



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE DOS GENES COMO CÓDIGO DE BARRAS DE ADN
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS EPILÍTICAS EN ECUADOR.

AUTOR

Adriana Paulina Haro Ruiz

AÑO

2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE DOS GENES COMO CÓDIGO DE BARRAS DE ADN PARA
LA IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS EPILÍTICAS EN ECUADOR.

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

Profesor Guía

Dra. María Isabel Ballesteros Redondo

Autora

Adriana Paulina Haro Ruiz

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación de dos genes como código de barras de ADN para la identificación de diatomeas epilíticas en Ecuador, a través de reuniones periódicas con la estudiante Adriana Paulina Haro Ruiz, 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 Isabel Ballesteros Redondo
Doctora en Biología con mención en Genética
CI: 1757168610

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado el trabajo, Evaluación de dos genes como código de barras de ADN para la identificación de diatomeas epilíticas en Ecuador, de la estudiante Adriana Paulina Haro Ruiz en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Pablo Castillejo Pons

CI: 1756457493

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”.

Adriana Paulina Haro Ruiz

CI: 0604810432

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre Cumandá por el apoyo, la paciencia y el entusiasmo que me han brindado a lo largo de este camino. De manera especial a mis amigos y familia por siempre estar pendiente de mi seguimiento y brindarme aliento. Agradezco a la doctora Isabel Ballesteros y Pablo Castillejo, por brindarme la confianza para llevar a cabo esta investigación, que me ha brindado su confianza, tiempo, paciencia y motivación durante este proceso.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre por guiarme y siempre apoyarme, el resultado de este trabajo refleja su esfuerzo y el mío. ¡Gracias mamá!

RESUMEN

Las comunidades de diatomeas epilíticas se ven influenciadas por los cambios de las condiciones ambientales de los sistemas acuáticos, siendo usadas como bioindicadores de calidad de agua. Esto requiere una identificación precisa de las especies de diatomeas basada principalmente en características morfológicas de las frústulas de sílice. Esta caracterización requiere gran experiencia, habilidad en microscopía y el uso de guías taxonómicas especializadas. Las nuevas técnicas genómicas pueden ayudar a reducir la complejidad de este proceso y complementar los procesos de bioevaluación y biomonitoreo de ecosistemas acuáticos, mediante la aplicación de marcadores moleculares para la identificación de especies refiriéndose a la implementación de un código de barras genético como una herramienta emergente de uso universal. La principal limitante en la aplicación de estos marcadores es la falta de secuencias de referencia de diatomeas epilíticas, especialmente en el caso de Ecuador. Para resolver este problema se planteó como objetivo principal del proyecto la obtención de las secuencias de dos genes candidatos (*18SV4* y *rbcL*) como códigos de barras de ADN en diatomeas epilíticas de Ecuador, con el fin de evaluar su efectividad en la discriminación de especies. Para ello, fue necesario establecer cultivos puros de las especies de diatomeas identificadas por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, obteniendo una muestra de ADN pura. A partir de la cual se verificó la amplificación y secuenciación de los genes de referencia mencionados para cada especie aislada. En el presente trabajo se han caracterizado taxonómica y molecularmente cinco especies de diatomeas epilíticas de la cuenca alta del río Guayllabamba. Estos resultados suponen el inicio de una base de datos con las secuencias de referencia de las especies de diatomeas epilíticas de esta región, cuya disponibilidad sería aplicable para el desarrollo y aplicación de herramientas moleculares para la biomonitorización del estado ecológico de ecosistemas acuáticos en Ecuador.

Palabras clave: *Diatomeas epilíticas*, código de barras, gen *18s*, gen *rbcL*

ABSTRACT

Epilithic diatom communities are influenced by changes in the environmental conditions of aquatic systems, being used as bioindicators of water quality. This requires an accurate identification of diatom species based primarily on morphological characteristics of silica frustules. This characterization requires great experience, skill in microscopy and the use of specialized taxonomic guides. The new genomic techniques can help reduce the complexity of this process and complement the bioevaluation and biomonitoring processes of aquatic ecosystems, by applying molecular markers to identify species by referring to the implementation of a genetic barcode as an emerging tool of universal use. The main limitation in the application of these markers is the lack of epilithic diatom reference sequences, especially in the case of Ecuador. To solve this problem, the main objective of the project was to obtain the sequences of two candidate genes (*18SV4* and *rbcL*) as DNA barcodes in epilithic diatoms of Ecuador, in order to evaluate their effectiveness in species discrimination. For this, it was necessary to establish pure cultures of the diatom species identified by optical microscopy and scanning electron microscopy, obtaining a pure DNA sample. From which the amplification and sequencing of the reference genes mentioned for each isolated species was verified. In this work, five species of epilithic diatoms of the upper Guayllabamba river basin have been taxonomically and molecularly characterized. These results suppose the beginning of a database with the reference sequences of the epilithic diatom species of this region, whose availability would be applicable for the development and application of molecular tools for the biomonitoring of the ecological state of aquatic ecosystems in Ecuador.

Key words: *Epilithic diatoms, barcode, 18s gene, rbcL gene*

ÍNDICE

1.CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema	4
1.3. Justificación de la investigación	5
1.4. Objetivos del proyecto	6
1.4.1 Objetivo General	7
1.4.2 Objetivos Específicos.....	7
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Diatomeas	7
2.1.1. Generalidades.....	7
2.2. Importancia ambiental	13
2.3 Identificación de especies de diatomeas	14
2.3.1. Identificación taxonómica	14
2.3.2. Técnicas moleculares.....	17
2.4. Base de datos de secuencias de referencia	20
2.5. Cultivo de diatomeas en laboratorio.....	21
3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	22
3.1 Área de muestreo	22

3.2 Recolección de muestras	25
3.3 Cultivo en laboratorio.....	26
3.4 Microscopía	27
3.4.1. Microscopía óptica	28
3.4.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	28
3.5 Extracción de ADN	29
3.6 Análisis molecular.....	29
3.6.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	29
3.6.2. Secuenciación.....	30
3.6.3. Análisis de secuencias.....	31
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. Parámetros físicoquímicos de los puntos de muestreo.....	31
4.2. Obtención de cultivos puros de diatomeas epilíticas a partir de muestras ambientales	32
4.3. Identificación taxonómica mediante microscopia óptica y SEM de las especies aisladas	37
4.3.1. Identificación morfológica por microscopía óptica.....	38
4.3.2. Identificación morfológica por microscopía electrónica de barrido	44
4.4. Identificación molecular de las especies aisladas.....	51
4.5. Alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas	56

4.6. Matriz de distancias Variabilidad intra o interespecífica	59
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
5.1. Conclusiones	67
5.2. Recomendaciones	68
REFERENCIAS	69
ANEXOS	81

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Durante los últimos veinte años se ha evidenciado una alta presión antrópica sobre los ecosistemas de agua dulce en el Ecuador, poniendo en evidencia el deterioro de los cuerpos de agua, refiriéndose tanto a cantidad como calidad (Terneus & Yáñez, 2018), para lograr determinar el nivel de impacto y el tipo de contaminante presente en un cuerpo de agua es mediante el empleo de diferentes organismos acuáticos que actúen como indicadores de estos cambios o perturbaciones (Terneus et al., 2012).

Diferentes grupos taxonómicos han sido empleados para implementar un análisis de la calidad de agua dulce, destacándose particularmente ciertas especies de microalgas eucariotas unicelulares presentes en todos los cuerpos de agua denominadas diatomeas, manejadas como herramientas de evaluación (Salomoni et al. , 2011). De esta manera, las diatomeas epilíticas han sido reconocidas y recomendadas en muchos países como bioindicadores de calidad del agua, capaces de responder a cambios ambientales, especialmente por eutrofización y grados de contaminación, al presentar tolerancia a efectos sobre la biota, desarrollado características interesantes como sensibilidad ante contaminación, disponibilidad de nutrientes, acidez y salinidad (Zimmermann et al., 2014).

En América Latina, el uso de las diatomeas epilíticas ha recibido poca atención hasta el final del siglo XX. A excepción de Brasil, donde un grupo de investigadores desarrollaron un proyecto relacionado con el “uso de las diatomeas como organismos indicadores de contaminación/eutrofización en sistemas lóticos subtropicales y templados”, llegando a proponer el uso del ITCA (Índice Trófico de la Calidad del Agua) en el año 2015 (Lobo et al., 2016). Actualmente, se han iniciado

estudios para establecer el índice trófico Ecuador, al analizar la composición de diatomeas epilíticas con muestras del río Pita, una corriente andina en el área metropolitana de la ciudad de Quito, enfocado en comprobar la relación entre los gradientes de eutrofización de acuerdo a la composición del río, logrando identificar 67 especies de diatomeas pertenecientes a 29 géneros ya existentes (Castillejo et al., 2018).

