcoding approach was chosen for identification of prokaryotic and eukaryotic freshwater microalgae. As standardized regions for identification of cyanobacteria, partial sequences of 16S rRNA 16S (615 bp) gene and 16S-23S Internal Transcribed Spacer (92-159 bp), were employed and two molecular operational taxonomic units (MOTUs) were successfully demarcated and microscopically distinguished. For identification of eukaryotic microalgae, partial fragments of V1-V3 (525-527 bp) and V4 (282-285 bp) zones of 18S rRNA gene were assessed, distinguishing ten MOTUs among analyzed isolates. Organisms with higher nucleotide and morphological differences were adequately discriminated. In contrast, the presence of cryptic species and the broad coverage of primers impeded an optimal classification of individuals belonging to Scenedesmeaceae and Trebouxiophyceae families. The analysis of another DNA fragments, either from genome or plastome, could improve discrimination at lower taxonomic levels. Nevertheless, the use of rRNA as a barcode can't be completely discarded due to the ease of design and use of universal primers with total amplification success for analyzed specimens. Besides, rRNA sequences are more common on public datasets. In general terms, results corroborate that sequence analysis is not a definitive criterion for the proper classification of organisms and it must be complemented by assessment of taxonomy experts, geographic registers and physiological tests.

**Key words:** Microalgae, molecular identification, taxonomy, ribosomal RNA, molecular operational taxonomic unit.

# ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Problemática.....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo General.....	4
1.3.2. Objetivos Específicos.....	4
1.4. Justificación.....	4
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Aspectos generales de las microalgas.....	5
2.2. Aplicaciones comerciales de las microalgas y sus derivados..	6
2.3. Diversidad y clasificación de las microalgas.....	7
2.3.1. Phylum Cyanophyta.....	7
2.3.1.1. Clase Cyanophyceae.....	7
2.3.2. Phylum Chlorophyta.....	7
2.3.2.1. Clase Chlorophyceae.....	8
2.3.2.2. Clase Ulvophyceae.....	8
2.3.2.3. Clase Trebouxiophyceae.....	8
2.4. Identificación de organismos mediante el Sistema de Códigos de Barra.....	9
2.4.1. Regiones Código de Barra.....	10
2.4.1.1. Gen del ARN de la subunidad menor del ribosoma.....	10
2.4.2. Bases de datos.....	12
2.4.2.2. Base de datos taxonómica del NCBI.....	13
2.4.3. Clasificación automatizada de organismos.....	13
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL....	15
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS.....	16
4.1. Muestra biológica.....	16

4.1.1. Cultivo de microalgas .....	16
4.1.1.1. Medios de cultivo .....	16
4.1.1.2. Reactivación de microalgas criopreservadas.....	16
4.2. Identificación molecular .....	17
4.2.1. Extracción de ADN.....	17
4.2.1.1. Extracción manual .....	17
4.2.1.2. Extracción con kit Purelink™ Genomic DNA.....	17
4.2.2. Verificación de la calidad de ADN.....	18
4.2.2.1. Cuantificación espectrofotométrica .....	18
4.2.2.2. Electroforesis de ADN.....	18
4.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	19
4.2.3.1. Visualización de productos de amplificación .....	23
4.2.4. Secuenciación.....	23
4.2.5. Análisis de secuencias.....	23
4.3. Identificación morfológica.....	24
<b>5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
5.1. Extracción de ADN .....	24
5.2. Validación de PCR .....	25
5.3. Identificación de cianobacterias .....	27
5.3.1. Análisis de regiones parciales de ARNr 16S e ITS 16S-23S .....	27
5.3.2. Búsqueda de secuencias en GenBank .....	27
5.3.3. Comparación de observaciones microscópicas y bases de datos ...	29
5.3.3.1. MOTU Y-001.....	29
5.3.3.2. MOTU Y-002.....	30
5.3.3.3. Inconvenientes de la técnica.....	30
5.4. Identificación de microalgas eucariotas .....	32
5.4.1. Análisis de regiones parciales de ARNr 18S.....	32
5.4.2. Búsqueda de secuencias en GenBank .....	33
5.4.3. Análisis ABGD.....	35

5.4.4. Comparación de observaciones microscópicas, bases de datos y clasificación ABGD .....	35
5.4.4.1. MOTUs M-001 y M-002 (Grupo I) .....	35
5.4.4.2. MOTUs M-003 y M-004 (Grupo II) .....	37
5.4.4.3. MOTU M-005 (Grupo III).....	38
5.4.4.4. MOTUs M-006, M-007, M-008 y M-009 (Grupo IV).....	41
5.4.4.5. MOTU M-010 (Grupo V) .....	43
5.4.4.6. Inconvenientes de la técnica.....	45
5.4.5. Otros marcadores evaluados .....	47
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>49</b>
6.1. Conclusiones .....	49
6.2. Recomendaciones.....	50
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>69</b>

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

Las microalgas conforman un amplio y diverso grupo de seres microscópicos unicelulares con una historia evolutiva de más de 3.5 billones de años (Krishna Koyande et al., 2019, p. 16). Estos microorganismos se han adaptado a hábitats extremos y competitivos caracterizados por altos índices de radiación, estrés oxidativo, temperaturas extremas, salinidad, presión osmótica, limitación de nutrientes y con presencia de consumidores, competidores o patógenos (Falaise et al., 2016; Hopes y Mock, 2015).

Para asegurar su supervivencia, las microalgas han desarrollado varios mecanismos de defensa como la síntesis de metabolitos complejos, sean ácidos grasos, polisacáridos, terpenos, terpenoides, indoles, esteroides, fenoles o alcoholes de potencial interés biotecnológico (Rizwan et al., 2018, pp. 394–397; Shannon y Abu-Ghannam, 2016). Por ende, diferentes centros de investigación se han interesado en el aislamiento, estudio y preservación de estos microorganismos con fines de identificación y bioprospección (Duong et al., 2012, p. 1836; Yalçın-Duygu et al., 2017, pp. 80–82).

Convencionalmente, la clasificación e identificación de microalgas se ha efectuado mediante la observación microscópica de células vegetativas, tomando en cuenta criterios como forma, tamaño, posición de cloroplastos, presencia de flagelos u otras características estructurales (Skaloud et al., 2005, pp. 261–268; Zou et al., 2016). Adicionalmente, se consideran caracteres fisiológicos y parámetros físico-químicos del entorno de aislamiento como pH, temperatura, sólidos disueltos y conductividad (Alonso et al., 2012, p. 848; Guamán-Burneo y González, 2016, pp. 19–21).

A fin de simplificar y complementar la clasificación taxonómica se han implementado técnicas moleculares como digestión con enzimas de restricción

y el Sistema de Códigos de Barra de ADN (Rezaei-Matehkolaei et al., 2011, p. 83).

La digestión con enzimas de restricción permite distinguir de forma inmediata entre individuos según patrones de fragmentos de ADN de diferente peso molecular (Newby et al., pp. 271–272). En contraste, el Sistema de Código de Barras consiste en el análisis de las secuencias de segmentos cortos de regiones estandarizadas del genoma (Hebert et al., 2003, p. 313; Kress y Erickson, 2012, pp. 3–7). Las regiones seleccionadas deben poseer un alto poder de discriminación y ser detectables mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con cebadores universales (Kress y Erickson, 2008, pp. 2761).

El uso de los Códigos de Barras y la generación de bases de datos con secuencias de referencia de controles positivos, han demostrado ser prometedores para la identificación de microalgas y evaluación de diversidad de comunidades de fitoplancton (Alemzadeh et al., 2014, p. 297; Manoylov, 2014, pp. 409–410). A la fecha, la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Benson et al., 2007, pp. D21–D25) cuenta con 1119175 registros de secuencias de clorofitas y 1466455 de cianobacterias mientras que, en la base de datos del Consorcio del Código de Barras de la Vida (Ratnasingham y Hebert, 2007) se han publicado 6667 registros y secuencias de clorofitas y 50 de cianobacterias.

Diferentes porciones conservadas y variables de los genes de la subunidad menor del ribosoma (ARNr 18S y 16S) han sido frecuentemente empleadas para clasificación taxonómica a nivel de género con éxitos de identificación del 90 % (Manoylov, 2014, p. 417; Wang et al., 2014). Otros marcadores comunes en microalgas son los Espaciadores Internos Transcritos (ITS, por sus siglas en inglés) y los genes de la subunidad grande de la ribulosa bisfosfato carboxilasa (*rbcL*), citocromo oxidasa 1 (COX1) y el factor de elongación plastídico (*tufA*) (Hadi et al., 2016; Radha et al., 2013, pp. 610–612).



## 1.2. Problemática

Se conoce que existen alrededor de 200000 especies de microalgas con amplia diversidad genética y fenotípica asociadas a su ubicuidad y adaptaciones (Singh y Saxena, 2015, p. 12). Incluso, se estima que el número de especies no descritas o no clasificadas es hasta ocho veces mayor al reportado (Gimpel et al., 2015).

En Ecuador, son escasos los estudios de muestreo e identificación de microalgas de ecosistemas lacustres y consecuentemente, los esfuerzos de obtención de cultivos axénicos. Dichas etapas son cruciales para dar inicio a la exploración del potencial biotecnológico de las microalgas (Guamán-Burneo y González, 2016, p. 13; Morales et al., 2013, pp. 130–131).

La identificación morfológica demanda profesionales altamente capacitados y equipos de microscopía con alto poder de resolución y elevado costo (Bik, 2017; Manoylov, 2014, p. 411). Sin embargo, inclusive expertos en taxonomía discrepan en la clasificación del mismo organismo ante la plasticidad de fenotipos, la variedad de estadíos, la similitud morfológica entre especies y la dificultad de visualización de ejemplares envueltos en matrices gelatinosas (Bellinger y Sigee, 2010, p. 9; Malavasi et al., 2016).

Por otra parte, el uso de enzimas de restricción representa inconvenientes para la identificación de microalgas ante la posibilidad de que diferentes individuos presenten los mismos sitios de restricción (Newby et al., 2009, p. 275). Además, no existen bases de datos especializadas en microalgas para la selección de enzimas de restricción como las diseñadas para otros organismos (p. ej. Restriction Mapper para levaduras).

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Identificar microalgas aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la Sierra y Amazonía del Ecuador mediante el Sistema de Código de Barras de ADN

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Evaluar la efectividad de diferentes fragmentos de ADN para la identificación de microalgas aisladas de ecosistemas dulceacuícolas.
- Comparar la información molecular obtenida con la morfología de las microalgas aisladas.

### **1.4. Justificación**

La relevancia de la presente propuesta radica en que las microalgas y sus metabolitos han despertado el interés de centros de investigación y de la industria en los últimos años. Además, destacan frente a otros organismos explotados en la industria por su fácil cultivo y mantenimiento, metabolismo fotosintético, alta eficiencia de fijación de carbono, rápido crecimiento en medios basales o aguas residuales, tolerancia a diferentes tipos de estrés y no requerimiento de tierra fértil para su escalamiento (Parmar et al., 2011, pp. 10163–10164; Trentacoste et al., 2015, p. 306).

Uno de los objetivos de la investigación es la identificación de las microalgas aisladas de diferentes ecosistemas lacustres, con el propósito de conocer no sólo los especímenes presentes, sino los más susceptibles de aislarse en condiciones de laboratorio y potencialmente emplearse a futuro en estudios de bioprospección.

Para contribuir a tal fin, se utilizarán herramientas moleculares que prometen superar los inconvenientes asociados a la clasificación taxonómica de microalgas mediante observación morfológica por microscopía (Bellinger y Sigee, 2010, p. 9; Ortiz Tirado et al., 2017, p. 57). Paralelamente, la comparación de las secuencias obtenidas de regiones parciales de ADN con las existentes en bases de datos y la apariencia microscópica de los aislados, permitirá evaluar la efectividad de las regiones Código de Barra seleccionadas para la asignación taxonómica.

## **2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Aspectos generales de las microalgas**

El término “microalga” se emplea para designar a un grupo polifilético de microorganismos unicelulares oxigénicos que comprende protistas y procariotas coloniales y filamentosos (Aishvarya et al., 2015, p. 289). Se encuentran en ecosistemas acuáticos o en la superficie de diferentes tipos de suelo, ya sea de forma libre o en asociación simbiótica con plantas, hongos, esponjas, corales o protistas (Adams y Duggan, 2008, p. 1047; Coates et al., 2013, p. 515).

Las microalgas usan energía solar, agua y nutrientes inorgánicos para reducir el dióxido de carbono a moléculas orgánicas complejas con una eficiencia de conversión superior a las plantas. Sin embargo, ciertas especies emplean el carbono orgánico como fuente de energía por lo que el metabolismo de estos microorganismos puede ser fotoautotrófico, heterotrófico o mixotrófico (Gaignard et al., 2019, p. 193).

Dada su historia evolutiva, las microalgas toleran entornos extremos y competitivos con altos índices de radiación, estrés oxidativo, temperaturas extremas, presión osmótica, estrés salino y escasez de nutrientes gracias a la síntesis de un amplio rango de metabolitos de interés comercial (Falaise et al.,

2016; Gimpel et al., 2015). Por tanto, son promisorias biofactorías que además destacan por su rápido crecimiento en medios basales, no necesidad de tierra cultivable y posibilidad de aprovechamiento de aguas residuales (Parmar et al., 2011, p. 10164).

## **2.2. Aplicaciones comerciales de las microalgas y sus derivados**

Si bien las microalgas han sido parte de la dieta del ser humano durante milenios, su explotación comercial comenzó en la década de 1960 ante la necesidad de fuentes alternativas de proteínas de calidad para satisfacer la demanda de la creciente población (Khan et al., 2018).

En función de la especie y condiciones de crecimiento, las microalgas pueden acumular hasta el 90 % de lípidos por unidad de masa seca. Varios de estos son ácidos grasos pertenecientes a las familias  $\omega 3$  y  $\omega 6$  y son considerados benéficos para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, asma y artritis (Yan et al., 2016). A su vez, los lípidos de microalgas son materia prima renovable para la obtención de biocombustibles de tercera generación (Gatamaneni et al., 2018, pp. 229–230).

Las microalgas también son fuente de vitaminas esenciales (p. ej. niacina, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico), carbohidratos complejos (p. ej. celulosa, hemicelulosa y almidón) y grandes cantidades de pigmentos recomendados en el tratamiento de tumores, desórdenes neuronales y enfermedades oculares (p. ej. clorofila, ficobiliproteínas, carotenoides) (Khan et al., 2018; Yan et al., 2016). Algunas especies sintetizan sustancias protectoras contra radicales libres, las cuales se incluyen como antioxidantes en bebidas, alimentos funcionales y formulaciones farmacéuticas (Khan et al., 2018). Entre otros compuestos de valor agregado figuran las ficotoxinas, a las que se les atribuyen actividades citotóxicas, antitumorales, inmunosupresoras, neurotóxicas y antibióticas (Loy y Chu, 2012, p. S29).

## 2.3. Diversidad y clasificación de las microalgas

Las microalgas se han clasificado en función de su morfología y caracteres citológicos como carbohidratos de reserva, presencia de flagelos y pigmentos fotosintéticos (Bellinger y Sigee, 2010, pp. 5–8). Independientemente de la filogenia, varios taxones comparten los mismos caracteres (Borges et al., 2018). Algunos de los grupos más abundantes se describen a continuación.

### 2.3.1. Phylum Cyanophyta

#### 2.3.1.1. Clase Cyanophyceae

Las cianobacterias son procariotas fotosintéticos con roles ecológicos fundamentales en hábitats acuáticos y terrestres (Parmar et al., 2011, p. 10164). Su pigmentación verde-azul se debe a la presencia de clorofilas a y b y ficobilinas (Sexton y Lomas, 2018, p. 78; van der Merwe, 2014, p. 539). Las células tienen un diámetro inferior a 10  $\mu\text{m}$ , carecen de núcleo y están rodeadas por una pared de péptidoglucano recubierta con una capa de lipopolisacárido y, en ciertas especies, una capa de mucílago adicional (Bellinger y Sigee, 2010, p. 12)

Pese a su organización relativamente simple, las cianobacterias son morfológicamente diversas, incluyéndose formas unicelulares (p. ej. *Synechocystis*, *Chroococciopsis*), coloniales (p. ej. *Nostoc*), filamentosas sin ramificaciones (p. ej. *Arthrospira*) y filamentosas con ramificaciones verdaderas (p. ej. *Fischerella*) (Borowitzka, 2018, p. 38).

### 2.3.2. Phylum Chlorophyta

Las clorofitas son el grupo más diverso con casi 7000 especies (Sexton y Lomas, 2018, p. 79). Pueden ser unicelulares, pluricelulares o cenocíticas y residen en aguas lénticas con elevada temperatura, iluminación y disponibilidad

de nutrientes (Bellinger y Sigee, 2010, p. 17; Guamán-Burneo y González, 2016, p. 60). Generalmente, poseen un par de flagelos, pared celular de celulosa y una tonalidad verde característica atribuida a la predominancia de clorofilas a y b (Heimann y Huerlimann, 2015, p. 29).

### **2.3.2.1. Clase Chlorophyceae**

Flagelados unicelulares o coloniales y miembros filamentosos que se han dividido en cinco órdenes: Sphaeropleales, Chlamydomonadales, Chaetopeltidales, Chaetophorales y Oedogoniales. Los dos primeros están estrechamente relacionados y engloban géneros conocidos en la industria biotecnológica como *Scenedesmus*, *Desmodesmus* y *Haematococcus* (Friedl et al., 2012, pp. 23–24; Sheath y Wehr, 2015, p. 8).

### **2.3.2.2. Clase Ulvophyceae**

Las células motiles poseen flagelos apicales, simetría externa casi radial y carecen de paredes celulares. Su morfología oscila entre células microscópicas, talos pluricelulares y células de gran tamaño. Si bien el grupo es primordialmente marino, géneros como *Ulva* y *Chladophora* se han adaptado a ecosistemas de agua dulce (Lee, 2008, p. 168; Sexton y Lomas, 2018, p. 80).