La identificación de estas comunidades de diatomeas conlleva cierta complejidad, la misma que requiere de un experto y mucho tiempo para efectuar un correcto análisis microscópico para su descripción taxonómica, basada en la morfología de su pared de sílice, llamada frústula y la presencia de una segmentación de dos mitades (valvas) (Abarca et al., 2014).

Actualmente se ha impuesto la identificación de especies basada en el análisis de secuencias génicas, el empleo del código de barras genético es una herramienta confiable en la identificación de especies. Esta herramienta consiste en una secuencia corta de ADN que puede ser amplificada fácilmente, siendo característica de cada especie (Hebert et al., 2003) (Purty & Chatterjee, 2016). En el año 2003, se implementó el Código de Barras de la vida (Barcode of Life) que daría lugar en 2004 al Consorcio del Código de Barras de la Vida (CBOL, <http://www.boldsystems.org/>) conformando una plataforma donde varios investigadores puedan colaborar, identificar y preservar la biodiversidad del planeta. Con respecto a las diatomeas se ha analizado el uso de varias regiones como potenciales códigos de barras genéticos (Evans et al., 2007). Ciertas secuencias como *cox1*, *ITS* y *28S ARNr* han presentado alta variabilidad consideradas adecuadas para estudios taxonómicos, mientras que los genes *18S ARNr* y *rbcL* aparentemente son más apropiados para estudios de biomonitorio debido a su conservación (Mann et al., 2010) (Pawlowski et al., 2016). Inicialmente, el gen de la subunidad grande de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (*rbcL*), marcador de cloroplasto para organismos fotosintéticos, ya que reduce fuertemente la amplificación de productos inespecíficos, como ADN de

bacterias heterotróficas y hongos, siendo aplicado para el estudio filogenético de diatomeas (Dulias et al., 2017).

El segundo gen, se trata del gen *18S*, el cual actúa como marcador frecuentemente utilizado para la investigación filogenética, donde su amplificación parte de las regiones variables cortas dentro del gen *18S ARNr* (Luddington et al., 2012).

Generalmente este marcador sigue dos criterios, su discriminación y universalidad. De esta manera, el poder discriminatorio evalúa la capacidad del marcador para separar especies estrechamente relacionadas y la universalidad describe cuestiones metodológicas tales como la disponibilidad de cebadores universales, la calidad de las secuencias obtenidas y los problemas relacionados con la alineación de secuencias (Jahn et al., 2007).

Varios autores han comprobado la identificación de especies de diatomeas epilíticas en muestras de agua, empleando técnicas de nueva generación de secuenciación conocidas como “metabarcoding” (Zimmermann, Jahn, et al., 2014), obteniendo resultados que presenten una buena correlación entre los datos moleculares y los morfológicos, demostrando el potencial de estas técnicas para la identificación y cuantificación de diatomeas en muestras ambientales (Visco et al., 2015) (Apothéoz et al., 2017).

Sin embargo, para aplicar esta metodología de manera rutinaria es necesaria su optimización y estandarización con la finalidad de obtener datos fiables y comparables. La principal limitante en su aplicación es la falta de secuencias de referencia de diatomeas epilíticas. Para afrontar este problema se ha creado una base de datos de referencia de libre acceso R-syst::diatom (Rimet et al., 2016), permitiendo compartir y centralizar los resultados de diferentes laboratorios aumentando el número de secuencias disponibles. En el caso de Ecuador, se desconoce información sobre las secuencias de diatomeas epilíticas, lo que hace

primordial abordar este aspecto para poder desarrollar técnicas basadas en secuenciación masiva y metabarcoding para estudiar la biodiversidad del grupo y las comunidades en muestras ambientales.

1.2. Planteamiento del problema

El reconocimiento mundial de las diatomeas epilíticas se relaciona con su potencial como bioindicadores de contaminación (Lobo et al., 2016); (Rimet, 2012). Sin embargo, es escasa la evidencia de estudios que determinen la diversidad de las comunidades de diatomeas presentes en los ecosistemas dulceacuícolas de Ecuador, ya que los trabajos previos sobre este grupo se han enfocado más en estudios florísticos, sin interés por su bioindicación. Considerando que el índice biótico desarrollado en distintas zonas geográficas tiene limitaciones en su uso en zonas distintas, se considera pertinente establecer índices locales que alcancen una mayor precisión y susceptibilidad frente a relaciones entre especies y condiciones ambientales (Potapova & Charles, 2007)(Tornés et al., 2007). De esta manera, surge la necesidad de estudiar la estructura de las comunidades de diatomeas epilíticas en diferentes ríos de Ecuador asociadas a parámetros ambientales, que permitiría establecer un índice trófico diatomológico de la región andina de Ecuador. Reto que induce el uso de secuencias génicas como código de barras ADN, ya que se refiere a un método prometedor para la clasificación taxonómica e identificación de especies de diatomeas epilíticas mediante la secuenciación de un gen estándar muy corto y bien definido. Demostrado su aplicabilidad en la última década al lograr la identificación y monitoreo ambiental de diatomeas epilíticas (Zimmerman et al., 2014; Visco et al., 2015). Limitada principalmente por la falta de secuencias de referencia, especialmente en el caso de Ecuador, ya que no cuenta con un registro de especies de diatomeas epilíticas de acuerdo a la información que se maneja en ciertas bases de datos alrededor del mundo. Por este motivo, sería interesante implementar un código de barras de ADN para contribuir a estas bibliotecas de referencias taxonómicas partiendo de muestras ambientales (Castillejo et al., 2018).

De esta manera, se aspira obtener y analizar las secuencias de los genes marcadores *18S* y *rbcL* (Urbánková & Veselá, 2013), abordando suficiente información para distinguir entre especies de diatomeas epilíticas presentes en Ecuador.

En particular, estos datos pueden proporcionar una principal ventaja al emplear estos códigos de barras de ADN con respecto a las observaciones microscópicas, permitiendo la estandarización y automatización de protocolos enfocados de acuerdo con su morfología.

De esta manera, la información de cada especie se puede obtener de una sola muestra independientemente de los personajes morfológicos o de la etapa de la vida para posteriores investigaciones básicas y aplicadas. (Purty & Chatterjee, 2016).

1.3. Justificación de la investigación

El estado actual de los ecosistemas de agua dulce es una prioridad a nivel mundial. El uso de diatomeas como bioindicadores se encuentra incorporado en varias normativas a nivel mundial, incluyendo la directiva marco de la Unión Europea (WFD, 2000). En Ecuador, los pocos estudios y planes de monitoreo y control de la calidad del agua en las cuencas han dejado de lado grupos importantes de diatomeas, aumentando su utilidad en ríos de distintos contextos, como ríos altoandinos, conociendo la diversidad y comportamiento de las diatomeas frente a distintas presiones ambientales. La aplicación de herramientas moleculares al monitoreo y evaluación ambiental es una tendencia en auge.

Este proyecto pretende la implementación de nuevas aproximaciones basadas en ADN (metabarcoding, metagenomics, ambiental DNA) en los protocolos de biomonitoreo ambiental, expandiendo el campo a nuevas líneas de investigación en

áreas como Ecología Molecular y el desarrollo de biosensores microalgales para la detección de contaminación ambiental, fortaleciendo las líneas de investigación de “Biodiversidad y Patrimonio Natural”.

En Ecuador, apenas se han empleado técnicas de identificación y cuantificación basadas en herramientas moleculares, necesarias para conocer las especies de diatomeas presentes en los sistemas acuáticos, concluyendo con la obtención de secuencias de referencia, aportando cierta información a una base de datos que se encuentre disponible para efectuar nuevas investigaciones.

El manejo de este código de barras mediante el empleo de dos genes candidatos (*18S* y *rbcL*), permitirá establecer un monitoreo ambiental como alternativa rentable y de corto tiempo en relación a lo establecido por la morfología tradicional (Urbánková & Veselá, 2013) favoreciendo a adjuntar información pertinente para complementar la base de datos de referencia, generando una comparación entre las comunidades de diatomeas inferidas desde el aspecto morfológico taxonómico identificado por microscopía, reduciendo la divergencia entre los índices moleculares y morfológicos (J. Pawlowski et al., 2016). De esta manera, la ausencia de la información en cuanto al análisis molecular de diatomeas epilíticas, generaría el primer aporte en contribuir información de interés relacionada con la secuencia de cada especie en la base de datos, estableciendo las secuencias de referencia en el Ecuador, cuyo posterior empleo de manera más específica con el fin de incentivar el desarrollo del campo biotecnológico en el país con su correcta y eventual aplicación.

1.4. Objetivos del proyecto

1.4.1 Objetivo General

Evaluar el uso de dos genes candidatos (*18SV4* y *rbcL*) como códigos de barras de ADN, de diatomeas epilíticas en Ecuador.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Establecer cultivos puros de las especies de diatomeas epilíticas provenientes de la cuenca del río Guayllabamba.
- Obtener la base de secuencias de código de barras de ADN de diatomeas epilíticas de Ecuador.
- Analizar molecularmente la variabilidad genética de las secuencias obtenidas.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. DIATOMEAS

2.1.1. Generalidades

Las diatomeas son eucariotas unicelulares microscópicas altamente diversas y cosmopolitas pertenecientes al género *Bacillariophyta*, ubicado en casi todos los hábitats acuáticos, incluidas aguas dulces, marinas y suelos húmedos (Hernández-Becerril, 2014). Se caracterizan y diferencian de las algas verdes por su capacidad única de diseñar una mezcla de sílice, proteínas y carbohidratos para formar capas complejas de sílice con elementos arquitectónicos específicos (Cimarelli et al., 2015).

Constituyen uno de los grupos de microalgas más importantes que integran la comunidad fitoplanctónica, distinguidas como organismos unicelulares

fotosintetizadores en suspensión en aguas abiertas oceánicas o continentales (Lobo et al., 2016).

Su mecanismo metabólico fotosintetizador consiste en convertir la energía de la luz solar en energía química en forma de ATP (trifosfato de adenosina), esta reacción química confiere a las diatomeas la capacidad de producir sus propios nutrientes (azúcares). Además, mediante fotosíntesis absorben y fijan grandes cantidades de dióxido de carbono atmosférico (CO₂) mientras captan luz y agua para generar una fracción importante del oxígeno en la Tierra (Saade & Bowler, 2009).

Diatomeas epilíticas

Se designa el nombre de diatomeas epilíticas a las microalgas que crecen adheridas en sedimentos fluviales de agua dulce como rocas, aprovechando los nutrientes disponibles en el biofilm, optimizando su crecimiento en relación a las condiciones ambientales estresantes del medio en el que se desarrollan, reflejando en su sensibilidad y adaptación (McGowan et al., 2018).

El crecimiento de las especies de diatomeas epilíticas depende de las interacciones entre los procesos hidrológicos y ciertas variables fisicoquímicas, biológicas, ecológicas y estacionales. Esta última tiene gran influencia en la estructura de la comunidad de diatomeas dependiendo de varios parámetros como son temperatura, luz, flujo y cantidad de nutrientes que afectan a su distribución temporal y, por consiguiente, también la de otros organismos, como el zooplancton (Nunes, Adams, & Bate, 2019). Además, de considerar las variables que influyen en la calidad del agua como conductividad eléctrica, pH, sólidos disueltos totales, demanda química de oxígeno, demanda bioquímica de oxígeno y concentración de nutrientes como fósforo y nitrógeno, que de igual manera juegan un papel importante en la regulación de la tasa de producción y la composición de especies de algas epilíticas (Kuo, Yu, Kuan, Kuo, & Lin, 2016).

Morfología

Su pared celular denominada frústula se compone de dos piezas silíceas (valvas), superpuestas entre sí como una placa de Petri. Las dos valvas están unidas por bandas superpuestas de sílice, denominadas bandas de faja (Figura 1A). Algunas características como la forma de la valva, las estructuras de las paredes y los tubos a través de las valvas, así como su disposición son específicos de cada especie, siendo probable que existan al menos de 30,000 a 100,000 especies en la actualidad (Medlin, 2016). A menudo, las valvas silíceas y las bandas de faja poseen una microarquitectura compuesta por poros (Figura 2) característicos de cada especie de manera organizadas y compleja, interfiriendo en varios procesos como el suministro de vías para el intercambio de nutrientes y gases con el entorno circundante y la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (Molino & Wetherbee, 2008).

De acuerdo con la forma de sus frústulas, se las pueden clasificar en dos tipos, redondeadas (diatomeas centradas) o alargadas (diatomeas pennadas). A continuación, se detalla la diferencia entre ellas, relacionando su simetría, sitio en donde se las encuentra y posición de rafes (Tabla 1).

Tabla 1

Clasificación de diatomeas por su morfología.

Características	Diatomeas centradas	Diatomeas pennadas
Simetría	Radial (Fig1.B)	Bilateral (Fig1.B)
Ubicación	Columnas de agua	Biopelículas formadas en superficies naturales o artificiales

Posición y número de rafe	Birafida (dos roces, ambos presentes en una válvula o uno en cada válvula)	Monorafida (un rafe)
	Arafida (sin rafe)	

Con respecto a la ubicación del tipo pennadas, se relaciona a su capacidad para adherirse a los sustratos a través de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) secretadas a través de una estructura conocida como rafe (Figura 1B)(Richard, Mitbavkar, & Landoulsi, 2017). Entre los extremos del rafe proximal en diatomeas se ubica un nódulo central (Figura1. B) cuya área es densamente silicificada (Round, F.E., Crawford, R.M. and Mann, 1990).

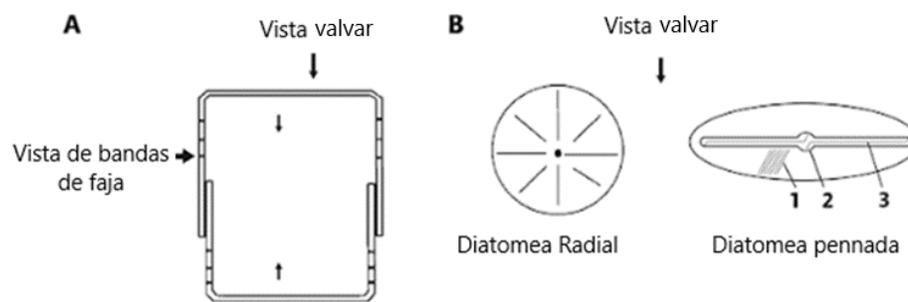


Figura 1. (A) Vista general superpuesta de las valvas silíceas y las bandas de faja (B) Tipos de diatomeas y estructura general de la válvula 1. Estría 2. Nódulo central 3. Rafe. Gráfica adaptado de (Castellani & Edwards, 2017).

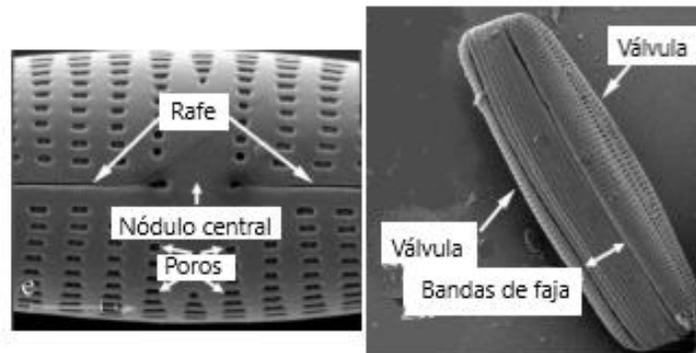


Figura 2. Estructura de una diatomea pennada observado por microscopía electrónica de barrido. Gráfica adaptada de (Molino & Wetherbee, 2008).

El tamaño de estas especies abarca un amplio rango desde $<2 \mu\text{m}$ hasta más de $200 \mu\text{m}$ en un diámetro esférico equivalente, lo cual afecta a varios procesos fisiológicos e incluso la absorción de energía lumínica, fotosíntesis y respiración, difusión y captación de nutrientes afectando considerablemente su crecimiento (Li & Campbell, 2017).

Reproducción

El ciclo de vida de las diatomeas comprende dos etapas de reproducción diferentes, asexual y sexual. Por un lado, en la reproducción asexual (fase vegetativa), la célula se divide mitóticamente, de manera que separa ambas valvas, lo que da como resultado dos algas diferentes, una más grande que la otra (Sánchez et al., 2019) (Figura 3). Cada una heredada por células hijas, que reconstruyen nuevas mitades de sílice más pequeñas dentro de las células maternas (Nanjappa et al., 2017).

Por otro lado, el tamaño celular promedio de las microalgas alcanza un tamaño crítico donde no pueden reducirse, en el cual interviene la reproducción sexual (fase comparativa) dando paso a su fertilización generando la formación de auxosporas o cigotos, cuya pared celular es blanda permitiendo la ampliación celular y formación

de una nueva capa de sílice al conseguir de nuevo su tamaño máximo (Nanjappa et al., 2017) y de esta manera poder formar una nueva microalga de tamaño completo que volverá a iniciar el proceso (Sánchez et al., 2019) (Figura 3).