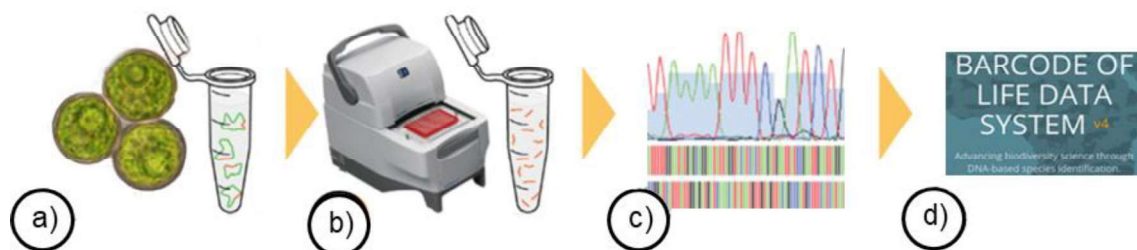
### **2.3.2.3. Clase Trebouxiophyceae**

Primariamente cocoides unicelulares sin flagelos y en menor proporción, coloniales o formadores de filamentos que se disocian fácilmente (Sexton y Lomas, 2018, p. 79). Varias especies viven asociadas a líquenes, protistas, invertebrados o plantas mientras que otras han desarrollado estilos de vida libre heterotrófica, parasítica o simbiótica (Friedl et al., 2012, p. 24). Se han establecido cinco órdenes: Chlorellales, Microthamniales, Phyllosiphonales, Prasiolales y Trebouxiales. Algunos géneros (p.ej. *Geminella*) aún no han

podido asignarse a un orden determinado (*incertae sedis*) (John y Rindi, 2015, p. 417).

## 2.4. Identificación de organismos mediante el Sistema de Códigos de Barra

El Sistema de Códigos de Barra (Figura 1) es un sistema de identificación de especies basado en el análisis de secuencias específicas estandarizadas (Kress y Erickson, 2008, p. 2761). La aparición de la metodología fue posible gracias al desarrollo de la PCR y la creación de bases de datos nucleotídicas (Raoult et al., 2004, pp. 151–152; Sousa y Pereira, 2013, p. 1433).



**Figura 1.** Pasos principales del Sistema de Códigos de Barra.

Adaptado de International Barcode of Life (2019).

- a) Extracción de ADN.
- b) Amplificación de la región Código de Barras mediante PCR.
- c) Secuenciación.
- d) Comparación de secuencias resultantes con las disponibles en bases de datos.

El Sistema de Códigos de Barra ha sido reconocido por su rapidez, especificidad, reproducibilidad y sencilla interpretación, facilitando el reconocimiento de especies crípticas e inferencia de relaciones filogenéticas (Medlin et al., 2010, p. 341). Aun así, el sistema no reemplaza en su totalidad al diagnóstico morfológico y debe ser considerado como un complemento (Paz et al., 2011, p. 164).

El flujo de obtención de información para el Sistema de Códigos de Barras inicia con el espécimen, el cual puede provenir de diferentes fuentes como muestras ambientales, colecciones, ceparios, entre otras. El paso siguiente es la recuperación de ADN mediante un protocolo de extracción que garantice una óptima calidad (Yang et al., 2018).

El ADN aislado se emplea como molde en la PCR para la generación exponencial de copias de la región seleccionada como Código de Barras. Seguidamente, se elucida la secuencia del producto amplificado y se compara con accesiones disponibles en bases de datos nucleotídicas (Kress y Erickson, 2008, p. 2761).

#### **2.4.1. Regiones Código de Barra**

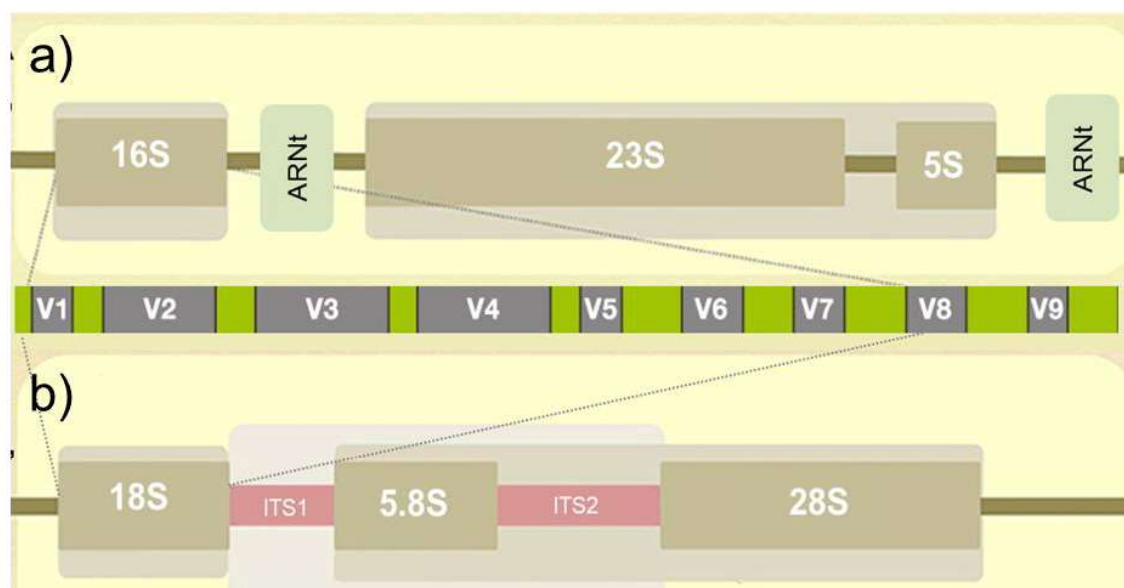
Para que una región sea aceptada como Código de Barra debe cumplir con los siguientes requisitos: (i) contener variabilidad y divergencia genética significativa a nivel de especie, (ii) estar situadas entre regiones conservadas que favorezcan su detección con cebadores universales y, (iii) ser de corta longitud (200-800 pb) para facilitar su amplificación y secuenciación (Kress y Erickson, 2008, p. 2761). A continuación, se describen dos de los marcadores más frecuentes para el Sistema de Código de Barras.

##### **2.4.1.1. Gen del ARN de la subunidad menor del ribosoma**

El gen del ARN de la subunidad menor del ribosoma está presente en el genoma de todas las células vivas y cumple una función altamente conservada al estar involucrado en la maquinaria de traducción (Hadziavdic et al., 2014). Su potencial como marcador fue descubierto en la década de los 70s (Balch et al., 1977, pp. 305–306; Woese y Fox, 1977, pp. 5088–5090) y en la actualidad siguen en vigencia gracias a su fácil manejo, universalidad, repetitividad y grado de conservación a nivel de secuencia y estructura (Wu et al., 2013).



El gen contiene nueve regiones variables: V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 y V9 (Figura 2). En procariotas, la región V6 del ARNr 16S es la más variable y adecuada para estudios de biodiversidad por su cobertura, espectro y especificidad mientras que las regiones V1-V4 pueden aportar estimaciones más precisas (Kim et al., 2011, p. 81; Wang y Qian, 2009). En eucariontes, la región V4 del ARNr 18S es considerada idónea para análisis moleculares del dominio por su mayor tamaño y variabilidad de inversiones, inserciones y deleciones (Hadziavdic et al., 2014; Zimmermann et al., 2011, p. 187). Aunque la región V2 también posee una de las mayores resoluciones su uso se ve limitado ante la dificultad de diseño de cebadores óptimos (Hadziavdic et al., 2014).



*Figura 2.* Cistrones del ARN ribosomal.

Adaptado de Halwachs et al. (2017).

a) Procariotas.

b) Eucariotas.

#### 2.4.1.2. Espaciadores Internos Transcritos

Los Espaciadores Internos Transcritos (ITS) están posicionados entre los genes de las subunidades ribosomales (Figura 2) y se remueven después de la transcripción primaria del cistrón (Schoch et al., 2012, p. 6241). Al no cumplir un rol funcional, poseen una alta tasa evolutiva y permiten discriminar entre especies del mismo género o poblaciones de la misma especie (Guo et al., 2015, p. 1370).

Para la identificación de cianobacterias, se ha empleado el ITS entre los genes de ARNr 16S y 23S (ITS 16S-23S) (Valério et al., 2009, pp. 643, 651–654), del cual se han descrito hasta cinco variantes. La más común contiene los ARN de transferencia  $ARNt^{Ile}$  y  $ARNt^{Ala}$  (Boyer et al., 2001, pp. 1059–1065; Iteyan et al., 2000, pp. 1279–1284; Johansen et al., 2017, pp. S1, S13). En clorofitas, los ITS se asemejan a los de las plantas superiores, por lo que es factible emplear los mismos cebadores universales para amplificar la región ITS1-5.8S-ITS2 (Hadi et al., 2016) o secuencias cortas del ITS2 (Buchheim et al., 2011).

## **2.4.2. Bases de datos**

### **2.4.2.1. GenBank**

GenBank es una base de datos creada por el NCBI que reúne secuencias de nucleótidos y aminoácidos. Las secuencias nucleotídicas corresponden a genomas completos, genes determinados, marcadores de secuencias expresadas o ácidos ribonucleicos. Dichas accesiones derivan de datos de autores o centros de secuenciación masiva de genomas (Nor Muhammad, 2018, p. 29).

La Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos Locales (BLAST) permite a los investigadores comparar secuencias obtenidas con las reportadas en GenBank. El programa emplea un algoritmo heurístico que localiza los fragmentos cortos que dos secuencias tienen en común e inicia alineamientos a partir de ellos. Como resultado del análisis se despliega una lista con las

accesiones con alineamientos estadísticamente significativos y la tasa de falsos positivos se refleja en el valor esperado (E) (Johnson et al., 2008, p. W5).

#### **2.4.2.2. Base de datos taxonómica del NCBI**

La base de datos taxonómica del NCBI fue creada con la finalidad de facilitar la nomenclatura y clasificación filogenética de organismos a los que pertenecen las secuencias ingresadas en GenBank. Además, es útil para encontrar información adicional de un taxón en particular al vincularlo directamente a otros registros para el mismo organismo. Esta base no se genera directamente a partir de los datos de secuencias, sino que trata de reflejar los consensos actuales en la literatura sistemática, valiéndose de bases de datos universales (p. ej., Catalogue of Life, Encyclopedia of Life, NameBank, etc.), bases especializadas y curadas (p. ej. Colección SAG de cultivos de algas de la Universidad de Gotinga) y literatura taxonómica primaria (Federhen, 2012, pp. D136–D137, 2015, pp. D1089–D1091).

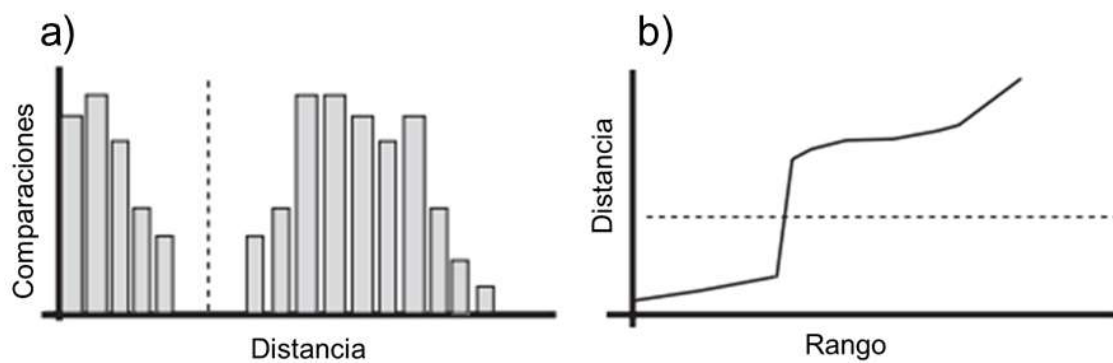
Se debe mencionar que la base se centra en taxones, a los cuales se les asigna un identificador único (taxid o NCBI:taxid). Este identificador es estable y persistente y puede ser eliminado cuando se remueven los taxones de la base de datos o combinado cuando los taxones son sinónimos (Federhen, 2012, p. D141).

#### **2.4.3. Clasificación automatizada de organismos**

El método ABGD, basado en distancias evolutivas, permite la agrupación *de novo* de secuencias de regiones Código de Barras en especies hipotéticas en función de la brecha existente entre la diversidad interespecífica e intraespecífica (Zou et al., 2016).

El procedimiento se resume en encontrar la primera brecha que se presente a una distancia mayor al límite por debajo del cual las distancias son

estadísticamente más susceptibles de ser intraespecíficas ( $dist_{limit}$ ) (Figura 3). Dicho límite se estima en función de la tasa de mutación de la población analizada mediante una partición preliminar de los datos con el umbral previo de la máxima divergencia de diversidad intraespecífica (P), seleccionado por el usuario. En base a la brecha estimada, los datos se particionan en especies candidatas. Cada partición se analiza repitiendo los pasos anteriores hasta que no se detecten particiones adicionales, considerando la variabilidad de la tasa mutacional y solapamientos entre diversidad intra e interespecífica (Puillandre et al., 2012, pp. 1865–1866).



*Figura 3.* Representaciones gráficas de brechas entre distancias (-). Los menores valores reflejan divergencia intraespecífica y los mayores, divergencia interespecífica.

Adaptado de Puillandre et al. (2012, p. 1866).

a) Histograma de comparaciones entre secuencias en función de la distancia.

b) Valores de distancia clasificados en rangos.

### 3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

En la Figura 4 se detalla el flujo general de trabajo propuesto para la identificación molecular de microalgas.

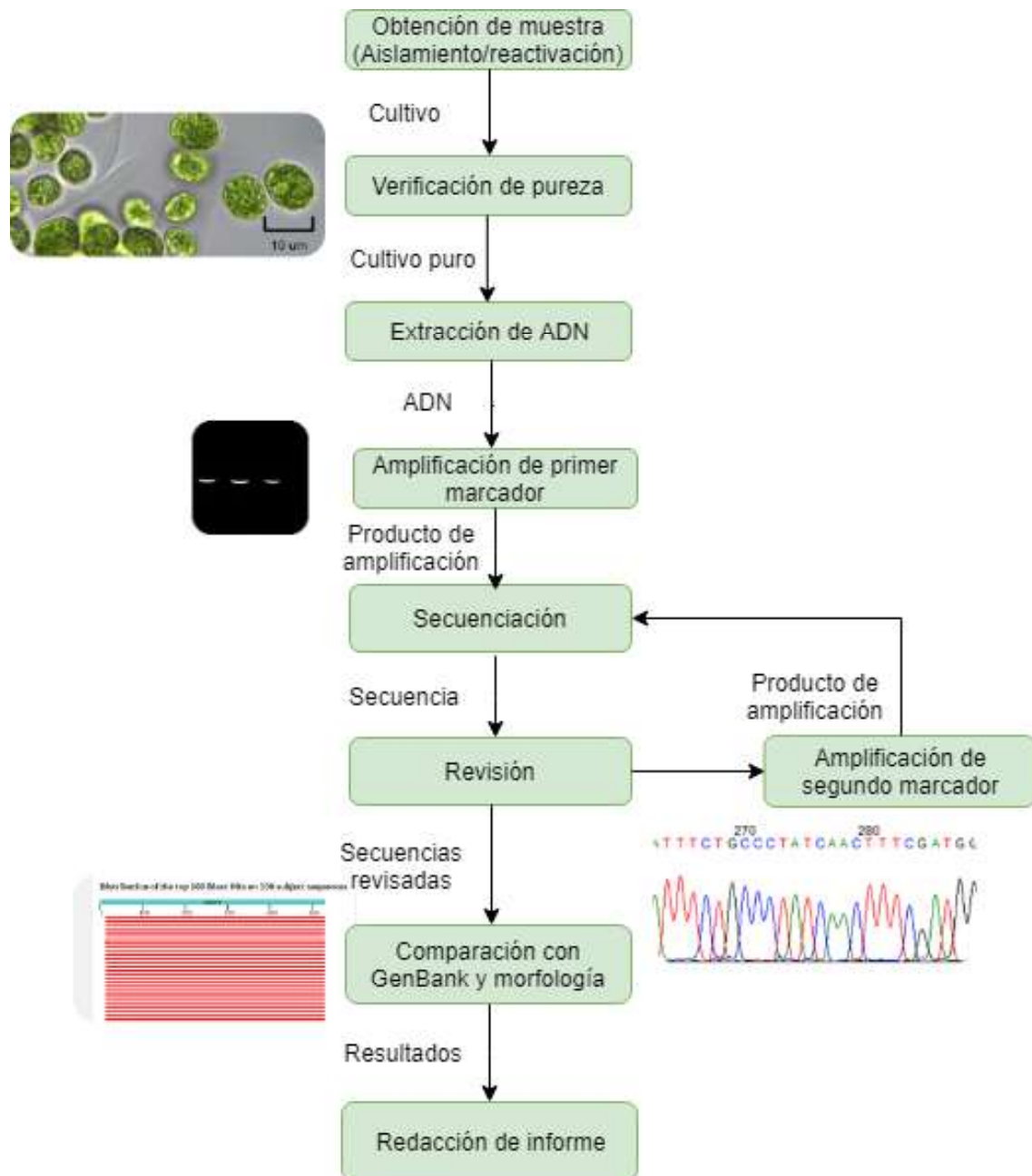


Figura 4. Diagrama resumen del procedimiento experimental.

## 4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

### 4.1. Muestra biológica

Las microalgas analizadas fueron procesadas bajo los permisos No. 002-14 IC-MC-DNB/MA y por los contratos Marco de Acceso a los Recursos Genéticos MAE-DNB-CM-2015-0012 y MAE-DNB-CM-2018-0093, otorgados por el Ministerio del Ambiente.

#### 4.1.1 Cultivo de microalgas

##### 4.1.1.1 Medios de cultivo

El medio Basal de Bold (BB) (Andersen, 2005, p. 437; Bold, 1949, pp. 101–108) y el medio *Blue-Green* 11 (BG-11) (Andersen, 2005, pp. 435–436; Stanier et al., 1979, p. 4) fueron seleccionados para el cultivo y escalamiento de la mayoría de las microalgas.

##### 4.1.1.2. Reactivación de microalgas criopreservadas

Las microalgas fueron reactivadas de muestras criopreservadas, siguiendo el protocolo detallado en Day y Brand (2005, pp. 184–185) con modificaciones. Brevemente, los crioviales, originalmente almacenados a -20 °C, se descongelaron durante 3-4 minutos en un baño húmedo a 37 °C (Memmert, Estados Unidos), agitándolos periódicamente por inversión para resuspender las células precipitadas. Los viales se centrifugaron por 6 minutos a 2500 x g para remover el medio de criopreservación (Hermle, Alemania). Las células se lavaron con 1 mL de medio de cultivo, se centrifugaron nuevamente por 6 minutos a 2500 x g y se resuspendieron en 1.5 mL de medio.

Las microalgas reactivadas permanecieron durante una semana en oscuridad. Tras dicho período, se trasladaron a tubos esterilizados con medio de cultivo y se mantuvieron en una cámara de germinación (Wisd, Corea) a  $20 \pm 2$  °C, 50 %

de humedad relativa, iluminación de  $21.384 \pm 1.584 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y agitación horizontal de 140 rpm (Thermo Scientific, Estados Unidos).

## **4.2. Identificación molecular**

### **4.2.1. Extracción de ADN**

#### **4.2.1.1. Extracción manual**

Se empleó un protocolo similar al de Edwards, Johnstone, y Thompson (1991, p. 1349) para recuperación de ADN de tejidos vegetales. Se centrifugaron de 1.5 a 3 mL de cultivo puro a  $1503 \times g$  por 3 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (Eppendorf<sup>TM</sup>, Alemania) para remover el medio. El precipitado se resuspendió en 400  $\mu\text{L}$  de tampón de extracción (Tris-HCl 200 mM, SDS al 0.5 % ( $\text{p}\cdot\text{v}^{-1}$ ), NaCl 250 mM, EDTA 25 mM a pH 8.0). A continuación, se lisaron las células con perlas de vidrio y vórtex durante 30 segundos. El lisato se centrifugó a  $15781 \times g$  por 7 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y se transfirieron 350  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un tubo estéril de 1.5 mL. El ADN se precipitó con 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío por 2 minutos. El alcohol se removió por centrifugación a  $15781 \times g$  durante 7 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y se lavó el ADN con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70 % ( $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$ ). Se centrifugó nuevamente a  $15781 \times g$  durante 7 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y se descartó el sobrenadante. El etanol remanente se evaporó a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  y el ADN se eluyó en 50  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Alemania).

#### **4.2.1.2. Extracción con kit Purelink<sup>TM</sup> Genomic DNA**

Se centrifugaron 1.5-3 mL de cultivo líquido de microalgas a  $587 \times g$  durante 10 minutos para descartar el medio. Las células se resuspendieron en 180  $\mu\text{L}$  de tampón de digestión (kit) y se incubaron a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  por 12 minutos. El lisato resultante se desproteinizó con 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K ( $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (kit) durante 4 horas a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  en un bloque térmico con agitación (Eppendorf<sup>TM</sup>, Alemania). El lisato desproteinizado se trató con 20  $\mu\text{L}$  de ARNasa A (20

mg·mL<sup>-1</sup>) (kit), se mezcló por vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos (Invitrogen™, Estados Unidos).

Las muestras se mezclaron con 200 µL de tampón de lisis/unión (kit) y el mismo volumen de etanol absoluto y se colocaron en una columna de purificación acoplada a un tubo colector. La columna se centrifugó a 10000 × g durante 1 minuto y se reemplazó el tubo colector por uno nuevo. Se añadieron 500 µL de tampón de lavado 1 (kit) a la columna y se centrifugó a 10000 × g por 1 minuto. El efluente de la columna se descartó y se añadieron 500 µL de tampón de lavado 2 (kit). Se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos y se reemplazó el tubo colector por un tubo de 1.5 mL. Para la elución, se añadieron 100 µL de tampón de elución (kit) a la columna y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Finalmente, se centrifugó la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente para recuperar el ADN purificado (Invitrogen™, Estados Unidos).

#### **4.2.2. Verificación de la calidad de ADN**

##### **4.2.2.1. Cuantificación espectrofotométrica**

El pedestal del dispositivo Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific, Estados Unidos) se limpió con 2 µL de agua Milli-Q® y se inició el programa controlador, en el cual se seleccionó la opción “Ácido nucleico”, con la configuración “ADN-50” y las unidades “ng·µL<sup>-1</sup>”. Como blanco, se emplearon 2 µL del agente de elución y se cuantificó el ADN contenido en el mismo volumen de cada muestra por triplicado. Los resultados de la cuantificación se multiplicaron por el volumen final de elución para expresarlos como ng totales de ADN recuperado.

##### **4.2.2.2. Electroforesis de ADN**

Se mezcló el ADN extraído con Buffer de Carga 10 X (Invitrogen™, Estados Unidos) en proporción 10:1. El volumen resultante se cargó en un gel



preparado con 0.8 g de agarosa ultrapura (Invitrogen™, Estados Unidos) y 3.4 µL de SYBR Safe (Invitrogen™) por cada 100 mL de TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 0.2 a pH 8.0). Las muestras se corrieron a 100 V durante 30 minutos junto con 2 µL de marcador de peso TrackIt™ 100 bp (Invitrogen™, Estados Unidos). Los resultados fueron visualizados con el fotodocumentador ChemiDOC™ MP Imaging System (Bio-Rad), controlado con el programa ImageLab v5.2.1.

#### **4.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Para la identificación de cianobacterias, las regiones V1-V5 del ARNr 16S y el ITS 16S-23S se amplificaron con los cebadores CYA106F/CYA781R e ITSCYA236F/ITSCYA225R (Tabla 1). Para muestras de clorofitas, se trabajó con los cebadores DIV4for/DIV4rev3 y A/SSU-inR1 (Tabla 1). Los cebadores fueron sintetizados por la casa comercial Alpha DNA (Canadá) a excepción de DIV4for y DIV4rev3 (Invitrogen™, Estados Unidos).

Tabla 1.

Cebadores universales empleados en el presente trabajo para identificación de microalgas.

Marcador	Cebador	Secuencia (5'-3')	Posición (pb)	Referencia
ARNr 16S (V1-V5)	CYA106F CYA781R	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT	66-87 <sup>a</sup> 703-727 <sup>a</sup>	Nübel et al. (1997, p. 3328)
ITS 16S-23S	ITSCYA236F ITSCYA225R	CTGGTTCRAGTCCAGGAT TGCAGTTKTCAAGGTTCT	1700-1717 <sup>a</sup> 2004-2021 <sup>a</sup>	Valério et al. (2009, p. 644)
ARNr 18S (V4)	DIV4for DIV4rev3	GCGGTAATCCAGCTCCAATAG CTCTGACAAATGGAATACGAATA	575-596 <sup>b</sup> 882-903 <sup>b</sup>	Visco et al. (2015, pp. 7597-7605)
ARNr 18S (V1-V3)	A SSU-inR1	AACCTGGTTGATCCTGCCAG CACCAGACTTGCCCTCCA	2-20 <sup>b</sup> 548-565 <sup>b</sup>	Alemzadeh et al. (2014, pp. 297-298)

Nota: <sup>a</sup> *Synechococcus* sp. WH7803 (GenBank: CT971583.1:534563-536583), <sup>b</sup> *Chlorella vulgaris* (GenBank: AB162910.1).

Las reacciones, con un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , se ensamblaron según las indicaciones de la Tabla 2. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MasterCycler<sup>®</sup> Pro (Eppendorf<sup>™</sup>, Alemania) con los programas detallados en la Tabla 3.

Tabla 2.

*Composición de las mezclas de reactivos de PCR.*

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
GoTaq <sup>®</sup> Green Master Mix (Promega) <sup>a,b,c,d</sup>		
Platinum II Taq Hot-Start DNA Polymerase <sup>b</sup> (Invitrogen <sup>™</sup> , Estados Unidos).	2X	1X
Cebadores	5 $\mu\text{M}$	0.20 $\mu\text{M}$ <sup>a, b</sup> 0.25 $\mu\text{M}$ <sup>c, d</sup>
ADN	Variable	25-35 ng
Agua Milli-Q <sup>®</sup>	-	-

Nota: <sup>a</sup>CYA106F/CYA781R, <sup>b</sup>ITSCYA236F/ITSCYA225R, <sup>c</sup>DIV4for/DIV4rev3, <sup>d</sup>A/SSU-inR1.

Tabla 3.

*Programas de amplificación con los diferentes cebadores.*

Cebadores	Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
CYA106F CYA781R	Denaturación inicial	95 °C	2 minutos	1
	Denaturación			
	Hibridación	55 °C	45 segundos	40
	Elongación	72 °C		
	Elongación final		5 minutos	1
ITSCYA236F ITSCYA225R	Denaturación inicial	95 °C	6 minutos	1
	Denaturación			
	Hibridación	52 °C	45 segundos	35
	Elongación	72 °C		
	Elongación final		5 minutos	1
DIV4for DIV4rev3	Denaturación inicial	95 °C	2 minutos	1
	Denaturación			
	Hibridación	46 °C	45 segundos	40
	Elongación	72 °C		
	Elongación final		5 minutos	1
A SSU-inR1	Denaturación inicial	95 °C	3 minutos	1
	Denaturación			
	Hibridación	55 °C	45 segundos	40
	Elongación	72 °C		
	Elongación final		7 minutos	1
A DIV4rev3	Denaturación inicial	95 °C	3 minutos	1
	Denaturación			
	Hibridación	51 °C	45 segundos	40
	Elongación	72 °C		
	Elongación final		7 minutos	1

#### 4.2.3.1. Visualización de productos de amplificación

Se cargaron 10  $\mu\text{L}$  de producto de amplificación en un gel preparado con 1.5 g de agarosa y 3.4  $\mu\text{L}$  de SYBR Safe por cada 100 mL de TBE 1X. Los resultados se visualizaron empleando las indicaciones de la sección 4.2.2.2.

#### 4.2.4. Secuenciación

Los amplificados fueron procesados por el Servicio de Secuenciación de la Dirección General de Investigación de la Universidad de las Américas. Se entregaron 10  $\mu\text{L}$  de los productos de PCR y 100-200  $\mu\text{L}$  de alícuotas de los cuatro pares de cebadores a 2  $\mu\text{M}$ . Los productos fueron purificados con el kit Agencourt<sup>®</sup> Cleanseq<sup>®</sup> (Beckman Coulter, Estados Unidos) y secuenciados con el kit BigDye<sup>™</sup> Terminator v3.1 (Applied Biosystems<sup>™</sup>, Estados Unidos).

#### 4.2.5. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas de cianobacterias fueron alineadas con el algoritmo CLUSTAL W con las configuraciones por defecto del programa MEGA v.10.0.4 (Kumar et al., 2018, p. 1547), omitiendo los cebadores. Las distancias genéticas se estimaron mediante un análisis de Neighbor Joining con el modelo Kimura de dos parámetros (K2P) y 1000 réplicas de *bootstrap* y se expresaron en porcentajes  $\pm$  desviación estándar. Posteriormente, se compararon las secuencias con las existentes en GenBank con el algoritmo megaBLAST. En los parámetros de búsqueda, se excluyeron secuencias pertenecientes a organismos no cultivados o muestras ambientales.

En el caso de microalgas eucariotas, se efectuó un cribado inicial con las secuencias parciales de la región hipervariable V4 del ARNr 18S y de cada variante se seleccionaron uno o dos individuos representativos, de los cuales se obtuvo la secuencia parcial de las regiones V1-V3 del ARNr 18S. Ambas secuencias se alinearon y buscaron en GenBank para verificar su potencial de discriminación.

Los fragmentos obtenidos de las regiones V1-V3 y V4 del ARNr 18S fueron alineados y combinados para análisis posteriores. Se equiparó la longitud de las secuencias para el análisis de Neighbor Joining con el modelo Kimura de dos parámetros (K2P) y 1000 réplicas de *bootstrap*. Adicionalmente, se agruparon los datos con la herramienta ABGD (Puillandre et al., 2012, pp. 1864–1877), aplicando el modelo K2P y diez pasos recursivos entre las particiones primarias. El máximo valor de divergencia se fijó entre 0.001 y 0.1 y el ancho de la brecha en 1.0 (Zou et al., 2016).

### **4.3. Identificación morfológica**

La identificación morfológica de los especímenes a nivel de género se llevó a cabo según la estrategia de Hadi et al. (2016). Los cultivos reactivados fueron observados en un microscopio binocular CX-31 (Olympus<sup>®</sup>, Estados Unidos) y se clasificaron basándose en las claves especificadas por Bellinger y Sigee (2010, pp. 137–240), Komárek y Johansen (2015, pp. 73–133) y Shubert y Gärtner (2015, pp. 315–373). Además, se efectuaron comparaciones con los registros de la base de datos AlgaeBase (Guiry y Guiry, 2019). Las células fueron fotografiadas con los programas INFINITY CAPTURE e INFINITY ANALYZER v6.5.4 (Lumenera, Canadá).

## **5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Extracción de ADN**

Independientemente del protocolo empleado, la cantidad y calidad de material genético reflejada en las relaciones 260/280 y 260/230 no fueron reproducibles. Esto puede atribuirse a factores inherentes a la muestra, principalmente la biomasa disponible y la composición de paredes celulares (Yuan et al., 2015).

La cantidad de biomasa pudo verse afectada por el tiempo de cultivo y la tasa de crecimiento de las microalgas, tomando en cuenta que se trabajó con muestras de varios géneros que se mantuvieron en congelación durante

diferentes períodos, lo que representaría diferencias de viabilidad celular (Harith et al., pp. 387–390). Entre otros factores, se puede mencionar la presencia de células muertas en el cultivo antes de la congelación (Tessarolli et al., 2017) y daños asociados al almacenamiento a bajas temperaturas como formación de radicales libres y alteraciones de estabilidad genética (Grout et al., 1990, pp. 293–297; Kapoore et al., 2019). Una forma de solventar tales inconvenientes podría ser la estandarización de la concentración de células de la muestra como consta en la metodología de Jagielski et al. (2017).

Respecto a la composición de las paredes celulares, múltiples autores han reportado inconvenientes en la extracción dada la presencia de biomoléculas resistentes como polisacáridos complejos o derivados de sílice cuyo tipo y abundancia dependen de la especie (Jagielski et al., 2017; Yuan et al., 2015). Por ende, es indispensable seleccionar un método de lisis óptimo para las especies analizadas que no afecte la integridad del ADN. Son promisorios los protocolos que incluyen agitación con perlas de vidrio, ciclos repetitivos de congelamiento y descongelamiento o maceración en nitrógeno líquido (Yuan et al., 2015).

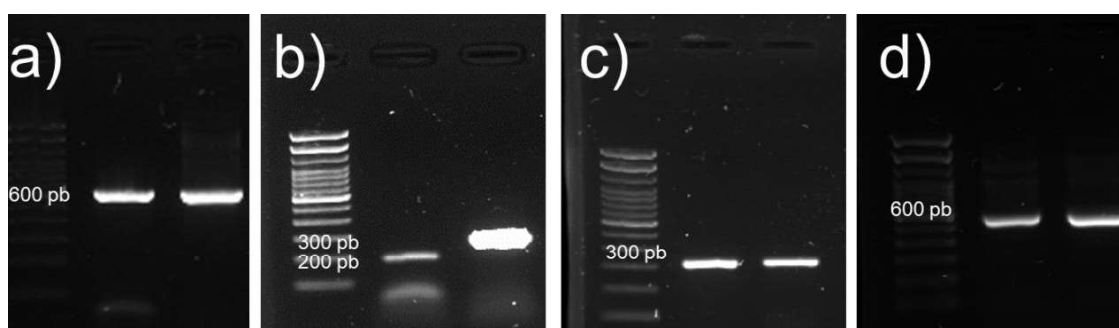
Según Tear et al. (2013), los lípidos acumulados también dificultan la ruptura de las células de *Chlorella* spp., inconveniente que fue superado con el uso de hexano en la disrupción. Otra alternativa para incrementar el rendimiento de extracción es el bromuro de hexadeciltrimetilamonio, detergente catiónico exitosamente empleado en trabajos previos para la recuperación de ADN e identificación de cianobacterias (Corrales et al., 2017, p. 282) y microalgas eucariotas (Cobos et al., 2017; Gumińska et al., 2018, p. 3543; Hadi et al., 2016; Lopez et al., 2017, p. 97).

## **5.2. Validación de PCR**

Los programas de amplificación se basaron inicialmente en las condiciones especificadas por el fabricante de la enzima y la literatura (Alemzadeh et al.,

2014, p. 298; Nübel et al., 1997, p. 3328; Valério et al., 2009, p. 645; Visco et al., 2015, p. 7597–7605).

La temperatura de hibridación de los cebadores CYA106 y CYA781R fue reducida en comparación con la previamente descrita (Nübel et al., 1997, p. 3328), permitiendo la generación de una cantidad adecuada de copias de ADN del tamaño esperado de alrededor de 650 pb (Figura 5a), con potenciales efectos en la reducción de la especificidad de la reacción (Starčič Erjavec, 2016).



*Figura 5.* Productos de amplificación obtenidos durante la validación inicial de las condiciones de PCR.

- a) CYA106F y CYA781R para región parcial de ARNr 16S.
- b) ITSCYA236F e ITSCYA225R para espaciador 16S-23S.
- c) DIV4for y DIV4rev3 para región parcial V4 de ARNr 18S.
- d) A y SSU-inR1 para regiones V1-V3 de ARNr 18S.

En la electroforesis de los productos de amplificación de la región parcial ITS 16S-23S se evidenció la presencia de dímeros de cebadores (Figura 5b) que no interfirieron posteriormente en la secuenciación ya que suelen ser removidos durante la purificación. Aun así, se pudo prevenir su formación mediante la disminución de la concentración de los cebadores y el uso de una polimerasa de arranque en caliente, reconocida por su alta especificidad (Powell y Loeffelholz, 2018, p. 333).