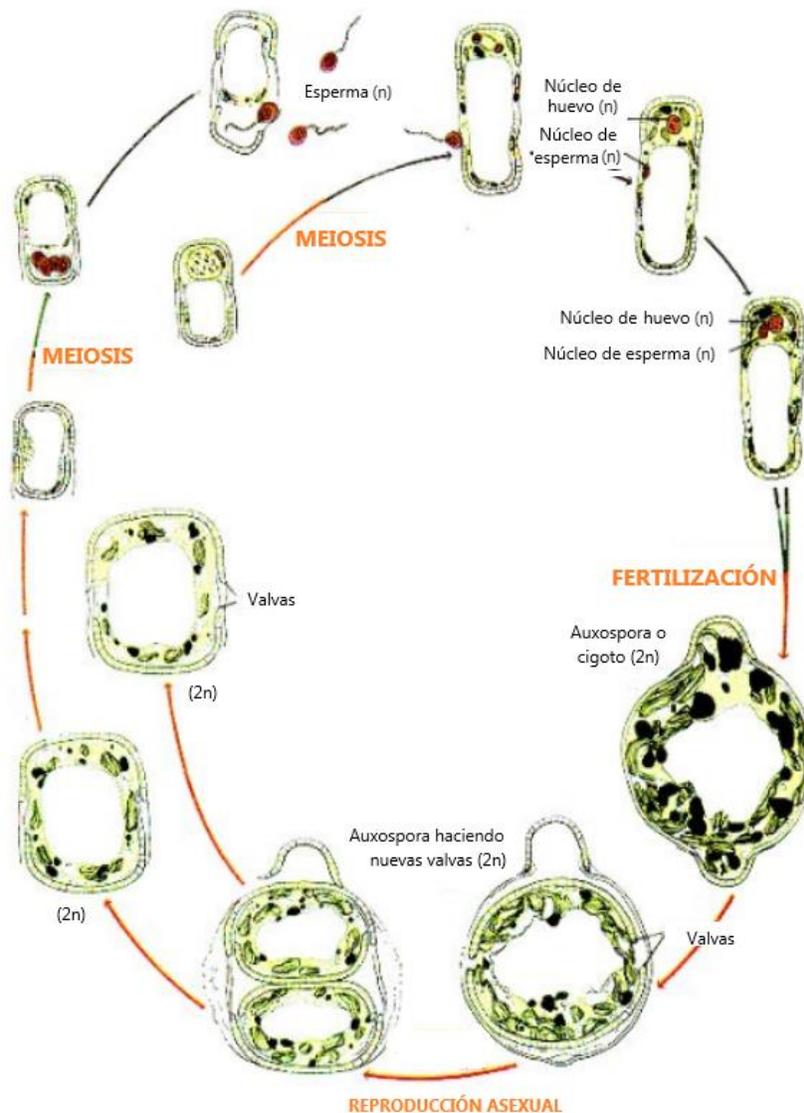


Figura 3. Ciclo de vida: *Diatomea radial*. Gráfica adaptada de (Raven, Evert, & Eichhom, 1992).

2.2. IMPORTANCIA AMBIENTAL

▪ **Producción de oxígeno**

Las estimaciones actuales indican que contribuyen alrededor del 45% de la producción primaria marina total y el 20% de la fijación global de carbono, considerados como impulsores clave de la bomba de carbono biológica. Por lo tanto, una comprensión de su ecología es clave para predecir cómo el cambio climático afectará el funcionamiento de los ecosistemas marinos y el ciclo del carbono (Kirkham et al., 2017).

▪ **Productores primarios de la cadena alimenticia**

Las diatomeas producen ácidos grasos de cadena larga, siendo así conforman una fuente importante de estas moléculas ricas en energía que son alimento para toda la red alimentaria, desde el zooplancton hasta los insectos acuáticos y peces (Virta & Soininen, 2017).

▪ **Bioindicadores biológicos de sistemas acuáticos**

Las diatomeas son protistas fotótrofos comunes en todos los ecosistemas acuáticos y se utilizan ampliamente como bioindicadores de las condiciones ambientales, particularmente en ríos y arroyos (Lobo et al., 2015), debido a su crecimiento sobre algunas superficies como rocas (epilíticas), granos de arena (episamon) o sobre el sedimento (epipelon) (Lobo, Heinrich, Schuch, Düpont, et al., 2016).

Reconocidas mundialmente como uno de los componentes biológicos más apropiados para la evaluación de la calidad del agua, debido a su presencia continua a lo largo del sistema acuático y su rápida respuesta a los cambios ambientales (Segura-García, Cantoral-Uriza, Israde, & Maidana, 2012), debido a que cada especie crece en distintos rangos de pH y salinidad, además de variables ambientales, incluyendo la concentración de nutrientes, sedimentos suspendidos, régimen de flujo, elevación y para diferentes tipos de perturbaciones humanas, cuya

adaptabilidad permite evaluar y monitorear la condición biótica de las aguas (Lobo et al., 2016).

Su importancia se debe a diversos factores, entre los más destacados podemos mencionar: 1) recolección de muestras relativamente simple; 2) estos organismos responden rápidamente y previsiblemente a cambios en la química de sus hábitats debido a su sensibilidad a las condiciones ambientales; 3) gran diversidad taxonómica; 4) tiempo de regeneración corta; 5) presencia en todos los hábitats, permitiendo comparaciones entre diferentes regiones (Visco et al., 2015), respondiendo de manera inmediata a cambios en los factores químicos, físicos o biológicos, ya sea por causas naturales o antropogénicas. Estas características comprenden su vinculación como bioindicadores representativos en cuanto a la composición química del agua que las rodea (Kuo et al., 2016).

2.3 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE DIATOMEAS

2.3.1. Identificación taxonómica

La identificación taxonómica de diatomeas se la realiza mediante técnicas de microscopía, lo cual requiere de conocimiento taxonómico amplio para lograr discernir a cada especie por categoría morfológica, llegando a considerar varias características principales como tamaño, forma y diseño de las valvas (Visco et al., 2015).

Usualmente en microscopía óptica se diferencian varios aspectos distintivos entre cada especie como medidas morfométricas de su longitud y ancho (eje apical y transapical correspondiente, Figura 4); y características de la frústula como la densidad de las estrías y fíbula (Figura 4) (Sánchez et al., 2019).

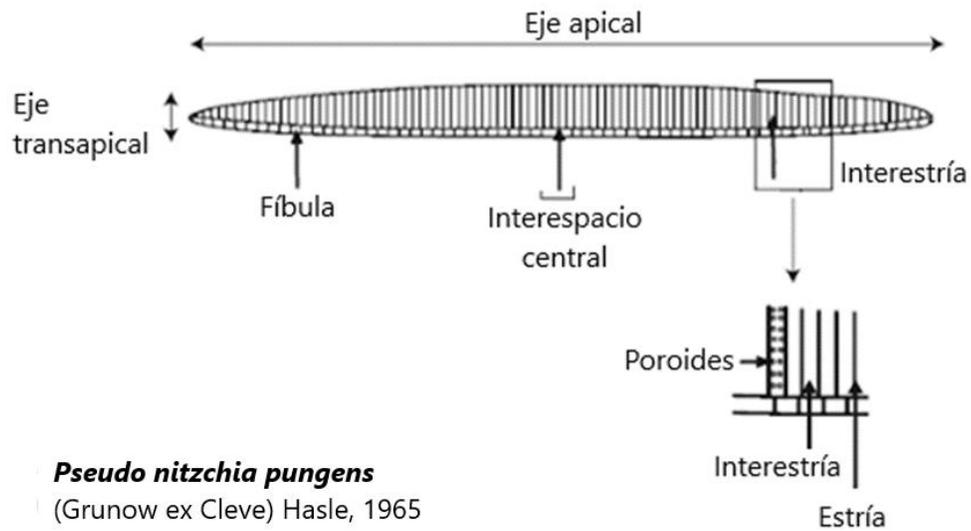


Figura 4. Estructura interna de una diatomea pennada. Gráfica adaptada de (Castellani & Edwards, 2017).

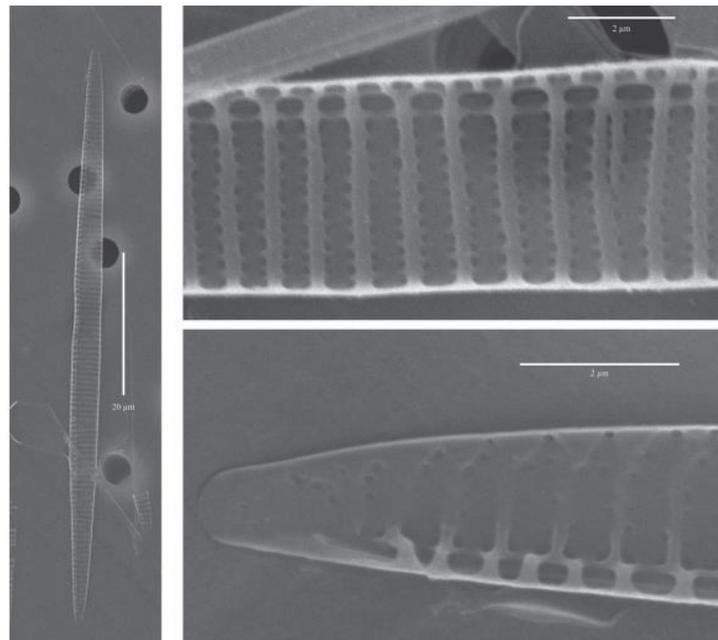


Figura 5. *Pseudo-nitzschia pungens*. SEM 1. Válvula entera 2. Extremo de la válvula 3. Detalles de la válvula. Gráfica adaptada de (Tenorio et al., 2016).