En el programa de amplificación con los cebadores DIV4for y DIV4rev3 también fue necesario reducir la temperatura en relación a la reportada por Visco et al. (2015, pp. 7597–7605) para generar productos de aproximadamente 320 pb en su mayoría (Figura 5c). No obstante, en una de las muestras, se obtuvo un producto de aproximadamente 740 pb, presuntamente debido a una inserción dada la variabilidad de la región (Luddington et al., 2012; Nickrent y Sargent, 1991, p. 227). Para los cebadores A y SSU-inR1, se mantuvieron las condiciones recomendadas por Alemzadeh et al. (2014, p. 298), sin inconvenientes en la amplificación de fragmentos de casi 560 pb (Figura 5d).

### **5.3. Identificación de cianobacterias**

#### **5.3.1. Análisis de regiones parciales de ARNr 16S e ITS 16S-23S**

Se detectaron dos variantes del fragmento analizado de la región de ARNr 16S (Y-001 y Y-002), ambas con un tamaño de 615 pb y una distancia genética de  $16.16 \pm 1.76$  % tras excluir las secuencias de los cebadores del análisis. La variante Y-001 se presentó en dos cultivos y la variante Y-002 en uno. En este estudio, cada variante fue interpretada como una unidad taxonómica operativa molecular (MOTU).

En cuanto a la región parcial ITS 16S-23S, se obtuvieron dos secuencias idénticas de 159 pb para la variante Y-001 y una de 92 pb para Y-002, en concordancia con la asignación molecular sugerida según el análisis de regiones de ARNr 16S. Ambas secuencias fueron muy divergentes para alinearse dada la naturaleza de la región (Guo et al., 2015, p. 1376).

#### **5.3.2. Búsqueda de secuencias en GenBank**

La búsqueda de los fragmentos de ARNr 16S de la variante Y-001 dio como resultado accesiones pertenecientes a organismos catalogados dentro del género *Chroococcidiopsis* mientras que la secuencia parcial de la región ITS 16S-23S, coincidió específicamente con la de *C. thermalis* PCC 7203

(NCBI:txid 251229). Para la variante Y-002, las máximas coincidencias en GenBank correspondieron a múltiples cepas y subcepas de *Synechocystis* sp.

Cabe destacar que en general, la búsqueda de secuencias parciales de ARNr 16S en GenBank dio como resultado mayor cantidad de accesiones con máximo puntaje en comparación a las secuencias parciales de la región ITS 16S-23S (Tabla 4). Esto se atribuye a la falta de secuencias de referencia, una de las limitaciones del Sistema de Código de Barras (Mishra et al., 2016, p. 16).

Tabla 4.

*Resumen de búsqueda de secuencias parciales del gen ARNr 16S e ITS 16S-23S con el algoritmo BLAST en el que se reportan los identificadores taxonómicos de las accesiones con máximos puntajes.*

MOTU	Longitud (pb)	Cobertura (%)	Identidad (%)	NCBI:txid (n)
Y-001	615 <sup>a</sup>	100	100	7
	159 <sup>b</sup>	100	100	1
Y-002	615 <sup>a</sup>	100	100	25
	92 <sup>b</sup>	100	96.77	25

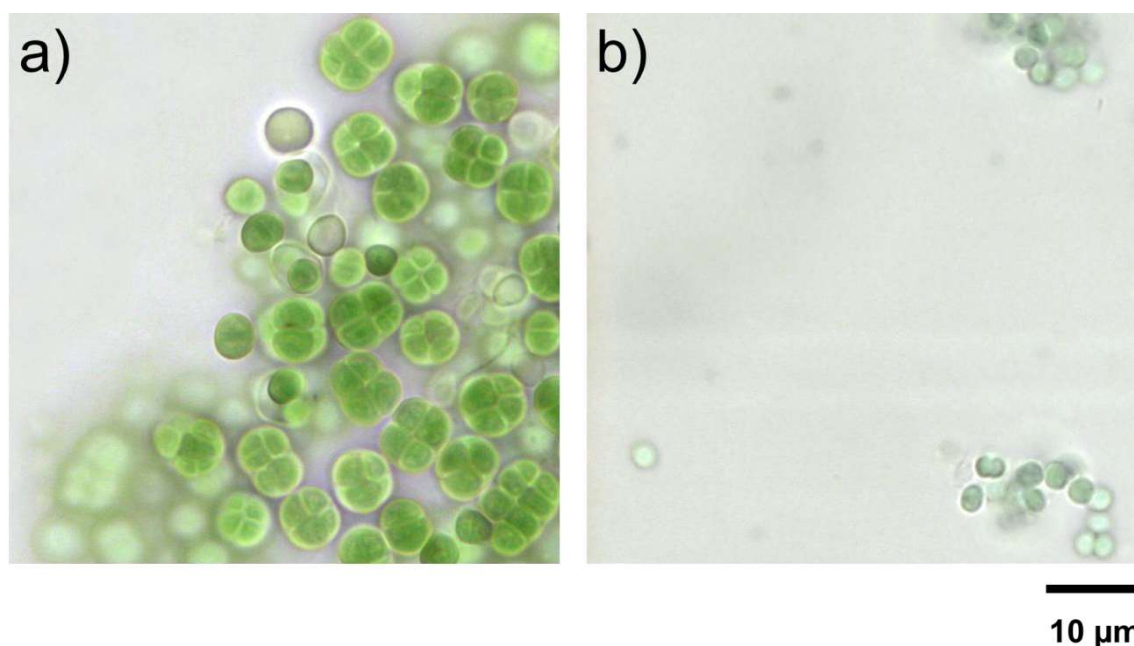
Nota: <sup>a</sup>Región Parcial de ARNr 16S. <sup>b</sup>Región parcial ITS 16S-23S.

Las diferencias en reportes taxonómicos también están relacionadas con el grado de conservación de los fragmentos y los puntajes de búsqueda de las secuencias parciales del ARNr 16S deben ser cuidadosamente interpretados (Ong et al., 2013; Zhang et al., 2018, pp. 1255–1264). Aunque el amplio rango de identificadores taxonómicos compromete la credibilidad de la identificación, el uso de genes de la subunidad ribosomal pequeña como marcadores no es totalmente reemplazable. Esto se asocia a la predominancia de información en comparación a otros marcadores que se han implementado para la asignación a taxones inferiores, a tal punto de que existe SILVA, una base de datos exclusiva para secuencias de ARNr (Quast et al., 2013, p. D590).

### 5.3.3. Comparación de observaciones microscópicas y bases de datos

#### 5.3.3.1. MOTU Y-001

De acuerdo con los criterios señalados por Komárek y Johansen (2015, p. 119), existe concordancia entre la asignación nucleotídica de los cultivos al género *Chroococidiopsis* y su morfología (Figura 6a). Las células del cultivo exhibieron forma esférica, ovalada e irregularmente redondeada como se ha descrito para *Chroococidiopsis*. Otros caracteres que reafirman la identificación son la presencia de recubrimiento celular incoloro y la organización en agregados que sugiere resultar de un evento de división binaria en múltiples planos (Šebela et al., 2018).



*Figura 6.* Morfología microscópica de cianobacterias identificadas.

a) MOTU Y-001.

b) MOTU Y-002.

Cabe señalar que las claves morfológicas disponibles no aportan información sobre todos los géneros y que los criterios de asignación en base a observaciones microscópicas son ambiguos. Por ejemplo, según las claves 51b de Komárek y Johansen (2015, p. 88) y 65 de Bellinger y Sigee (2010, p. 172), varios de los caracteres de *Chroococidiopsis* se corresponden con el género

*Chroococcus*, fácilmente confundido con *Gloeocapsa*. En contraste, la evidencia molecular ha revelado una mayor cercanía filogenética de *Chroococcidiopsis* a los géneros filamentosos formadores de heterocistos, por lo que se ha categorizado en el nuevo orden Chroococcidiopsiales (Komárek et al., 2014, p. 311).

### **5.3.3.2.MOTU Y-002**

El cultivo estuvo conformado por células solitarias y en pares que mostraron apariencia redonda a ovalada y un fino recubrimiento externo (Figura 6b), presumiblemente correspondiente a una capa de mucílago, cuya presencia debe evaluarse mediante técnicas de tinción (Komárek y Johansen, 2015a, p. 99; Lee, 2018, p. 36). Aunque estos caracteres coinciden con los del género *Synechocystis*, la combinación de ambas regiones Código de Barra no fue suficiente para la clasificación a nivel de especie, no solo por la capacidad de discriminación de las regiones de ADN analizadas sino porque los aislados reportados en la base de datos no han sido totalmente caracterizados mediante métodos tradicionales o aún no se ha publicado un nombre válido para la especie (Federhen, 2012, p. D137).

### **5.3.3.3. Inconvenientes de la técnica**

El poder de discriminación de los cebadores CYA106F y CYA781R es discutible, no solo por las múltiples identificaciones taxonómicas para una misma muestra, sino por la amplificación de una secuencia 96.70 % similar a la accesión GU187039.1, perteneciente a *Acidobacteria bacterium* IGE-018 (NCBI:txid755195) (Figura 7). Según Wang y Qian (2009), esto se explicaría por el espectro del cebador CYA106F que virtualmente cubre el 31.70 % de eubacterias. Como alternativa, es factible usar el cebador CYA359F que cubre el 7.40 % de eubacterias y amplifica un fragmento de menor tamaño más susceptible de ser amplificado y secuenciado (Hamady y Knight, 2009, p. 1142; Nübel et al., 1997, pp. 3327–3328; Wang y Qian, 2009; Zhang et al., 2018, p. 1255).

Description	Per. Ident	Accession
<a href="#">Acidobacteria bacterium IGE-018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	96.70%	<a href="#">gi 270610443 GU187039.1</a>
<a href="#">Stenotrophobacter roseus strain Ac_15_C4 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	96.38%	<a href="#">gi 1150406768 NR_146022.1</a>
<a href="#">Stenotrophobacter terrae strain Ac_28_D10 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	96.23%	<a href="#">gi 1150406769 NR_146023.1</a>

*Figura 7.* Resultado de búsqueda en BLAST de la secuencia parcial obtenida de procariota no diana y la accesión con mayor coincidencia.

A pesar de los inconvenientes, el cebador CYA106F ha sido empleado con fines de identificación en numerosos estudios ya que aporta más información nucleotídica y la especificidad de búsqueda en bases de datos. Esto siempre y cuando se trabaje con cultivos axénicos de cianobacterias como en trabajos anteriores (Faldu et al., 2014, p. 1062; Konstantinou et al., 2018; Miteva et al., 2015; Nübel et al., 1997, pp. 3327–3328; Rantala et al., 2006, p. 6103). Además, dada su historia evolutiva las microalgas verdes también presentan secuencias de ARNr 16S en el plastoma (McFadden, 2014; Shi, et al., 2011), por lo que es fundamental asegurarse de la ausencia de las mismas antes de la extracción de ADN para evitar interferencias.

Respecto a los cebadores ITSCYA236F e ITS225R (Valério et al., 2009, p. 644), no se detectaron secuencias de organismos no diana bajo las condiciones de trabajo. Si bien convendría adoptarlos para la identificación específica de cianobacterias, es importante mencionar que se denotó ruido de secuenciación en las lecturas directa y reversa del producto de amplificación de la variante Y-002 en múltiples ocasiones. El inconveniente pudo deberse a la corta longitud del fragmento del espécimen analizado ya que las propiedades de la química de secuenciación BigDye™ Terminator v3.1 limitan la capacidad de resolución de los primeros nucleótidos. Como alternativas de obtención de la secuencia nucleotídica, se puede optar por el diseño de cebadores que amplifiquen un fragmento de mayor longitud o la clonación del fragmento en un vector para secuenciación con cebadores externos como en estudios anteriores (Buhay, 2009, p. 99; Stat et al., 2011). Otra dificultad asociada a la secuenciación de fragmentos cortos es su pérdida durante la purificación

(Kemp et al., 2014, p. 320), lo que se debe comprobar mediante la cuantificación y visualización del producto purificado.

#### 5.4. Identificación de microalgas eucariotas

##### 5.4.1. Análisis de regiones parciales de ARNr 18S

El cribado inicial en función de la región parcial V4 de ARNr 18S sugiere la presencia de diez variantes de secuencias (M-001 a M-010) distribuidas en 65 muestras analizadas de microalgas verdes. Las variantes M-001, M-002 y M-007 fueron las más abundantes, siendo detectadas en 13, 16 y 20 especímenes respectivamente mientras que las variantes M-005, M-006, M-009 y M-010 fueron las menos frecuentes (Tabla 5). Interesantemente, la longitud de las secuencias, omitiendo los cebadores, osciló entre 281 y 285 pb a excepción de la de la variante M-005 de aproximadamente 708 pb.

Tabla 5.

*Resumen de MOTUs detectadas en los cultivos analizados de cianobacterias en función de la región parcial V4 de ARNr 18S.*

MOTU	Cultivos analizados
M-001	13
M-002	16
M-003	2
M-004	6
M-005	1
M-006	1
M-007	20
M-008	4
M-009	1
M-010	1
Total	65

Después del cribado inicial, se seleccionó uno o dos representantes de cada variante para analizar la región parcial V1-V3 de ARNr 18S, denotándose también diez variantes de secuencias de longitud de 524 a 527 pb.

#### **5.4.2. Búsqueda de secuencias en GenBank**

La búsqueda de secuencias de la región parcial V4 de ARNr 18S en GenBank reveló diferente cantidad de identificadores taxonómicos para las secuencias de cada variante (Tabla 6). Para la región parcial V4 de M-001, se reportaron hasta 122 identificadores posibles pertenecientes a diferentes miembros de la familia Scenedesmaceae mientras que para las variantes M-002 a M-004, se alcanzaron coincidencias totales con otros miembros de la misma familia. La variante la variante M-005 fue 95.90 % similar a la de Scenedesmaceae sp. Tow 9/21 P-14w (NCBI:txid226310). Las variantes M-006 a M-009 coincidieron con diferentes miembros de la familia Chlorellaceae mientras que la variante M-010 fue un 99.29 % similar a *Gloettilopsis sterilis* SAG 8.88 (NCBI:txid160069).

En cuanto a la región V1-V3 de ARNr 18S (Tabla 6), el número de identificadores taxonómicos decreció en la mayoría de los casos, presuntamente, por la extensión de la longitud de la búsqueda y la falta de secuencias de referencia en GenBank (Mishra et al., 2016, p. 16). Si bien se redujo el número de identificadores posibles, el poder de discriminación entre organismos de las clases Chlorophyceae y Trebouxiophyceae no fue óptimo para la mayoría de las variantes a nivel de género.

Tabla 6.

*Resumen de búsqueda de secuencias parciales de la región V4 del gen ARNr 18S con el algoritmo BLAST en el que se reportan los identificadores taxonómicos de las accesiones con máximos puntajes.*

MOTU	Longitud (pb)	Cobertura (%)	Identidad (%)	NCBI:txid (n)
M-001	282 <sup>a</sup>	100	100	122
	525 <sup>b</sup>	100	100	15
M-002	283 <sup>a</sup>	100	100	26
	525 <sup>b</sup>	100	100	4
M-003	283 <sup>a</sup>	100	100	6
	526 <sup>b</sup>	100	100	3
M-004	283 <sup>a</sup>	100	100	2
	526 <sup>b</sup>	100	99.81	3
M-005	708 <sup>a</sup>	99	95.90	1
	526 <sup>b</sup>	100	100	3
M-006	285 <sup>a</sup>	100	100	1
	526 <sup>b</sup>	100	100	30
M-007	285 <sup>a</sup>	100	100	119
	526 <sup>b</sup>	100	100	8
M-008	285 <sup>a</sup>	100	100	12
	527 <sup>b</sup>	100	100	6
M-009	285 <sup>a</sup>	100	100	21
	526 <sup>b</sup>	100	100	5
M-010	285 <sup>a</sup>	100	99.29	1
	524 <sup>b</sup>	99	100	1

Nota: <sup>a</sup>Región parcial V4 de ARNr 18S. <sup>b</sup>Región parcial V1-V3 de ARNr 18S.



### 5.4.3. Análisis ABGD

Mediante el análisis ABGD de las secuencias obtenidas de ARNr 18S (sección 4.2.5), se discriminaron cinco agrupaciones de organismos en las primeras particiones (Tabla 7). Interesantemente, las agrupaciones resultantes del análisis de la región V1-V3 difirieron de las inferidas con la región parcial V4. Dicho fenómeno puede estar relacionado con las diferencias de variabilidad existentes dentro de las regiones analizadas (Hadziavdic et al., 2014). Para los análisis posteriores, se consideraron las agrupaciones resultantes de la combinación de ambas secuencias parciales.

Tabla 7.

*Agrupaciones inferidas mediante el análisis ABGD a partir de las secuencias obtenidas de diferentes regiones de ARNr 18S con distancia de 1.00.*

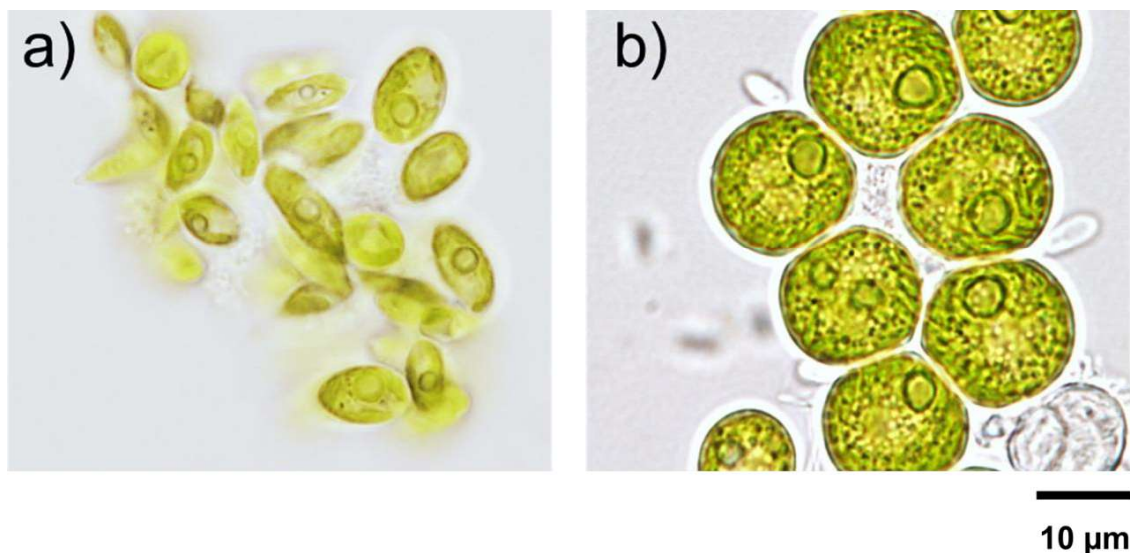
Grupo	V4	V1-V3	V1-V4
I	M-001, M-002	M-001, M-002	M-001, M-002
II	M-003, M-004	M-003, M-004, M-005	M-003, M-004
III	M-005	M-006, M-007, M-008	M-005
IV	M-006, M-007, M-008, M-009	M-009	M-006, M-007, M-008, M-009
V	M-010	M-010	M-010

### 5.4.4. Comparación de observaciones microscópicas, bases de datos y clasificación ABGD

#### 5.4.4.1. MOTUs M-001 y M-002 (Grupo I)

El cultivo representante de la variante M-001 fue originalmente catalogado como *Scenedesmus* sp. conforme a la clave 101 de Bellinger y Sigeo (2010, p. 187) dada su morfología fusiforme con largo que supera al ancho (Figura 8a). Conforme a los resultados de la búsqueda de ambas regiones parciales, las

muestras del MOTU M-001 son molecularmente similares a varias especies y cepas de *Tetrademus*, *Acutodesmus* y *Scenedesmus* sp.



**Figura 8.** Morfología microscópica de microalgas pertenecientes al grupo I.

a) M-001.

b) M-002.

La extensa gama de accesiones reportadas en GenBank se atribuye no solo al alto grado de conservación de secuencias en la familia Scenedesmaceae, sino a que *Tetrademus*, *Desmodesmus*, *Acutodesmus* y *Scenedesmus* son términos usados intercambiamente (Guiry y Guiry, 2019; Wynne y Hallan, 2015, p. 83) y a que la discriminación entre los miembros de estas especies es de alta dificultad bajo observaciones microscópicas por su capacidad de transición de células solitarias a cenobios de dos a tres células bajo diferentes condiciones de cultivo (Akgül et al., 2017, p. 612). La ubicuidad del género también dificulta la asignación a una especie determinada dado que los organismos reportados en la base de datos derivan de múltiples ecosistemas de agua dulce y presentan morfología similar (Hegewald y Braband, 2017, pp. 191–192).

Para las secuencias consenso de ambas regiones de la variante M-002, las coincidencias máximas de regiones parciales del gen 18S se alcanzaron con *Coelastrella* sp. SAG 2471 (NCBI:txid1521723), *Scenedesmus* sp. JB11

(NCBI:txid1432078) y *Scenedesmus* sp. Ki4 (NCBI:txid1203282). Del mismo modo que el cultivo analizado (Figura 8b), los organismos molecularmente similares muestran caracteres del género *Coelastrella* como forma elipsoide y cloroplasto único y parietal, salvo que *Scenedesmus* sp. Ki4 no forma agregados de dos a cuatro células (Kawasaki et al., 2013, p. 1028).

Cabe señalar que los cultivos con misma secuencia de la región parcial V4 presentaron variedad de tamaño y pigmentación y es necesario complementar el análisis con cebadores de mayor resolución así como el monitoreo periódico del cultivo para reconocer si las observaciones se atribuyen a la variación de estadios (Neofotis et al., 2016, p. 173).

#### **5.4.4.2. MOTUs M-003 y M-004 (Grupo II)**

El cultivo del que se obtuvo la secuencia de la variante M-003 exhibió los caracteres del género *Desmodesmus* descritos por Shubert y Gärtner (2015, p. 338) como son cenobios de cuatro células paralelas de forma elipsoide y espinas presentes en los extremos longitudinales (Figura 9a). Esta morfología es similar a la de *Desmodesmus* sp. GM4i (NCBI:txid1475471) (Hoshina, 2014), organismo con el que se alcanzó una máxima similitud para la región V1-V3 del ARNr 18S. En contraposición, con la región parcial V4 se observaron coincidencias con otras accesiones de *Desmodesmus* productores de espinas (Guiry y Guiry, 2019; Shubert y Gärtner, 2015, p. 338). El organismo representante del MOTU M-004 exhibió morfología elipsoide similar a la del representante del MOTU M-003 salvo que no se detectaron agrupaciones en cenobios bajo el microscopio de luz (Figura 9b). En cuanto a la secuencia de la variante M-004, esta coincidió con diferentes accesiones de *Desmodesmus* sp., varias de ellas sin registro fotográfico.

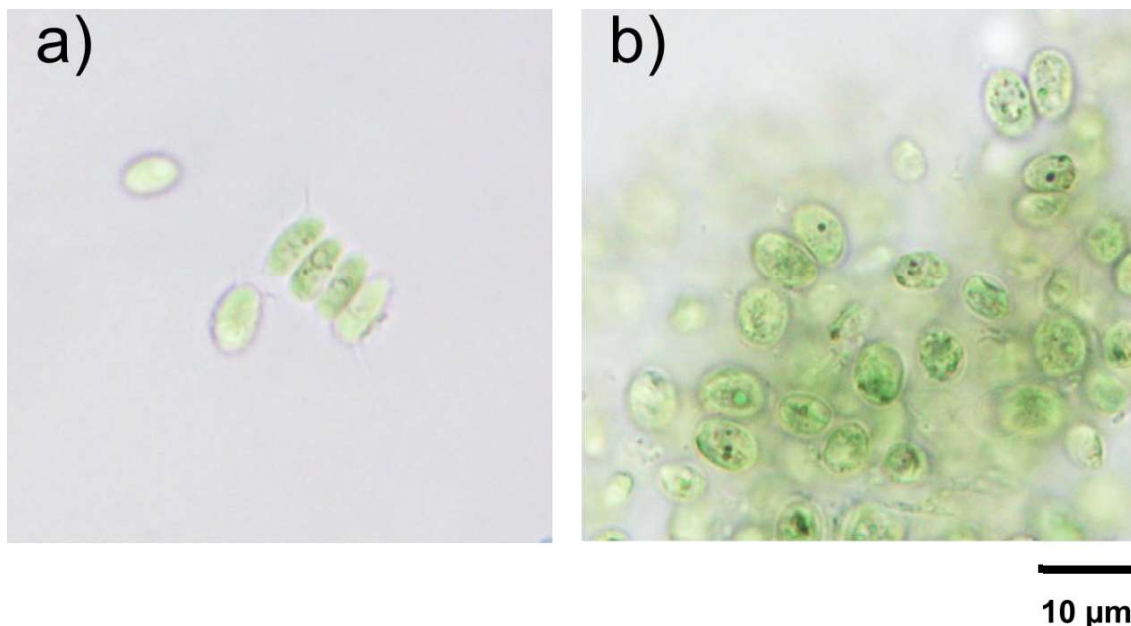


Figura 9. Morfología microscópica de microalgas pertenecientes al grupo II.

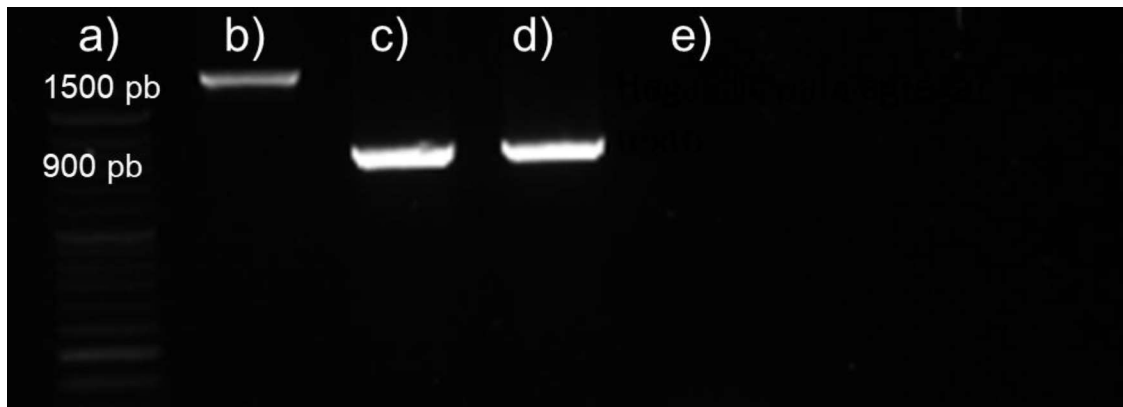
a) MOTU M-003.

b) MOTU M-004.

#### 5.4.4.3. MOTU M-005 (Grupo III)

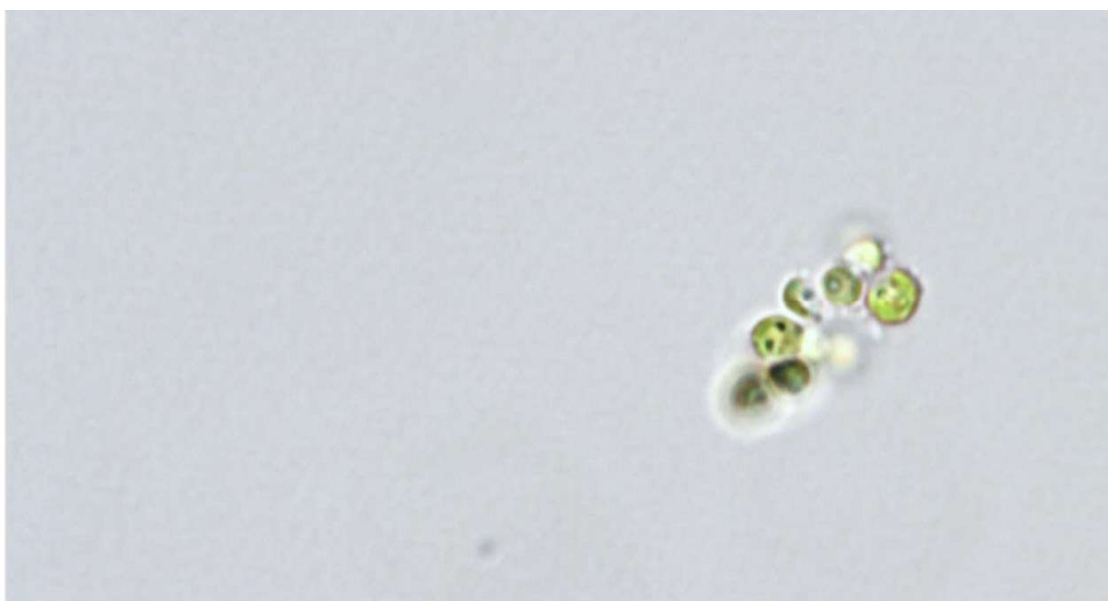
En comparación a las demás secuencias de regiones parciales V4 analizadas, la longitud de la secuencia del MOTU M-005 superó los 700 pb. Para descartar la posibilidad de que se trate de un producto inespecífico, se efectuó una PCR combinando los cebadores A y DIV4rev3, generando un producto de amplificación visualmente cercano a 1500 pb de mayor peso molecular al de controles positivos (Figura 10).

Desafortunadamente, la secuencia de *Scenedesmaceae* sp. Tow 9/21 P-14w (NCBI:txid226310) fue ingresada directamente a la base de datos y no se pueden efectuar comparaciones morfológicas eficientes con el cultivo analizado (Figura 11). Empero el porcentaje de similitud se encontró por debajo del 97 %, establecido para delimitación de especies (Macheriotou et al., 2019, p. 1212). Según el análisis de las regiones parciales V1-V3, el aislado es más cercano a *Desmodesmus* sp. GM4c (NCBI:txid1475469) y GM4j (NCBI:txid1475472) (Figura 12a), organismos que aparentan morfología cocoide similar al aislado representante de M-005 (Hoshina, 2014).



*Figura 10.* Electroforesis de producto de amplificación del aislado representante del MOTU M-005 con los cebadores A y DIV4rev3 en comparación con otros cultivos.

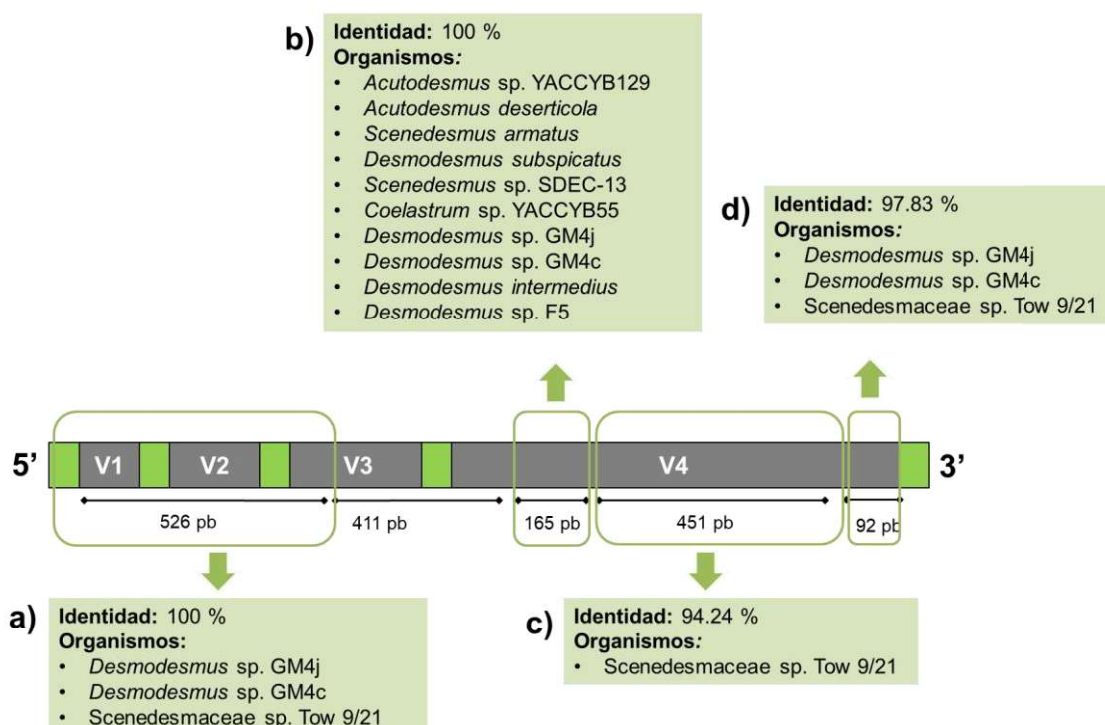
- a) Marcador de peso TrackIT™.
- b) Cultivo representante del MOTU M-005.
- c) y d) Controles positivos.
- e) Control negativo.



10  $\mu$ m

*Figura 11.* Morfología microscópica de microalga presuntamente perteneciente al grupo III.

Al analizar a profundidad la secuencia de la región hipervariable V4, se denotó que las primeras 165 pb y las últimas 92 pb se alinearon con regiones conservadas en diferentes miembros de la familia Scenedesmaceae, incluyendo a *Desmodesmus* sp. GM4c y GM4j (Figuras 12b y 12d). Entre ambos fragmentos, se denotó una inserción que no ha sido reportada en la base de datos GenBank y que fue un 94.24 % al organismo Scenedesmaceae sp. Tow 9/21 P-14w (Figura 12c).



**Figura 12.** Resumen de análisis de las regiones parciales analizadas de ARNr 18S de la variante M-005.

- Regiones parciales V1-V3.
- Primer fragmento de región V4.
- Segundo fragmento de región V4.
- Tercer fragmento de región V4.

Este hallazgo puede ser objeto de investigaciones futuras puesto que la presencia de estos fragmentos puede representar inconvenientes en investigaciones ecológicas (Bachar et al., 2013; Yabuki et al., 2014, p. 1547). Según Bachar et al. (2013) es común que esta clase de inserciones pertenezcan a intrones del grupo I, los cuales participan en el corte y empalme

de ARN. Se conoce que algunos de estos intrones también son capaces de realizar auto empalme, lo que permitiría su movilización a través de genomas eucarióticos (Bachar et al., 2013).