A su vez, desde principios del siglo XX, los avances tecnológicos en técnicas microscópicas han permitido el estudio de estos organismos a mayor detalle refiriéndose al manejo de la microscopía electrónica, con el fin de distinguir y caracterizar la distribución de los poros/areola para su identificación (Figura 5) (Round et al., 1990), mediante el manejo de un microscopio electrónico de transmisión (TEM) o un microscopio electrónico de barrido (SEM). El primero se utiliza para la citología de microalgas (estructura y organización de orgánulos), además de contribuir a la comprensión de la estructura de la frústula de diatomeas. El segundo ha proporcionado imágenes en 3D de la morfología frustular, así como la fisonomía de la comunidad de diatomeas. Una de las desventajas al emplear SEM se refleja en la composición de las muestras, ya que la mayoría de muestras biológicas presenta un alto contenido de agua lo cual dificulta su integridad (Fránková et al., 2018).

De esta manera, la taxonomía y clasificación de las diatomeas se someten a una revisión significativa basada en la arquitectura de su frústula en 3D, logrando crear nuevos taxones de diatomeas basados en características de diagnóstico reconocibles solo en SEM (Fránková et al., 2018).

Una vez registrados los aspectos descritos, se procede a relacionarlos e identificarlos con muestras de diatomeas de distintas regiones previamente descritas en la literatura como el Atlas de diatomeas de la región de Rhône-Alpes en Francia (Bey & Ector, 2013) o plataformas virtuales como *Diatoms of North America* (University of Colorado, 2019) , cuya desventaja se vincula con la gran cantidad de especies y similitud entre especies, debido a que la variabilidad intraespecífica puede ser muy alta, y algunos caracteres morfológicos pueden volverse indistintos como resultado de la reducción de tamaño y textura durante su ciclo de vida (Visco et al., 2015).

2.3.2. Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares fueron aplicadas en la investigación de diatomeas por primera vez en la década de 1980, de manera que se han venido realizando estudios filogenéticos moleculares para identificarlas y clasificarlas con el fin de superar las limitaciones morfológicas (An et al., 2017).

Código de barras de ADN

La comprensión profunda de la taxonomía de diatomeas ha sido uno de los principales problemas para su identificación, por ello se ha establecido una solución que evita su imprecisión, relacionada con la estandarización y automatización de protocolos y reducción del tiempo de análisis, complementando las identificaciones microscópicas con identificaciones moleculares basadas en secuencias de ADN mediante el manejo de código de barras de ADN, perteneciente a una especie en particular (Moniz & Kaczmarska, 2009).

Este método realiza análisis moleculares basados en las diferencias en cada secuencia de ADN según la especie. Por lo tanto, las secuencias de ADN son únicas denominadas códigos de barras para cada taxón (An et al., 2017). Un código de barras de ADN se refiere a una o pocas secuencias de genes relativamente cortas presentes en el genoma que son lo suficientemente únicas para identificar especies. la clasificación taxonómica y la identificación de especies mediante la secuenciación de una secuencia de ADN estandarizada muy corta en un gen bien definido, esta información puede obtenerse de un solo espécimen, independientemente de los caracteres morfológicos o de su etapa de vida (Purty & Chatterjee, 2016).

Para llevar a cabo el análisis filogenético molecular de diatomeas se emplean genes como marcadores específicos, siendo pertinente considerar dos criterios para su selección adecuada, ya sea por su poder discriminatorio y universalidad. El poder

discriminatorio evalúa la capacidad del marcador para separar especies estrechamente relacionadas, mientras que la universalidad describe problemas metodológicos como la calidad de las secuencias obtenidas y problemas relacionados con la alineación de secuencias (Urbánková & Veselá, 2013). Además, se deben tomar en cuenta ciertas características para construir marcadores de código de barras ideal, entre ellas podemos citar (1) la secuencia corta debe ser amplificarse con facilidad, para ser secuenciada siguiendo protocolos de laboratorio estandarizados, (2) se debe encontrar flanqueada por una región conservada en la que se pueden colocar cebadores universales, y (3) se puede identificar a nivel de especie (Zimmermann et al., 2011).

Con el fin de evaluar los criterios mencionados, se han realizado varios estudios en diatomeas, considerando diferentes regiones de ADN ya sea que se encuentren dentro del gen nuclear (ARNr), o a su vez genes mitocondriales y del cloroplasto. Entre ellos, se ha empleado la subunidad I del citocromo c oxidasa (*coxI*) presente en la mitocondria, el espaciador transcrito interno (ITS) y con mayor frecuencia el gen nuclear 18S ARNr y el gen de la subunidad grande de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (*rbcL*) codificada en los cloroplastos, ya que resultan ser menos variables y mayormente universales cuya información es suficiente para distinguir entre las especies de diatomeas (Visco et al., 2015).

Gen 18S ARNr

El gen 18S es parte del núcleo funcional ribosomal (ARNr) del genoma de diatomeas, por lo general, su secuencia posee regiones flanqueantes altamente conservadas permitiendo el uso de cebadores universales debido a su fácil acceso y disposición repetitiva dentro del genoma, proporcionando cantidades excesivas de ADN de plantilla al momento de realizar una reacción aleatoria de la cadena de la polimerasa (PCR) (Santhosh et al., 2015).

El gen 18S ARNr es un marcador importante para la PCR en el cribado de la biodiversidad ambiental, empleado con frecuencia para investigaciones filogenéticas. Presenta limitaciones ya que es relativamente largo, para lo cual se ha optado en utilizar regiones variables cortas dentro del gen, conformando una alternativa más prometedora, debido a su alto éxito de amplificación y su poder de resolución razonable, entre las regiones identificadas se ha seleccionado a la región V4 de 60 pb , como la más variable en el gen de 18S ARNr de aproximadamente 1800 pb y su presencia entre regiones flanqueantes (Jahn et al., 2007), dadas estas características esta región ha sido declarada como el precódigo de barras para distinguir efectivamente especies en ciertos grupos, evaluado por el grupo de trabajo de protistas (ProWG) del Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL) (Jan Pawlowski et al., 2012).

En recientes estudios se ha visto necesario realizar una combinación de las nuevas secuencias con secuencias de la región V4 que se encontraban disponibles en GenBank, con el objetivo de probar el poder de resolución de la región 18S V4 como un eficiente código de barras para diatomeas (Luddington et al., 2012).

Gen ribulosa bifosfato carboxilasa subunidad grande (*rbcL*)

La enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (rubisco) se encuentra en plantas, algas y bacterias fotosintéticas, responsable de la asimilación de dióxido de carbono en la biosfera a través del ciclo de Calvin-Benson. Formada por dos subunidades una grande y una pequeña (Santhosh et al., 2015).

Una región de 600 pb en el extremo 5 'del gen de la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (*rbcL*) es responsable de la fijación de carbono, por lo que presentan una serie de modificaciones postraduccionales, cuyo gen es codificado por plastidios ha sido utilizado con mayor frecuencia en estudios de

identificación molecular debido a su capacidad para distinguir entre los taxones de diatomeas (Valegård et al., 2018).

En recientes estudios ha demostrado ser particularmente adecuado para la detección de variantes intra e interespecíficas y la especiación críptica en diversos géneros de diatomeas, logrando discriminar especies complejas de diatomeas y estimar la filogenia (Guo et al., 2015).

2.4. BASE DE DATOS DE SECUENCIAS DE REFERENCIA

El potencial del manejo de códigos de barra genético permiten obtener una gran cantidad de datos por secuenciación y, en consecuencia, una descripción detallada de las comunidades de diatomeas, estos datos se relaciona con la construcción de una base de datos, que posteriormente puede ser empleada como método para la identificación de nuevas especies o selección de taxones óptimos para estudios filogenéticos e incluso indicar el alcance geográfico de las divergencias en una población (Moniz & Kaczmarzka, 2009).

Dando paso en el año 2012 a la creación de una biblioteca de códigos de barras de referencia para diatomeas de acceso libre, denominada R-Syst::diatom, desarrollada en el marco de la red del INRA (Instituto Nacional Francés para la Agricultura) aceptado por el Comité Europeo de Normalización (CEN), como una investigación colaborativa de diversos laboratorios. Cuya investigación vincula y recopila las secuencias pertenecientes a las cepas de su propia colección de cultivo Thonon (TCC) con criterios morfológicos logrando identificar genéticamente y taxonómica a cada especie de diatomeas (Lenaïg Kermarrec et al., 2014).