#### **5.4.4.4. MOTUs M-006, M-007, M-008 y M-009 (Grupo IV)**

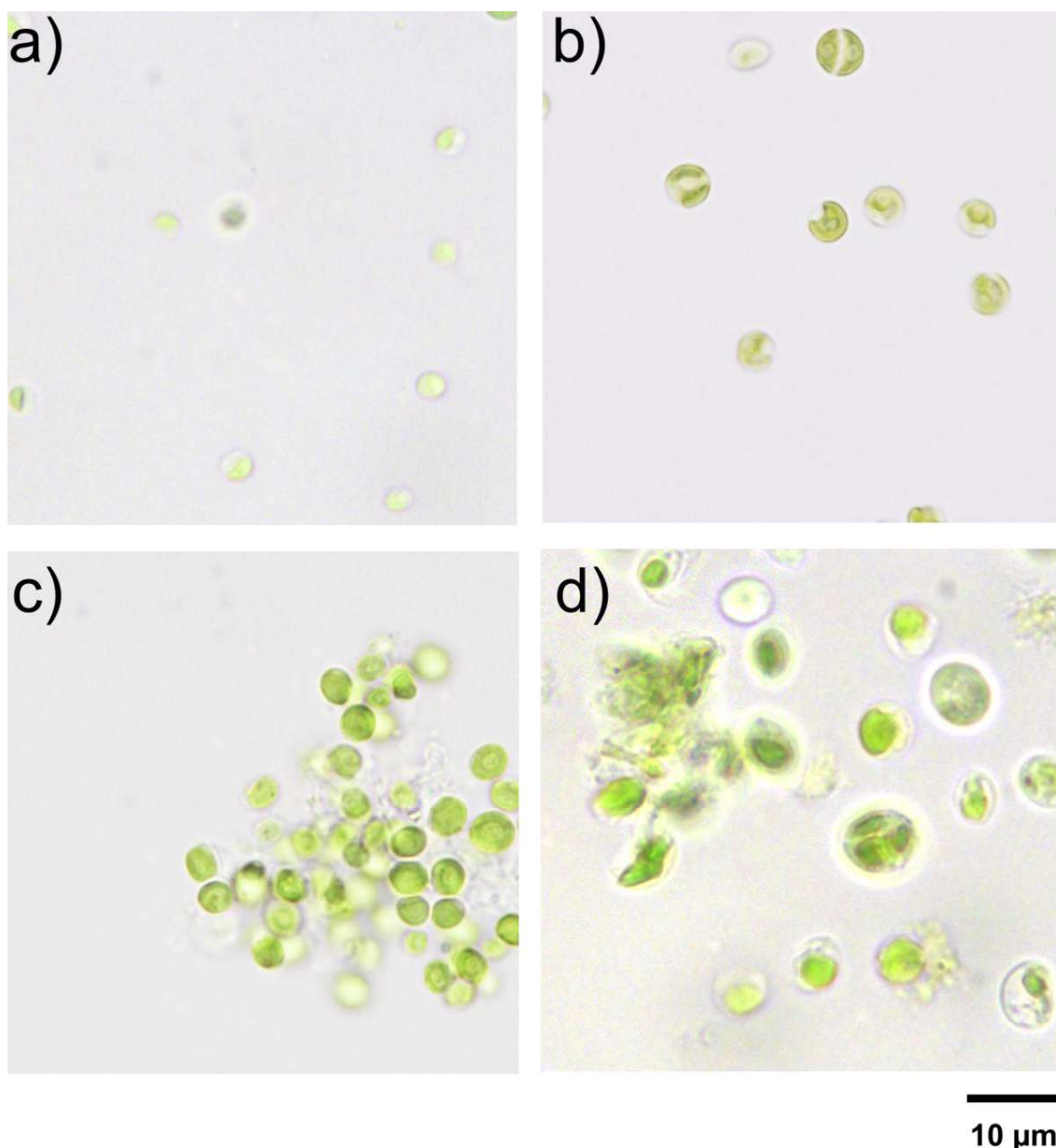
Las microalgas seleccionadas como representantes presentaron caracteres morfológicos compartidos y simples como forma cocoide y cloroplasto único parietal que ocupa casi toda la célula (Figura 13). Esto las hace difíciles de clasificar bajo observaciones microscópicas y ha conducido a varios autores a designarlas como *Chlorella* sp. u organismos parecidos a *Chlorella*, llegando a describirse hasta cien especies bajo dichas denominaciones (Zou et al., 2016).

En base a la región parcial V4, el organismo representativo del MOTU M-006 se categorizó como *Micractinium inermum* (NCBI:txid619280), descartando molecularmente entre múltiples identificadores taxonómicos que mostraron secuencias similares para la región parcial V1-V3. A diferencia de otras especies de *Micractinium*, no se observaron espinas en forma de huso con el microscopio de luz empleado (Figura 13a). Esta característica es relevante para una correcta asignación taxonómica a nivel inferior ya que se conocen únicamente dos especies de *Micractinium* no productoras de espinas: *M. reisseri* y *M. inermum* (Hoshina, 2014).

La secuencia consenso del MOTU M-007 se reportó en 20 microalgas analizadas. Esto puede asociarse a la ubicuidad del género *Chlorella* y relacionados (Dariencko et al., 2016, p. 1136) o al grado de conservación de las regiones analizadas de ARNr 18S (Vieira et al., 2016, p. 156). Ambas características se vieron reflejadas en los resultados de búsqueda en GenBank.

Del mismo modo, las regiones parciales 18S V1-V3 y V4 de la variante M-008 coincidieron totalmente con *Chlorella vulgaris* (NCBI:txid3077), *Marvania coccooides* (NCBI:txid133487), *Neochloris aquatica* (NCBI:txid3099), *Chlamydomonas chlamydogama* (NCBI:txid225041), y *Neodesmus* cf.

*pupukensis* CCAP 211-52. (NCBI:txid178722), por lo que no se pudieron asignar adecuadamente a un taxón determinado. Esto también ocurrió con las secuencias parciales de la variante M-009, prácticamente idénticas a especies de *Dictyosphaerium* (NCBI:txid797680, NCBI:txid797682, NCBI:txid797673) y *Parachlorella* (NCBI:txid3074, NCBI:txid247502).



**Figura 13.** Morfología microscópica de microalgas pertenecientes al grupo IV.

- a) MOTU M-006.
- b) MOTU M-007.
- c) MOTU M-008.
- d) MOTU M-009.



#### 5.4.4.5.MOTU M-010 (Grupo V)

Las secuencias de ARNr del cultivo representativo coincidieron mayoritariamente con *Gloeotilopsis sterilis* SAG 8.88 (NCBI:txid160069). Las diferencias de secuencias pueden atribuirse a que el cultivo identificado molecularmente derivó de una muestra de ecosistema de agua dulce mientras que *G. sterilis* SAG 8.88 fue originalmente aislado de suelo (Deason, 1969, p. 240). Ambos organismos comparten caracteres reconocidos mediante microscopía de luz (Figura 14). Estos incluyen: células en forma abarrilada, formación reversible de filamentos uniseriados de 2 a 16 células, cloroplasto parietal extendido a menos de la mitad y finas paredes celulares (John y Rindi, 2015, p. 415). Conforme a la clave 42 de Bellinger y Sigee (2010, p. 158) ciertos caracteres son similares a los del género *Klebsormidium*, perteneciente a otro orden, el cual ha sido discriminado mediante el análisis filogenético de ARNr 18S en trabajos previos.



Figura 14. Morfología microscópica de microalga perteneciente al grupo V.

Como resumen del análisis de regiones parciales de ARNr 18S, en la Figura 15, se aprecian las relaciones entre los diferentes especímenes analizados. Estos se distribuyeron entre las familias Chlorellaceae, Ulotrichaceae y Scenedesmaceae.

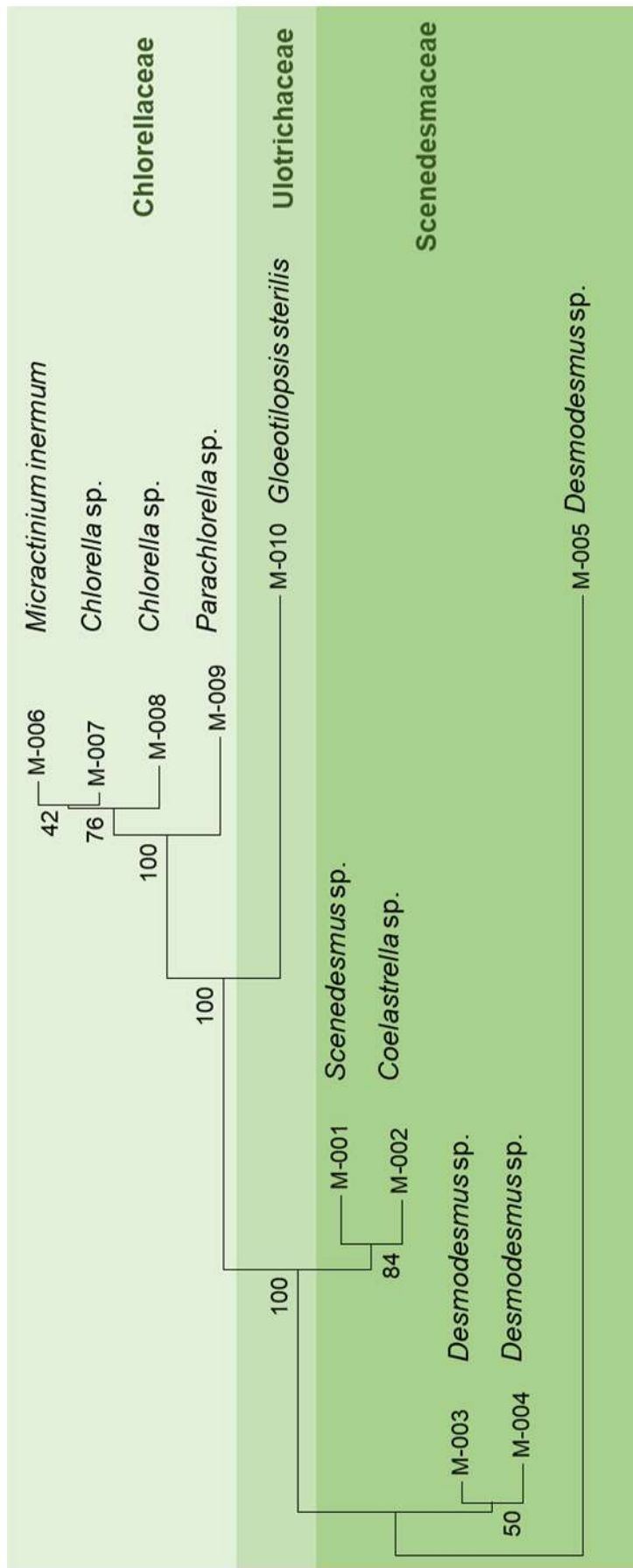


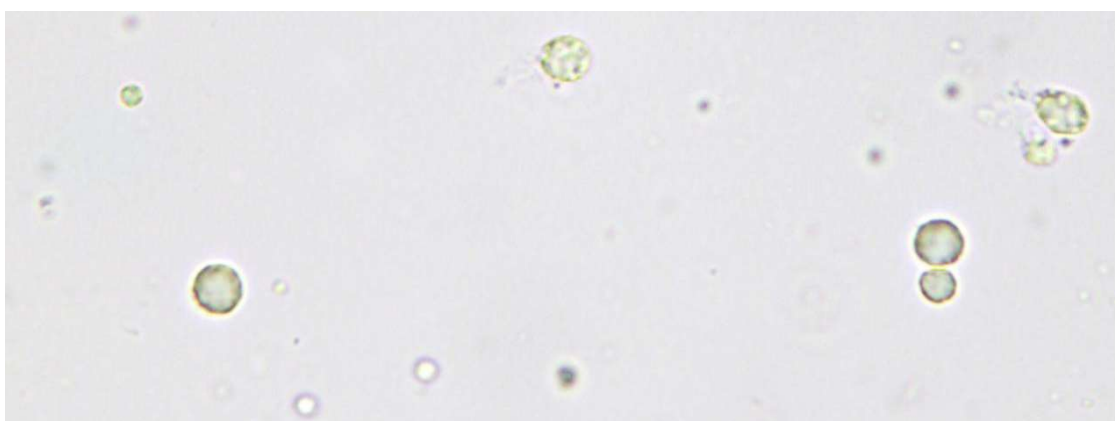
Figura 15. Árbol de Neighbor Joining construido en base a secuencias de las regiones V1-V4 de los organismos analizados.

#### 5.4.4.6. Inconvenientes de la técnica

En varios de los cultivos, los cebadores DIV4for/DIV4rev3 y A/SSU-inR1 detectaron organismos no diana, cuyas secuencias se asemejan a crisofitas flageladas del género *Spumella* o similares (Figura 16). Estas carecen de coloración y su morfología, difícil de reconocer, es parecida a la mostrada en la Figura 17. Estos protistas cumplen roles ecológicos al ser predadores de bacterias y, del mismo modo que las microalgas cultivadas, se desarrollan en ecosistemas de agua dulce de zonas frías a templadas (Grossmann et al., 2016, p. 419), lo que explicaría su detección en las muestras analizadas.

Description	Per. Ident	Accession
<a href="#">Spumella obliqua 18S rDNA gene</a>	100.00%	<a href="#">gij7328328 AJ236860.1</a>
<a href="#">Spumella-like flagellate JBNA45 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	99.65%	<a href="#">gij88660254 DQ388541.1</a>
<a href="#">Spumella sp. TGS1 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence</a>	99.31%	<a href="#">gij357196972 AB585964.1</a>
<a href="#">Spumella sp. CH3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	97.92%	<a href="#">gij433687378 JQ967332.1</a>

*Figura 16.* Resultados de búsqueda en BLAST de secuencias parciales de regiones V1-V4 de ARNr 18S de crisofita no diana.



10  $\mu$ m

*Figura 17.* Flagelado observado en cultivo de microalgas presuntamente perteneciente al género *Spumella* o relacionados.

Con los cebadores A/SSU-inR1 también se obtuvo un producto con secuencia de baja calidad y 95.17 % similar a *Vermamoeba vermiformis* (NCBI:txid5578) (Figura 18), un protista parásito común en ecosistemas de agua dulce. Esto se atribuye a que los cebadores fueron originalmente diseñados en base a un dominio conservado del gen ARNr 18S, teniendo una amplia cobertura para eucariotas (Alemzadeh et al., 2014, p. 298; Lee et al., 2012, p. 701). La detección de esta clase de parásitos no solamente obstaculiza la identificación sino el crecimiento de las microalgas y aplicaciones posteriores, por lo que se sugiere evaluar el uso de agentes biocidas a futuro (Carney y Lane, 2014).

Description	Per. Ident	Accession
<a href="#">Vermamoeba vermiformis strain MG1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	95.17%	<a href="#">KU519742.1</a>
<a href="#">Vermamoeba vermiformis isolate 1 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8:</a>	95.17%	<a href="#">KT185625.1</a>
<a href="#">Hartmannella vermiformis strain 4394 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	95.17%	<a href="#">JQ271687.1</a>
<a href="#">Vermamoeba vermiformis clone JG10.99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	95.17%	<a href="#">JQ519505.1</a>

**Figura 18.** Resultado de búsqueda en BLAST de secuencias parciales de regiones V1-V3 de ARNr 18S de protista no diana.

Para el grupo I, la aplicabilidad del análisis ABGD para clasificación taxonómica es debatible ante evidentes diferencias morfológicas de los representantes de las variantes M-001 y M-002. Por otra parte, el grupo IV está principalmente conformado por especies crípticas. Precisamente, la inclusión de especies crípticas en el análisis es uno de los factores a los que se atribuye la ausencia de una brecha definida en conjunto con eventos breves o recientes de radiación y errores en la identificación de los especímenes. Los dos primeros factores pudieron afectar la identificación morfológica y en conjunto con el tercero, la identificación molecular. Esto se agrava por la falta de bases de datos consistentes, tanto locales como globales, y pueden tener efectos negativos en análisis posteriores (Hoshina, 2014; Koroiva y Kvist, 2018, p. 765).

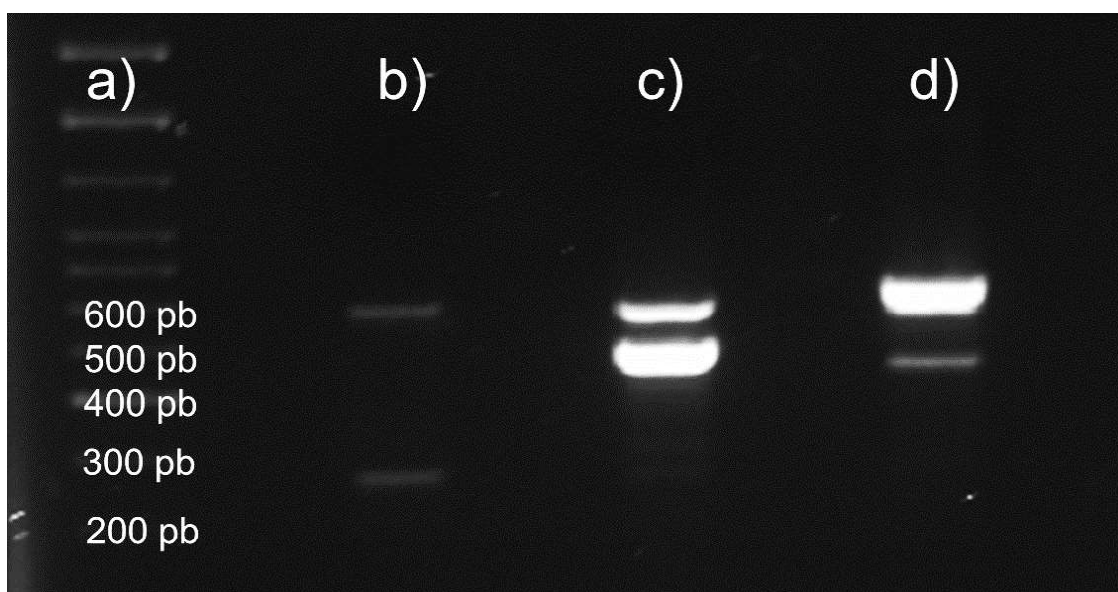
Es importante recalcar que el tamaño de los fragmentos parciales de la región V4 no excedió la longitud de 400 pb en la mayoría de los casos, lo que la hace aplicable para cribados masivos ante la dificultad de secuenciación del gen completo del ARNr 18S, cuya longitud promedio es de 2000 pb (Torres-Machorro et al., 2010, p. 70). Si bien, la amplificación y secuenciación de un único fragmento corto optimizarían el tiempo de análisis, los resultados obtenidos sugieren que la resolución depende del taxón analizado y de la disponibilidad de información en la base de datos GenBank. Para fines de identificación morfológica, los fragmentos de las regiones V1 a V3 fueron prácticos para discriminar entre identificadores taxonómicos y, al estar aguas arriba en el genoma, la secuenciación de ambas regiones es virtualmente posible. El reto yace en las limitaciones de la secuenciación Sanger, en la que la calidad de la lectura se deteriora a partir de las 700 pb (Stranneheim y Lundeberg, 2012, p. 1066).

Aparte de las limitaciones técnicas, los análisis pueden verse afectados a futuro por problemas de contaminación cruzada dada la manipulación de varios operadores durante el suministro de medio de cultivo o la presencia de células contaminantes no detectadas antes de la extracción de material genético o inclusive, la preservación de los cultivos. La contaminación es precisamente uno de los principales obstáculos al que se enfrenta el establecimiento de colecciones vivas de organismos así como las potenciales aplicaciones futuras de los mismos (Ahmed et al., 2018, p. 44). Es crucial la toma de medidas de precaución como almacenar una alícuota del organismo y monitorear minuciosamente la pureza de los cultivos.