Los datos que se presentan provienen de dos fuentes, una pertenece a la colección de cultivo de algas de agua dulce mantenida en el INRA, frecuentemente codificada

para nuevas cepas y la otra pertenece a la base de datos de nucleótidos publicado en NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Rimet et al., 2015).

Estos datos siguen un procedimiento regular de curación para mantener su calidad, refiriéndose a la homogeneidad taxonómica de las muestras de diatomeas, calidad de la secuencia y la trazabilidad de los datos, para de esta manera eliminar secuencias de mala calidad, secuencias ambientales o secuencias aparentemente mal identificadas, ofreciendo datos comprobados y curados sobre los genes 18S y *rbcL* con más de 2500 secuencias relacionadas con su identidad taxonómica, representado con más de 900 especies y 200 géneros. Además, de proporcionar información fenotípica necesaria como morfología, formas de vida y requisitos ecológicos de cada especie (Rimet et al., 2015).

2.5. CULTIVO DE DIATOMEAS EN LABORATORIO

Para aplicar las técnicas de identificación descritas es necesario establecer la obtención de cultivos axénicos, ya que se trata de un procedimiento importante para investigar la ecología y fisiología de las especies de diatomeas. De modo que, se han desarrollado varios métodos para conseguir cultivos axénicos viables mediante combinaciones de diferentes métodos: separación física mediante tratamiento por ultrasonidos, agitación con vórtex, filtración, centrifugación diferencial, tratamiento con diversos antibióticos, de manera que logre separar físicamente a las microalgas de bacterias, ya que se encuentran asociadas a las frústulas de diatomeas (Ishii et al., 2018). Sin embargo, estos métodos provocan un efecto secundario debido a que las interacciones con bacterias pueden afectar de manera beneficiosa o parasitaria, es por ello que se opta por el aislamiento de cultivos axénicos cuyo fin se relaciona con la secuenciación del genoma de cada especie aislada (Pinder et al., 2019).

Siendo oportuno emplear métodos físicos y químicos para llevar a cabo un aislamiento de células de diatomeas individuales para posteriormente asegurar una

correcta extracción de ADN e identificación taxonómica (Shishlyannikov et al., 2011).

Un medio de cultivo apropiado debe incluir macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, junto con un pH óptimo y elementos quelantes necesarios para el crecimiento adecuado de las células de diatomeas. Simultáneamente, las diatomeas epiliticas al desarrollarse en rocas requieren de silicato disuelto (DSi) como nutriente adicional involucrado en la construcción de su pared celular silícea (frústulas) (Spilling et al., 2010). Estas condiciones se deben tomar en cuenta al considerar el comportamiento fisiológico y biológico que pueden afectar su crecimiento en condiciones in vitro, además de tomar en cuenta la modulación de la temperatura y fotoperiodo (Gautam et al., 2016).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Área de muestreo

Para el presente estudio, se consideraron dos puntos de muestreo (Tabla 2), ubicados en la cuenca alta del río Guayllabamba, situada en la región interandina norte del Ecuador, considerada como una de las fuentes importantes para el abastecimiento de agua del Distrito Metropolitano de Quito y su área de influencia.

Tabla 2

Puntos de muestreo de la Cuenca alta del río Guayllabamba.

Río	Longitud	Latitud	Altitud (m.s.n.m)	Punto	Nominación
San Pedro	-78,672676	-0,58822	3600,5	1.1	1.1 SP
San Pedro	-78,677732	-0,609456	3553,6	1.3	1.3 SP
Jambelí	-78,594184	-0,572955	3161,4	2	JAM

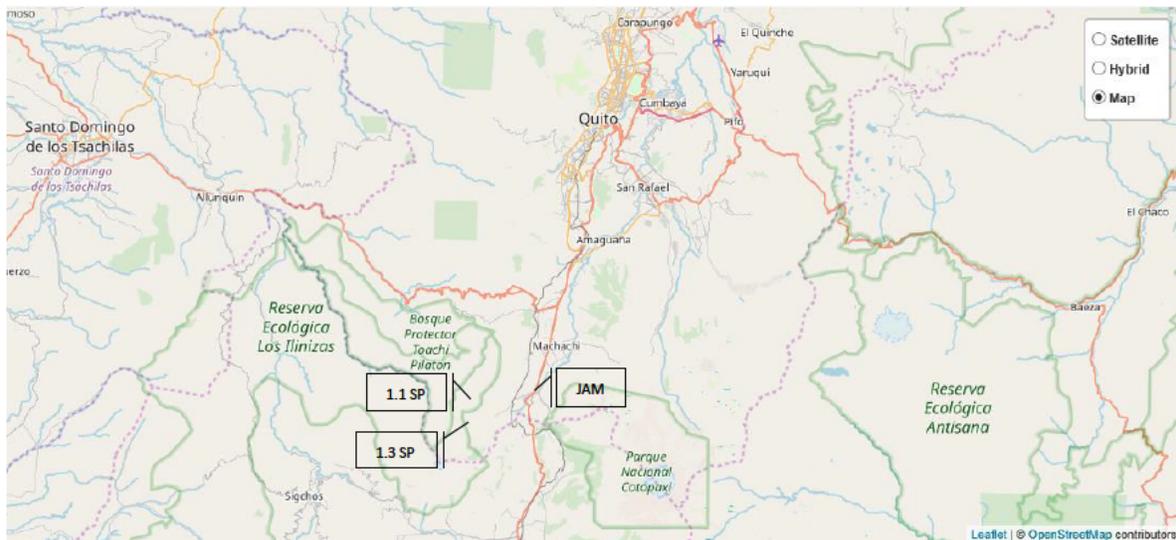


Figura 6 . Mapeo de la posición de los 3 sitios de muestreo ubicados en la provincia de Pichincha. Fuente (Mapsdirections.info, 2018).

A continuación, se tomaron alícuotas de agua de cada punto de muestreo y se llevaron al laboratorio de Ingeniería Ambiental de la UDLA para su análisis fisicoquímico, obteniendo los siguientes valores detallados en la Tabla 3.

Tabla 3

Parámetros físicoquímicos de cada punto de muestreo.

Parámetros físicoquímicos	Punto de muestreo		
	1.1 SP	1.3 SP	JAM
pH	7.42	8.6	7.78
Oxígeno (mg/l)	8.92	8.78	7.97
Oxígeno (%)	114.2	114.2	109.1
Nitritos (mg/l)	<0.001	<0.001	0.061
Nitratos (mg/l)	0.726	0.942	3.347
Fosfatos (mg/l)	0.064	0.919	17.277
DBO5 (mgO₂/L)	2	1	6
Sulfatos (mg/l)	0.016	37.333	1.805
Alcalinidad (CaCO₃/L)	9.312	37.246	27.935

Estos valores se utilizaron para analizar el estado de calidad del agua de cada punto de muestreo, determinado por el Índice de calidad del agua (WQI), propuesto por Brown et al. (1970) (Oram, 2014), cuyo cálculo se ha establecido gracias al software habilitado y estandarizado por la Fundación Nacional de Saneamiento (NSF) NSF-WQI de los Estados Unidos, el cual receipta los datos físicoquímicos, los compara y los transforma en una escala que varía entre 0 a 100 puntos, clasificando por rangos

al índice de calidad como excelente (90-100), bueno (70-90), medio (50-70), malo (25-50) y muy malo (0-25) (Misaghi et al., 2017).

Los datos recopilados en la Tabla 3 fueron ingresados en el software de NSF, proporcionando un rango de índice de calidad de agua para cada punto de muestreo representado en la siguiente gráfica (Figura 7), con la finalidad de correlacionar la calidad de agua de los ríos basado en la presencia de diatomeas epilíticas, debido a que se escogieron estos 3 puntos esperando que tengan variación de acuerdo con su eutrofización.

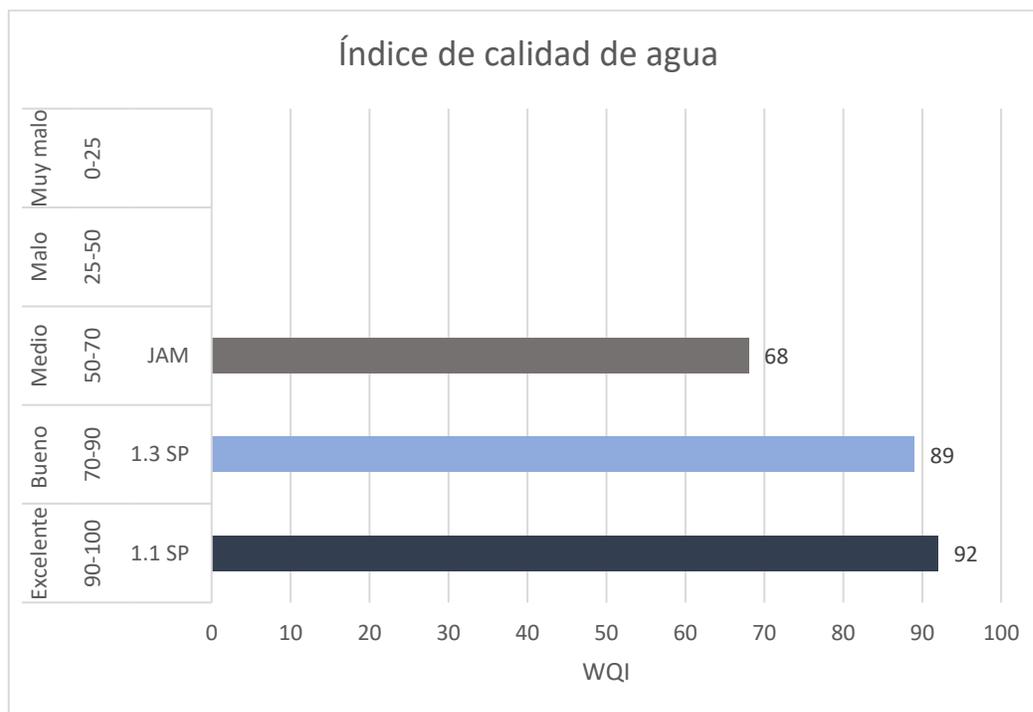


Figura 7. Representación gráfica de acuerdo con el Índice de calidad de agua para los puntos de muestreo.

3.2 Recolección de muestras

Se tomaron dos muestras de diatomeas epilíticas recolectadas de la superficie de rocas sumergidas completamente en el río con orientación al sol de acuerdo a cada

punto de muestreo mediante un raspado de la coloración marrón presente, lo que indica la presencia de diatomeas epilíticas (Heinrich et al., 2014).

Las muestras recolectadas fueron trasladadas en frío al laboratorio de la Universidad de las Américas (UDLA) para su cultivo e identificación.

3.3 Cultivo en laboratorio

En primer lugar, se procedió a filtrar las muestras ambientales colectadas con el fin de eliminar restos de materia orgánica o sedimentos, a través de un papel filtro. A continuación, se observó el filtrado al microscopio invertido para comprobar la presencia de diatomeas, de esta manera una parte fue destinada para realizar pruebas de cultivo puro y otra fue suplementada con medio de cultivo para ser reservada como stock.

Para el crecimiento de diatomeas se emplearon de manera simultánea tres medios de cultivo: Bold's Basal Medium (BBM), Chu10, Wright's cryptophyte (WC) (Andersen & Harrison, 2004) (Anexo 2), con un pH de 7.6 tanto para medios líquidos y sólidos con un porcentaje de 1.5% de bactoagar.

La manipulación de los cultivos se realizó en condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar horizontal en cabina de bioseguridad Thermo Scientific. Los cultivos se dejaron crecer a temperatura ambiente (15°C-20°C) con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una humedad del 50%.

Para el crecimiento de las muestras puras en laboratorio se probaron tres estrategias:

1. Siembra directa de la muestra ambiental

Se sembró directamente 300µl de muestra ambiental en medios de cultivo sólido en placas Petri, con ayuda de un asa de digralski de vidrio esterilizada.

2. Diluciones del cultivo madre y siembra en placa con medio sólido

Se realizaron 3 diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) en frascos de vidrio a partir de cada muestra ambiental. Se los dejó crecer por cuatro semanas hasta observar una coloración marrón en el medio de cultivo líquido correspondiente.

Por otro lado, se sembraron 300 μ l de cada dilución en los tres medios de cultivo sólido empleados en el estudio (Chu10, WC y BBM).

3. Captura de diatomeas del cultivo madre mediante microscopio invertido

Se tomó una alícuota de la muestra ambiental y se la observó al microscopio invertido en una caja petri de plástico, posteriormente con ayuda de una pipeta pasteur se capturaron células independientes de diatomeas. A continuación, se dejaron crecer en tubo de vidrio de 5ml de medio W.C.

En las tres estrategias, se visualizó el crecimiento de colonias formadas en los cultivos sólidos y coloración marrón en cultivos líquidos en el microscopio para comprobar la presencia de diatomeas.

De esta manera, las colonias observadas fueron sembradas en medios sólidos por aislamiento con ayuda de un asa de platino esterilizada, de manera sucesiva hasta obtener colonias puras. Al dejarlas crecer durante 15 días se tomaron colonias aisladas y fueron inoculadas en 500 μ L de medio líquido.

3.4 Microscopía

Para confirmar la presencia de una o varias especies de diatomeas se llevaron a cabo dos técnicas microscópicas, correspondiente a una visualización in vivo y el reconocimiento de frústulas.

3.4.1. Microscopía óptica

3.4.1.1. Identificación morfológica in vivo

Para observarlas in vivo, se procedió a tomar muestras de las colonias formadas en los halos extremos de cada aislamiento en los medios de cultivo sólido o a su vez 50uL del cultivo líquido, observados directamente a 100x.

3.4.1.2. Identificación morfológica de frústula

Para la visualización de las frústulas, se realizó un pretratamiento de cada colonia aislada y precipitada en tubos eppendorf con 500uL del medio de cultivo en el que creció. Para ello, se añadió 1mL de ácido nítrico puro a cada tubo dejándolos calentar en un termobloque a 90°C por 30 minutos, se los centrifugó a 2000rpm por 1 minuto y se lo lavó por 2 veces continuas con agua destilada (Taylor et al., 2013). Posteriormente, se complementó el tratamiento para preparar la placa para su identificación al microscopio con la preparación de una solución stock de naphrax, el cual consistió en calentarlo en baño maría hasta obtener su estado líquido y se añadió 6ml de tolueno. A continuación, se tomó un cubreobjetos y se lo colocó en una plancha de calentamiento, donde se depositó gota a gota el precipitado de cada tubo eppendorf hasta lograr cubrirlo y dejarlo secar; en seguida se colocó una gota de naphrax sobre un portaobjetos y se colocó el cubreobjetos de manera invertida; se lo dejó burbujear y se realizó presión sobre la placa para adherir la muestra y así ser visualizarlo en el microscopio.

3.4.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para la identificación morfológica se observaron los cultivos puros manipulados con el pretratamiento mencionado al microscopio electrónico de barrido (SEM) en los laboratorios de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Complementando su identificación, se observó al microscopio con objetivo 100x las placas tratadas con naphrax y se relacionaron algunas características con un manual on-line de identificación, lo cual permitió realizar una comparación entre las fotos obtenidas con las ya existentes en plataformas virtuales certificadas. Además de ser determinada con la colaboración de expertos en el tema.

3.5 Extracción de ADN

Aquellos cultivos que se comprobó la presencia de una única especie, se extrajo su ADN mediante el protocolo de Edwards et al, (1991), con ciertas modificaciones (Anexo1). A continuación, se procedió a realizar una cuantificación del ADN, mediante el NanoDrop200, usando como blanco agua Mili-Q midiendo la absorbancia a 260/280.

Además, se procedió a verificar la integridad del ADN extraído mediante gel de electroforesis de agarosa al 0.8% con buffer TBE 1x durante 30 min a 120V con tinción SYBR Safe (Invitrogen).

3.6 Análisis molecular

3.6.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los genes candidatos *18S ARNr* (Visco et al., 2015) y *rbcL* (Vasselon et al, 2017), se seleccionaron cebadores diseñados en estudios previos. A excepción, del cebador forward para el gen *rbcL* que se diseñó anteriormente por el grupo de investigación (Tabla 3).

Tabla 3

Secuencias de cebadores empleados para el análisis molecular.

Gen	Dirección	Secuencia (5'-3')
18s ARNr subregión V4	Forward	GCG GTA ATT CCA GCT CCA ATA G
	Reverse	CTC TGA CAA TGG AAT ACG AAT A
rbcL	Forward	CAG TTG CGG CTT TAC GTT TAG A
	Reverse	CCT TCT AAT TTA CCA ACA ACT G

La reacción de amplificación se realizó usando la enzima Platinum Taq Master Mix (1x), agua mili-Q, cebadores con una concentración de 0.25 uM y 25 ng de ADN. A continuación, las reacciones se llevaron a cabo en un Termociclador Eppendorf Masterecycler Pro. En todas las reacciones se incluyó una muestra con agua miliQ como control negativo.

Las condiciones para la PCR consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturalización; hibridación a 48.5°C por 30 segundos; extensión a 68°C por 30 segundos y una extensión final a 68°C por 1 minuto.

Una vez concluido el proceso, se comprueba la amplificación mediante un gel de electroforesis de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1x, teñido con SYBER safe durante 30 min a 120V. Como marcador de paso molecular para comprobar el tamaño del amplicón se usó el marcador de peso molecular de 100pb (100 bp DNA ladder, Invitrogen).

3.6.2. Secuenciación

Los productos de PCR obtenidos se enviaron a secuenciar en el servicio de secuenciación de la Universidad de las Américas (UDLA) utilizando el método tipo Sanger.