#### **5.4.5. Otros marcadores evaluados**

Inicialmente, se planteó la amplificación parcial de la región ITS1-5.8S-ITS2 con los cebadores ITS1-F e ITS4-R a fin de alcanzar una mayor discriminación entre cepas que presentaron similitud morfológica (Hadi et al., 2016; White et al., 1990). Empero, ante la amplificación de dos fragmentos de diferente tamaño en varias de las muestras (Figura 19) y varios fallos de secuenciación,

se descartó el uso del fragmento. Estos inconvenientes han sido asociados a la multiplicidad de copias y longitudes, traducidos en alta variabilidad intra e intergenómica, las cuales obstaculizan la amplificación, secuenciación y alineamiento, y, consecuentemente, la aplicabilidad universal de los ITS (Stern et al., 2012).



*Figura 19.* Productos de amplificación generados con los cebadores ITS1-F e ITS4-R.

a) Marcador TrackIt™.

b) Muestra de microalga perteneciente al MOTU M-004.

c y d) Muestras de microalgas perteneciente al MOTU M-002.

El gen *rbcL* es otro marcador reportado en la literatura cuyo uso fue evaluado empleando los cebadores *rbcL\_192* y *rbcL\_657* (Hadi et al., 2016). Estos cebadores reportaron bajos éxitos de amplificación y secuenciación, lo que puede relacionarse con la falta de regiones conservadas en la amplia gama de géneros analizados (Hadi et al., 2016). Además, la escasez de registros de secuencias de *rbcL* en las bases de datos limita su aplicabilidad universal (Bell et al., 2017).

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

La comparación de secuencias parciales de ARNr 16S e ITS 16S-23S agrupa a los cultivos de cianobacterias en dos MOTUs, correlacionados con el número de géneros distinguidos morfológicamente. Por su parte, el marcador ITS 16S-23S favorece la discriminación a niveles taxonómicos inferiores pero las limitaciones técnicas limitan su universalidad.

La comparación de secuencias parciales de ARNr 18S agrupa a los cultivos de microalgas eucariotas en diez MOTUs, no todos correlacionados con el número de géneros distinguidos morfológicamente. El análisis ABGD de los MOTUs de microalgas eucariotas sugiere la clasificación de los organismos en cinco grupos, uno de los cuales contiene especies crípticas.

Pese a que la región parcial de las subunidades menores del ARNr tiene menor poder resolutivo que otros marcadores, existen más secuencias de las mismas en las bases de datos y aún no se puede prescindir de su uso. Precisamente, la falta de secuencias de referencia es una de las principales limitaciones del Sistema de Código de Barras que dificulta la clasificación efectiva de organismos, así como la falta de información de colecta e inclusión de registros fotográficos en las bases de datos.

Si bien los altos porcentajes de similitud pueden atribuirse a la distribución cosmopolita de las microalgas de agua dulce, estos deben interpretarse cautelosamente de manera que las herramientas de biología molecular no son conclusivas para la determinación de especies por lo que deben validarse mediante estudios taxonómicos y ecofisiológicos.

## 6.2. Recomendaciones

Para los propósitos de la presente investigación, la cantidad de ADN recuperado fue apropiada. Sin embargo, para contar con material genético suficiente para aplicaciones futuras, se recomienda la optimización de la densidad celular inicial y la evaluación de metodologías de lisis y extracción alternativas para diferentes especies.

Evaluar otras regiones marcadoras, específicas para microalgas, con el fin de disminuir la tasa de falsos positivos por presencia de otros microorganismos en el cultivo. A su vez, preservar una alícuota de los microorganismos analizados ya que, en las condiciones del estudio, varios operadores manipularon los cultivos, siendo esta una de las potenciales fuentes de errores de identificación.

La clasificación y nomenclatura de microalgas cambian continuamente, por lo que es fundamental revisar su correcta aplicación y revisión.

La lista de accesiones desplegadas en GenBank no necesariamente pertenece a diferentes identificadores taxonómicos, por lo que se reportó el segundo dato para evitar confusiones. Además, los identificadores taxonómicos reportados en el presente trabajo pueden variar en función de la actualización de las bases de datos. Esto puede afectar la reproducibilidad del análisis.



## REFERENCIAS

- Adams, D., y Duggan, P. (2008). Cyanobacteria-bryophyte symbioses. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1047–1058.
- Ahmed, I., Abbas, S., y Tariq, H. (2018). Importance of Microbial Culture Collection in Pakistan: Challenges and Opportunities. *Bulletin of the BISMIS*, 7(2), 44–48.
- Aishvarya, V., Jena, J., Pradhan, N., Panda, P., y Sukla, L. (2015). Microalgae: Cultivation and Application, pp. 289–311. En: *Environmental Microbial Biotechnology*. Cham, Suiza: Springer International Publishing.
- Akgül, F., Tüney, I., Akgül, R., y Erduğan, H. (2017). Morphological and Molecular Characterization of *Scenedesmus*-Like Species from Ergene River Basin (Thrace, Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17, 609–618.
- Alemzadeh, E., Haddad, R., y Ahmadi, A. (2014). Phytoplanktons and DNA barcoding: Characterization and molecular analysis of phytoplanktons on the Persian Gulf. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(4), 296–302.
- Alonso, M., Lago, F., Vieites, J., y Espiñeira, M. (2012). Molecular characterization of microalgae used in aquaculture with biotechnology potential. *Aquaculture International*, 20(5), 847–857.
- Andersen, R. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Estados Unidos: Elsevier Academic Press.
- Astrin, J., Zhou, X., y Misof, B. (2013). The importance of biobanking in molecular taxonomy, with proposed definitions for vouchers in a molecular context. *ZooKeys*, (365), 67–70.
- Bachar, D., Guillou, L., y Christen, R. (2013). Detection of Introns in Eukaryotic Small Subunit Ribosomal RNA Gene Sequences. *Dataset Papers in Biology*, 2013. Recuperado el 10 de julio de 2019 de <http://dx.doi.org/10.7167/2013/854869>.
- Balch, W., Magrum, L., Fox, G., Wolfe, R., y Woese, C. (1977). An ancient

- divergence among the bacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 9(4), 1600110, 305–311.
- Bell, K., Loeffler, V., y Brosi, B. (2017). An *rbcL* reference library to aid in the identification of plant species mixtures by DNA metabarcoding. *Applications in Plant Sciences*, 5(3). Recuperado el 16 de junio de 2019 de <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3732/apps.1600110>.
- Bellinger, E., y Sigeo, D. (2010). *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*. Chichester, Reino Unido: Wiley-Blackwell.
- Benson, D., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D., Ostell, J., Wheeler, D. (2007). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 35(1), D21–D25.
- Bik, H. (2017). Let's rise up to unite taxonomy and technology. *PLoS Biology*. 15(8), e2002231. Recuperado el 25 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002231>.
- Bold, H. (1949). The Morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, sp. nov. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 76(2), 101–108.
- Borges, V., Oliveira, M., Silva, T., Vieira, A., y Hamann, B. (2018). Region Growing for Segmenting Green Microalgae Images. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 15(1). Recuperado el 8 de julio de 2019 de <https://www.computer.org/csdl/journal/tb/2018/01/07585090/13rUyYBIfi>.
- Borowitzka, M. (2018). Biology of Microalgae. En: *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 23–72). Elsevier.
- Boyer, S., Flechtner, V., y Johansen, J. (2001). Is the 16S–23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics? A Case Study in Cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 18(6), 1057–1069.
- Buchheim, M., Keller, A., Koetschan, C., Förster, F., Merget, B., y Wolf, M. (2011). Internal Transcribed Spacer 2 (nu ITS2 rRNA) Sequence-

- Structure Phylogenetics: Towards an Automated Reconstruction of the Green Algal Tree of Life. *PLoS ONE*, 6(2), e16931. Recuperado el 01 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016931>.
- Buhay, J. (2009). "COI-like" sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology*, 29(1), 96–110.
- Carney, L., y Lane, T. (2014). Parasites in algae mass culture. *Frontiers in Microbiology*, 5(1), 278. Recuperado el 29 de mayo de 2019 de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00278/full>.
- Coates, R., Trentacoste, E., y Gerwick, W. (2013). Bioactive and novel chemicals from microalgae. En: Richmond, A., y Hu, Q. (Eds.), *Handbook of Microalgae Culture* (pp. 504–531). Wiley Blackwell.
- Cobos, M., Paredes, J., Maddox, J., Vargas-Arana, G., Flores, L., Aguilar, C., Marapara, J. y Castro, J. (2017). Isolation and characterization of native microalgae from the Peruvian Amazon with potential for biodiesel production. *Energies*, 10(2), 224. Recuperado el 16 de mayo de 2019 de <http://www.mdpi.com/1996-1073/10/2/224>.
- Collins, R., y Cruickshank, R. (2012). The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 969–975.
- Corrales, M., Villalobos, K., Rodríguez, A., Muñoz, N., y Umaña-Castro, R. (2017). Identificación y caracterización molecular de cianobacterias tropicales de los géneros *Nostoc*, *Calothrix*, *Tolypothrix* y *Scytonema* (Nostocales: Nostocaceae), con posible potencial biotecnológico. *UNED Research Journal*, 9(2), 280–288.
- Darienko, T., Gustavs, L., y Pröschold, T. (2016). Species concept and nomenclatural changes within the genera *Elliptochloris* and *Pseudochlorella* (Trebouxiophyceae) based on an integrative approach. *Journal of Phycology*, 52(6), 1125–1145.
- Day, J., y Brand, J. (2005). Cryopreservation Methods for Maintaining Cultures. En *Algal Culturing Techniques* (pp. 165–187). Nueva York, Estados

Unidos: Elsevier Academic Press.

- Deason, T. (1969). Filamentous and Colonial Soil Algae from Dauphin Island, Alabama. *Transactions of the American Microscopical Society*, 88(2), 240–246.
- Duong, V., Li, Y., Nowak, E., y Schenk, P. (2012). Microalgae isolation and selection for prospective biodiesel production. *Energies*, 5(6), 1835–1849.
- Edwards, K., Johnstone, C., y Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(6), 1349.
- Falaise, C., François, C., Travers, M., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Passeto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V. y Mouget, J. (2016). Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. *Marine Drugs*, 14(9), 159. Recuperado el 24 de noviembre de 2018 de <https://www.mdpi.com/1660-3397/14/9/159>.
- Faldu, N., Patel, S., Vishwakarma, N., Singh, A. K., Patel, K., y Pandhi, N. (2014). Genetic Diversity of Marine and Fresh Water Cyanobacteria from the Gujarat State of India. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(14), 1061–1066.
- Federhen, S. (2012). The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acid Research*, 40(Database issue), D136–D143. Recuperado el 08 de junio de 2019 de <https://academic.oup.com/nar/article/40/D1/D136/2903327>.
- Federhen, S. (2015). Type material in the NCBI Taxonomy Database. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D1086–D1098. Recuperado el 13 de junio de 2019 de <http://academic.oup.com/nar/article/43/D1/D1086/2438106/Type-material-in-the-NCBI-Taxonomy-Database>.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783–791.
- Friedl, T., Rybalka, N., y Kryvenda, A. (2012). Phylogeny and systematics of

- microalgae: An overview. En: C. Posten y C. Walter (Eds.), *Microalgal Biotechnology: Potential and Production* (pp. 11–37). De Gruyter.
- Gaignard, C., Gargouch, N., Dubessay, P., Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Fendri, I., Abdelkafi, S., y Michaud, P. (2019). New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnology Advances*, 37(1), 193–222.
- Gatamaneni, L., Orsat, V., y Lefsrud, M. (2018). Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Korean Society of Environmental Engineers*, 23(3), 229–241.
- Gimpel, J., Henríquez, V., y Mayfield, S. (2015). Metabolic Engineering of Eukaryotic Microalgae: Potential and Challenges Come with Great Diversity. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1376. Recuperado el 01 de diciembre de 2018 de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01376/full>.
- Grossmann, L., Bock, C., Schweikert, M., y Boenigk, J. (2016). Small but Manifold - Hidden Diversity in “*Spumella*-like Flagellates”. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(4), 419–439.
- Grout, B., Morris, J., y McLellan, M. (1990). Cryopreservation and the maintenance of cell lines. *Trends in Biotechnology*, 8, 293–297.
- Guamán-Burneo, M., y González, N. (2016). Catálogo de Microalgas y Cianobacterias de Agua Dulce del Ecuador. *Corporación para la Investigación Energética*.
- Guiry, M., y Guiry, G. (2019). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Recuperado el 01 de mayo de 2019 de <http://www.algaebase.org>.
- Gumińska, N., Płecha, M., Walkiewicz, H., Hałakuc, P., Zakryś, B., y Milanowski, R. (2018). Culture purification and DNA extraction procedures suitable for next-generation sequencing of euglenids. *Journal of Applied Phycology*, 30(6), 3541–3549.
- Guo, L., Sui, Z., Zhang, S., Ren, Y., y Liu, Y. (2015). Comparison of potential

- diatom “barcode” genes (the 18S rRNA gene and ITS, COI, *rbcL*) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *65*, 1369–1380.
- Hadi, S., Santana, H., Brunale, P., Gomes, T., Oliveira, M., Matthiensen, A., Oliveira, M., Silva, F., Bruno, S., y Brasil, B. (2016). DNA Barcoding Green Microalgae Isolated from Neotropical Inland Waters. *PLoS ONE*, *11*(2), e0149284. Recuperado el 13 de febrero de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149284>.
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E., y Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS ONE*, *9*(2), e87624. Recuperado el 03 de febrero de 2019 de [0.1371/journal.pone.0087624](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624).
- Halwachs, B., Madhusudhan, N., Krause, R., Nilsson, R., Moissl-Eichinger, C., Högenauer, C., Thallinger, G., y Gorkiewicz, G. (2017). Critical Issues in Mycobiota Analysis. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 180. Recuperado el 25 de abril de 2019 de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00180/full>.
- Hamady, M., y Knight, R. (2009). Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome research*, *19*(7), pp. 1141–1152.
- Harith, Z., Yusoff, F. M., Shariff, M., y Ariff, A. (2010). Effect of different separation techniques and storage temperatures on the viability of marine microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, during storage. *Biotechnology*, *9*(3), 387–391.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., y DeWaard, J. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313–321.
- Hegewald, E., y Braband, A. (2017). A taxonomic revision of *Desmodesmus* serie *Desmodesmus* (Sphaeropleales, Scenedesmaceae). *Fottea*,

17(2), 191–208.

- Heimann, K., y Huerlimann, R. (2015). Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. En: Kim, S. (Ed.) *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* (pp. 25–41). Academic Press.
- Hopes, A., y Mock, T. (2015). Evolution of Microalgae and Their Adaptations in Different Marine Ecosystems. eLS. Recuperado el 28 de noviembre de 2019 de [https://www.researchgate.net/publication/283260016\\_Evolution\\_of\\_Microalgae\\_and\\_Their\\_Adaptations\\_in\\_Different\\_Marine\\_Ecosystems](https://www.researchgate.net/publication/283260016_Evolution_of_Microalgae_and_Their_Adaptations_in_Different_Marine_Ecosystems)
- Hoshina, R. (2014). DNA analyses of a private collection of microbial green algae contribute to a better understanding of microbial diversity. *BMC Research Notes*, 7(1), 592. Recuperado el 10 de febrero de 2019 de <https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-7-592>.
- International Barcode of Life (2019). DNA Barcoding. Recuperado el 13 de abril de 2019 de <https://ibol.org/about/dna-barcoding/>.
- Iteman, I., Rippka, R., Tandeau De Marsac, N., y Herdman, M. (2000). Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology*, 146, 1275–1286.
- Jagielski, T., Gawor, J., Bakula, Z., Zuchniewicz, K., Zak, I., y Gromadka, R. (2017). An optimized method for high quality DNA extraction from microalga *Prototheca wickerhamii* for genome sequencing. *Plant methods*, 13. Recuperado el 16 de mayo de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5627410/>.
- Johansen, J., Mareš, J., Pietrasiak, N., Bohunická, M., Zima, J., Štenclová, L., y Hauer, T. (2017). Highly divergent 16S rRNA sequences in ribosomal operons of *Scytonema hyalinum* (Cyanobacteria). *PLoS ONE*, 12(10), e0186393. Recuperado el 29 de abril de 2019 de

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186393>.

- John, D., y Rindi, F. (2015). Filamentous (Nonconjugating) and Plantlike Green Algae, pp. 375–427. En: *Freshwater Algae of North America*. Elsevier.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., y Madden, T. (2008). NCBI BLAST: A Better Web Interface. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), W5–W9. Recuperado el 30 de abril de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2447716/>.
- Kapooore, R., Huete-Ortega, M., Day, J., Okurowska, K., Slocombe, S., Stanley, M., y Vaidyanathan, S. (2019). Effects of cryopreservation on viability and functional stability of an industrially relevant alga. *Scientific Reports*, 9(1), 2093. Recuperado el 16 de mayo de 2019 de <https://www.nature.com/articles/s41598-019-38588-6>.
- Kawasaki, S., Mizuguchi, K., Sato, M., Kono, T., y Shimizu, H. (2013). A Novel Astaxanthin-Binding Photooxidative Stress-Inducible Aqueous Carotenoprotein from a Eukaryotic Microalga Isolated from Asphalt in Midsummer. *Plant and Cell Physiology*, 54(7), 1027–1040.
- Kemp, B., Winters, M., Monroe, C., y Lynn Barta, J. (2014). How Much DNA Is Lost? Measuring DNA Loss of Short-Tandem-Repeat Length Fragments Targeted by the PowerPlex 16® System Using the Qiagen MinElute Purification Kit. *Human Biology*, 86(4), 313–329.
- Khan, M., Shin, J., y Kim, J. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 36. Recuperado el 24 de noviembre de 2018 de <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-018-0879-x>.
- Kim, M., Morrison, M., y Yu, Z. (2011). Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), 81–87.



- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., y Johansen, J. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, 86, 295–335.
- Komárek, J., y Johansen, J. (2015a). Coccoid Cyanobacteria. En: J. Wehr, R. Sheath, y J. P. Kociolek (Eds.), *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification* (pp. 75–133). Academic Press, Inc.
- Komárek, J., y Johansen, J. (2015b). Filamentous Cyanobacteria. En: J. Wehr, R. Sheath, y J. P. Kociolek (Eds.), *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification* (pp. 135–235). Academic Press, Inc.
- Konstantinou, D., Gerovasileiou, V., Voultsiadou, E., y Gkelis, S. (2018). Sponges-Cyanobacteria associations: Global diversity overview and new data from the Eastern Mediterranean. *PLoS ONE*, 13(3), e0195001. Recuperado el 21 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195001>.
- Koroiva, R., y Kvist, S. (2018). Estimating the barcoding gap in a global dataset of *cox1* sequences for Odonata: close, but no cigar (pp. 765–771). *Mitochondrial DNA Part A*, 29(5).
- Kress, W., y Erickson, D. (2008). DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 2761–2762.
- Kress, W., y Erickson, D. (2012). DNA Barcodes: Methods and Protocols. En: *DNA Barcodes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 3–8). Totowa, Estados Unidos: Humana Press.
- Krishna Koyande, A., Chew, K., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D., y Show, P. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 16–24.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X:

- Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Lee, G., Park, S., Yum, S., Woo, S., Lee, Y., Hwang, S. Y., Park, H., Moh, S., Lee, S., y Lee, T. (2012). Development of DNA chip for verification of 25 microalgae collected from southern coastal region in Korea. *BioChip Journal*, 6(4), 325–334.
- Lee, R. (2008). *Phycology*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- Lee, R. (2018). *Phycology*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- Lee, Y., Chen, W., Shen, H., Han, D., Li, Y., Jones, H., Timlin, J. y Hu, Q. (2013). Basic Culturing and Analytical Measurement Techniques En: *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 37–68). Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons.
- Lopez, B., Hernandez, J., Bashan, Y., y De-Bashan, L. (2017). Immobilization of microalgae cells in alginate facilitates isolation of DNA and RNA. *Journal of Microbiological Methods*, 135, 96–104.
- Loy, C., y Chu, W. (2012). Biotechnological applications of microalgae. *International e-Journal of Science, Medicine & Education*, 6(1), S24–S37. Recuperado el 15 de abril de 2019 de [http://seacolors.eu/images/Biotechnological\\_applications\\_of\\_microalgae.pdf](http://seacolors.eu/images/Biotechnological_applications_of_microalgae.pdf).
- Luddington, I., Kaczmarek, I., y Lovejoy, C. (2012). Distance and Character-Based Evaluation of the V4 Region of the 18S rRNA Gene for the Identification of Diatoms (Bacillariophyceae). *PLoS ONE*, 7(9), e45664. Recuperado el 28 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045664>.
- Macheriotou, L., Guilini, K., Bezerra, N., Tytgat, B., Nguyen, D., Phuong, T., Noppe, F., Armenteros, M., Boufahja, F., Rigaux, A., Vanreusel, A., y Derycke, S. (2019). Metabarcoding free-living marine nematodes using curated 18S and CO1 reference sequence databases for

- species-level taxonomic assignments. *Ecology and Evolution*, 9(3), 1211–1226.
- Malavasi, V., Škaloud, P., Rindi, F., Tempesta, S., Paoletti, M., y Pasqualetti, M. (2016). DNA-Based Taxonomy in Ecologically Versatile Microalgae: A Re-Evaluation of the Species Concept within the Coccoid Green Algal Genus *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *PLoS one*, 11(3), e0151137. Recuperado el 15 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151137>.
- Manoylov, K. (2014). Taxonomic identification of algae (morphological and molecular): species concepts, methodologies, and their implications for ecological bioassessment. *Journal of Phycology*, 50(3), 409–424.
- McFadden, G. (2014). Origin and evolution of plastids and photosynthesis in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(4), a016105. Recuperado el 16 de junio de 2019 de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3970417>.
- Medlin, L., Metfies, K., John, U., y Olsen, J. (2010). Algal molecular systematics. En: *Unravelling the algae: the past, present and future* (pp. 341–353). Boca Ratón, Estados Unidos: CRC Press.
- Mishra, P., Kumar, A., Nagireddy, A., Mani, D., Shukla, A., Tiwari, R., y Sundaresan, V. (2016). DNA barcoding: An efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. *Plant Biotechnology Journal*, 14(1), 8–21.
- Miteva, V., Rinehold, K., Sowers, T., Sebastian, A., y Brenchley, J. (2015). Abundance, viability and diversity of the indigenous microbial populations at different depths of the NEEM Greenland ice core. *Polar Research*, 34(1), 25057. Recuperado el 21 de mayo de 2019 de <https://polarresearch.net/index.php/polar/article/view/3244>.
- Morales, E., Luna, V., Navarro, L., Santana, V., Gordillo, A., y Arévalo, A. (2013). Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras provenientes de diferentes provincias del Ecuador, destinadas a una

- colección de cultivos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 34(1), 129–149.
- National Center for Biotechnology Information (2019). Nucleotide. Recuperado el 15 de junio de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.
- Neofotis, P., Huang, A., Sury, K., Chang, W., Joseph, F., Gabr, A., Twary, S., Qiu, W., Holguin, O., y Polle, J. (2016). Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. *Algal Research*, 15, 164–178.
- Newby, D., Marlowe, E., y Maier, R. (2009). Nucleic Acid–Based Methods of Analysis. En: *Environmental Microbiology* (pp. 243–284). Elsevier.
- Nickrent, D., y Sargent, M. (1991). An overview of the secondary structure of the V4 region of eukaryotic small-subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 19(2), 227–235.
- Nor Muhammad, N. (2018). Biological Database Searching. En: *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 29–38). Elsevier.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., y Muyzer, G. (1997). PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3327–3332.
- Ong, S., Kukkillaya, V., Wilm, A., Lay, C., Ho, E. X., Low, L., Hibberd, M., y Nagarajan, N. (2013). Species Identification and Profiling of Complex Microbial Communities Using Shotgun Illumina Sequencing of 16S rRNA Amplicon Sequences. *PLoS ONE*, 8(4), e60811. Recuperado el 28 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060811>.
- Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E., y Madamwar, D. (2011). Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*, 102(22), 10163–10172.
- Paz, A., Gonzalez, M., y Crawford, A. (2011). Códigos de barras de la vida: Introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 161–176.
- Powell, E., y Loeffelholz, M. (2018). PCR and Its Variations. En: Y. Tang y W.

- Stratton (Eds.), *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (pp. 327–346). Cham, Suiza: Springer Nature Switzerland AG.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., y Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864–1877.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., y Glöckner, F. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(8), pp. D590–D596. Recuperado el 17 de julio de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531112/>.
- Radha, S., Fathima, A., Iyappan, S., y Ramya, M. (2013). Direct colony PCR for rapid identification of varied microalgae from freshwater environment. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 609–613.
- Rantala, A., Rajaniemi-Wacklin, P., Lyra, C., Lepisto, L., Rintala, J., Mankiewicz-Boczek, J., y Sivonen, K. (2006). Detection of Microcystin-Producing Cyanobacteria in Finnish Lakes with Genus-Specific Microcystin Synthetase Gene E (mcyE) PCR and Associations with Environmental Factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6101–6110.
- Raoult, D., Fournier, P., y Drancourt, M. (2004). What does the future hold for clinical microbiology? *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 151–159.
- Ratnasingham, S., y Hebert, P. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*. Recuperado el 13 de abril de 2019 de <http://www.boldsystems.org/libhtml/docs/bold.pdf>.
- Rezaei-Matehkolaei, A., Makimura, K., Shidfar, M., Zaini, F., Eshraghian, M., Jalalizand, N., Nouripour-Sisakht, S., Hosseinpour, L., y Mirhendi, H. (2011). Use of Single-enzyme PCR-restriction Digestion Barcode Targeting the Internal Transcribed Spacers (ITS rDNA) to Identify Dermatophyte Species. *Iranian Journal of Public Health*, 41(3), 82–94.
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S., Lee, K., y Rashid, N. (2018). Exploring the

- potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 394–404.
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C., Chen, W., y Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246.
- Šebela, M., Jahodářová, E., Raus, M., Lenobel, R., y Hašler, P. (2018). Intact cell MALDI-TOF mass spectrometric analysis of *Chroococciopsis* cyanobacteria for classification purposes and identification of possible marker proteins. *PLoS ONE*, 13(11), e0208275. Recuperado el 12 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208275>.
- Sexton, J., y Lomas, M. (2018). Microalgal Systematics. En *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 73–107). Academic Press.
- Shannon, E., y Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications. *Marine drugs*, 14(4), 81. Recuperado el 07 de abril de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4849085/>.
- Sheath, R., y Wehr, J. (2015). Introduction to the Freshwater Algae. En: *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification* (pp. 1–11). Estados Unidos: Academic Press.
- Shi, X., Lepère, C., Scanlan, D., y Vaultot, D. (2011). Plastid 16S rRNA Gene Diversity among Eukaryotic Picophytoplankton Sorted by Flow Cytometry from the South Pacific Ocean. *PLoS ONE*, 6(4), e18979. Recuperado el 06 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018979>.
- Shubert, E., y Gärtner, G. (2015). Nonmotile Coccoid and Colonial Green Algae. En: J. Wehr, R. Sheath, y J. Kociolek (Eds.), *Freshwater*

- Algae of North America* (pp. 315–373). Elsevier.
- Singh, J., y Saxena, R. (2015). An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. En: *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* (pp. 11–24). Academic Press.
- Škaloud, P., Neusttupa, J., Radochova, B., y Kubinova, L. (2005). Confocal microscopy of chloroplast morphology and ontogeny in three strains of *Dictyochloropsis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*, 44(3), 261–269.
- Sousa, A., y Pereira, M. (2013). A prospect of current microbial diagnosis methods. En: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (pp. 1429–1438). Bajadoz, España: Formatex.
- Stanford University (2019). *Saccharomyces* genome database. Restriction Site Mapper. Recuperado el 07 de julio de 2019 de <https://www.yeastgenome.org/restrictionMapper>.
- Stanier, R., Deruelles, J., Rippka, R., Herdman, M., y Waterbury, J. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1–61.
- Starčič Erjavec, M. (2016). Annealing Temperature of 55 °C and Specificity of Primer Binding in PCR Reactions. *InTech*. Recuperado el 15 de junio de 2019 de <https://www.intechopen.com/online-first/annealing-temperature-of-55-c-and-specificity-of-primer-binding-in-pcr-reactions>.
- Stat, M., Bird, C. Pochon, X., Chasqui, L., Chauka, L., Concepcion, G., Takabayashi, M., Toonen, R., y Gates, R. (2011). Variation in *Symbiodinium* ITS2 Sequence Assemblages among Coral Colonies. *PLoS ONE*, 6(1), e15854. Recuperado el 21 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015854>.
- Stern, R., Andersen, R., Jameson, I., Küpper, F., Coffroth, M., Vaultot, D., Le Gall, F., Véron, B., Brand, J., Skelton, H., Kasai, F., Lilly, E., y Keeling, P. (2012). Evaluating the Ribosomal Internal Transcribed

- Spacer (ITS) as a Candidate Dinoflagellate Barcode Marker. *PLoS ONE*, 7(8), e42780. Recuperado el 02 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042780>.
- Stranneheim, H., y Lundeberg, J. (2012). Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnology journal*, 7(9), 1063–1073.
- Tear, C., Lim, C., Wu, J., y Zhao, H. (2013). Accumulated lipids rather than the rigid cell walls impede the extraction of genetic materials for effective colony PCRs in *Chlorella vulgaris*. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 106. Recuperado el 15 de mayo de 2019 de <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-12-106>.
- Tessarolli, L., Day, J., Vieira, A., Tessarolli, L., Day, J., y Vieira, A. (2017). Establishment of a cryopreserved biobank for the Culture Collection of Freshwater Microalgae (CCMA-UFSCar), São Paulo, Brazil. *Biota Neotropica*, 17(2), e20160299. Recuperado el 16 de mayo de 2019 de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-06032017000200201&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032017000200201&lng=en&tlng=en).
- Torres-Machorro, A., Hernández, R., Cevallos, A., y López-Villaseñor, I. (2010). Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiology Reviews*, 34(1), 59–86.
- Trentacoste, E., Martínez, A., y Zenk, T. (2015). The place of algae in agriculture: policies for algal biomass production. *Photosynthesis research*, 123(3), 305–315.
- Valério, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira, P., y Tenreiro, R. (2009). Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology*, 155(2), 642–656.
- van der Merwe, D. (2014). Freshwater cyanotoxins. En *Biomarkers in Toxicology*, 539–548. Academic Press.
- Vieira, H., Bagatini, I., Guinart, C., y Vieira, A. (2016). *tufA* gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae. *ALGAE*, 31(2), 155–165.



- Visco, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Cordonier, A., Esling, P., Pillet, L., y Pawlowski, J. (2015). Environmental Monitoring: Inferring the Diatom Index from Next-Generation Sequencing Data. *Environmental Science and Technology*, 49(13), 7597–7605.
- Wang, Y., y Qian, P. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS ONE*, 4(10), e7401. Recuperado el 21 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>.
- Wang, Y., Tian, R., Gao, Z., Bougouffa, S., y Qian, P. (2014). Optimal Eukaryotic 18S and Universal 16S/18S Ribosomal RNA Primers and Their Application in a Study of Symbiosis. *PLoS ONE*, 9(3), e90053. Recuperado el 07 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090053>.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *En: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). Academic Press.
- Woese, C., y Fox, G. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms (Archaeobacteria/Eubacteria/Urkaryote/16S ribosomal RNA/molecular phylogeny). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088–5090.
- Wu, D., Jospin, G., y Eisen, J. (2013). Systematic Identification of Gene Families for Use as “Markers” for Phylogenetic and Phylogeny-Driven Ecological Studies of Bacteria and Archaea and Their Major Subgroups. *PLoS ONE*, 8(10), e77033. Recuperado el 24 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077033>.
- Wynne, M., y Hallan, J. (2015). Reinstatement of *Tetrademus* G. M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Feddes Repertorium*, 126(3–4), 83–86.
- Yabuki, A., Toyofuku, T., y Takishita, K. (2014). Lateral transfer of eukaryotic ribosomal RNA genes: An emerging concern for molecular ecology of

- microbial eukaryotes. *ISME Journal*, 8(7), 1544–1547.
- Yalçın-Duygu, D., Udoh, A., Özer, T., y Erkaya, İ. (2017). The characteristics and importance of microalgae culture collections. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 13(1), 80–87
- Yan, N., Fan, C., Chen, Y., y Hu, Z. (2016). The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 962. Recuperado el 04 de julio de 2019 de <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/6/962>.
- Yang, F., Ding, F., Chen, H., He, M., Zhu, S., Ma, X., Jiang, L. y Li, H. (2018). DNA Barcoding for the Identification and Authentication of Animal Species in Traditional Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018: 5160254. Recuperado el 11 de julio de 2019 de <https://doi.org/10.1155/2018/5160254>.
- Yuan, J., Li, M., y Lin, S. (2015). An Improved DNA Extraction Method for Efficient and Quantitative Recovery of Phytoplankton Diversity in Natural Assemblages. *PLoS ONE*, 10(7), e0133060. Recuperado el 16 de mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133060>.
- Zhang, J., Ding, X., Guan, R., Zhu, C., Xu, C., Zhu, B., Zhang, H., Xiong, Z., Xue, Y., Tu, J. y Lu, Z. (2018). Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Science of The Total Environment*, 618, 1254–1267.
- Zimmermann, J., Jahn, R., y Gemeinholzer, B. (2011). Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity and Evolution*. 11(3), 173–196.
- Zou, S., Fei, C., Song, J., Bao, Y., He, M., y Wang, C. (2016). Combining and Comparing Coalescent, Distance and Character-Based Approaches for Barcoding Microalgae: A Test with *Chlorella*-Like Species (Chlorophyta). *PLoS ONE*, 11(4), e0153833. Recuperado el 20 de abril de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153833>.

## **ANEXOS**

## Anexo 1. Glosario de términos y abreviaturas

- **ABGD:** Descubrimiento automático de brechas entre códigos de barras.
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **ARN:** Ácido ribonucleico.
- **Aguas lénticas:** Cuerpos de agua sin corriente.
- **ARNt:** ARN de transferencia.
- **BLAST:** Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos Locales.
- **Cebador:** Cadena corta de nucleótidos que se unen a la región diana de ADN molde en la PCR, aportando un extremo 3'-OH libre para la elongación.
- **Cenocítico(a):** Que presenta múltiples núcleos en un citoplasma común.
- **Cistrón:** Región cromosomal que codifica para una cadena polipeptídica.
- **Colonia:** Conjunto de células capaces de sobrevivir y dividirse independientemente. Cuando la cantidad y disposición celular se mantienen desde el establecimiento de la colonia, esta adquiere el nombre de cenobio.
- **Distancia evolutiva:** Medida de la divergencia entre dos taxones. En el caso de secuencias nucleotídicas, la divergencia se refleja en la tasa de sustituciones.
- **Filamento:** Cadenas de células conectadas por el extremo de sus paredes. Derivan de la división celular en plano perpendicular al eje del filamento.
- **Electroforesis:** Técnica de separación de partículas cargadas basadas en su movilidad a través de un campo eléctrico.
- **Especie:** Categoría taxonómica que agrupa organismos morfológicamente similares con el mismo número cromosómico y capacidad de reproducirse entre sí, dando lugar a descendencia fértil.
- **ITS:** Espaciador Interno Transcrito.

- **MOTU:** Unidad taxonómica operativa molecular que agrupa secuencias con un umbral determinado de similitud definido por el investigador. No necesariamente representan especies diferentes.
- **NCBI:** Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
- **NCBI:txid:** Identificador taxonómico asignado a un organismo en GenBank.
- **pb:** Pares de bases.
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- **Secuenciación Sanger:** Estrategia de secuenciación basada en la PCR en la que se incorporan 2'-deoxinucleótidos a la reacción, los cuales terminan la amplificación en el terminal 3'-OH. Esto genera fragmentos de diferentes tamaños a separarse por electroforesis capilar. En sistemas más modernos, al terminar la amplificación, se emite una señal fluorescente.
- **Talo:** Cuerpo vegetativo de células no diferenciadas.
- **Taxonomía:** Ciencia encargada de la clasificación de los organismos.