3.6.3. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se ensamblaron mediante el software libre MEGA7 (Kumar et al., 2016) y se construyó un alineamiento con ClustalW y el modelo Tamura de 2 parámetros para obtener su variabilidad genética que incluyó nuestras secuencias y varias secuencias depositadas en Genbank (Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI Resource Coordinators, 2002) para las especies con mayor homología de otras regiones geográficas. Además, se realizó un análisis filogenético mediante el modelo estadístico *Neighbor-joining* utilizando el método de máxima probabilidad y el modelo Tamura para la creación de un árbol filogenético de máxima verosimilitud con el programa MEGA7 (Oram, 2014) (Kumar et al., 2016).

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Parámetros físicoquímicos de los puntos de muestreo

Para los puntos de muestro 1.1 SP, 1.3 SP, JAM los índices de calidad de agua mostraron rangos de excelente (92), bien (89) y medio (68) correspondientemente, indicando una diferencia entre los dos puntos del río San Pedro y el punto del río Jambelí. Los datos mostraron diferencias en cuanto al contenido de materia orgánica correspondiente a sus condiciones de alta concentración de fosfatos y DBO; y en cuanto al grado de eutrofización generado por la presencia de nitratos y fosfatos en el agua. Estas relaciones nos indican que existirían diferencias en la composición biológica de las especies de diatomeas encontradas en los dos puntos de muestreo (Castillejo et al., 2018).

En general, la relación entre los parámetros físicoquímicos y la población de diatomeas, es representada por la disponibilidad de nutrientes en cada punto de

muestreo, en este caso su presencia en agua del río garantiza una gran abundancia pero baja diversidad, ya que la distribución general de diatomeas está muy sesgada hacia las formas pennadas en agua dulce con un valor > 90% y solo una pequeña sección está representada por formas céntricas (Sharma et al., 2011).

Entre las especies reconocidas como tolerantes a la contaminación orgánica y eutrofización, se argumenta que el género de diatomeas *Nitzschia* abarca un rango amplio de ambientes con un estado óptimo ecológico hasta ambientes altamente contaminados (Heinrich et al., 2014).

Entre las especies presentes en agua dulce con altas concentraciones de fosfato, la especie abundante y bioindicadora corresponde al género *Sellaphora* desarrollándose en ambientes eutróficos y orgánicamente contaminados (Heinrich et al., 2014).

Al conocer las especies adaptativas y bioindicadoras de cada ambiente, se puede mencionar que en los puntos de muestreo correspondientes al río San Pablo habrá abundancia de especies cuyo género sea *Nitzschia* para su posterior muestreo, mientras que para el punto de muestreo correspondiente al río Jambelí habrá abundancia de especie del género *Sellaphora*, lo cual nos ayudará a reconocer con facilidad la especie que interese aislar.

4.2. Obtención de cultivos puros de diatomeas epilíticas a partir de muestras ambientales

A partir de las tres estrategias mencionadas en el apartado de metodología para el crecimiento de las muestras puras en laboratorio, en este proyecto se implementó una nueva metodología a partir de las siguientes estrategias:

Las tres estrategias por analizar fueron:

1. Siembra directa de la muestra ambiental

Las muestras ambientales correspondiente a los puntos de muestreo se sembraron en medios sólidos CHU10, BBM y WC, logrando visualizar una coloración parduzca y verde en ciertas placas al cabo de un mes, que al observar al microscopio correspondían a mezcla de especies de diatomeas y en casos específicos como en el medio WC, la presencia mayoritaria de algas verdes o a su vez no existió crecimiento (Figura 8), por lo tanto, se descartó realizar cultivos en este medio.

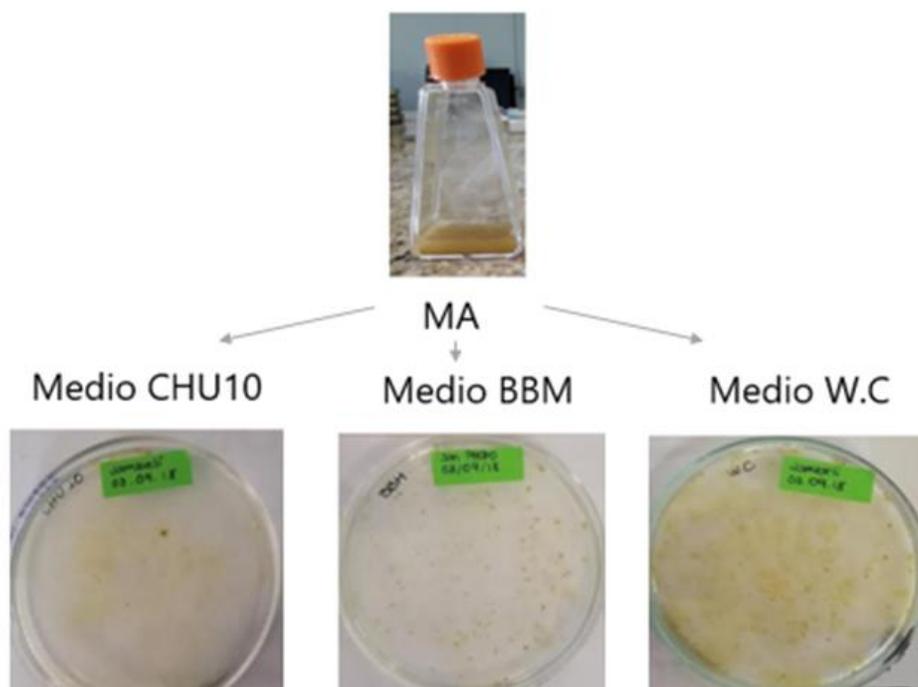


Figura 8. Siembra directa de la muestra ambiental (MA) en medios de cultivo sólido; CHU 10, BBM y WC.

Posteriormente, se procedió a aislar las colonias de color parduzco de los medios de cultivo sólido BBM y CHU10.

2. Diluciones del cultivo madre y siembra en placa con medio sólido

Las diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) realizadas en frascos de vidrio a partir de cada muestra ambiental, tardaron cuatro semanas en crecer al observar una coloración marrón en los medios de cultivo líquidos BBM y WC. Aunque al visualizar alícuotas de cada uno al microscopio, la presencia de abundantes especies de diatomeas era mayoritaria, Por otro lado, al sembrar cada dilución en los medios de cultivo sólido CHU10 y BBM tardaron en crecer 2 semanas, pero de igual manera que su crecimiento en medio líquido consistía en una mezcla de especies y se encontraban contaminadas por cianobacterias (Figura 9), interrumpiendo el objetivo de obtener un cultivo de una única especie.

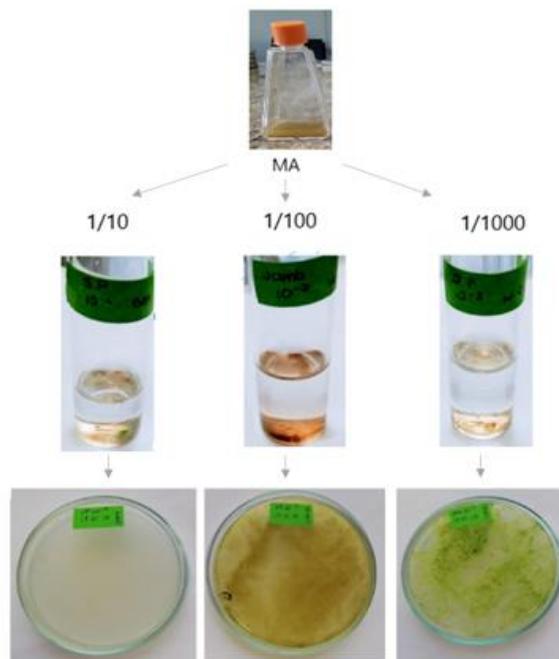


Figura 9. Diluciones del cultivo madre y siembra en placa con medio sólido a partir de la muestra ambiental (MA).

3. Captura de diatomeas del cultivo madre mediante microscopio invertido

La captura de diatomeas en base a cada muestra ambiental en tubo de vidrio de 5ml con medio W.C., alcanzó un crecimiento de colonias de diatomeas al cabo de 2 meses. Consecutivamente, se sembró 300 μ l en medios de cultivo sólido, pero tan solo la mitad creció en el lapso de 2 semanas (Figura 10), al visualizar colonias de manera aleatoria en el microscopio las especies presentes no coincidían con las especies capturadas, aunque se evitó la contaminación de clorófitas y cianobacterias.



Figura 10. Captura y siembra (medio chu10 y BBM) de diatomeas de la muestra ambiental (MA) bajo el microscopio invertido. Tiempo de crecimiento: 2 meses y 2 semanas.

Tomando en cuenta todos los resultados se estandarizó la siguiente metodología detallada para la obtención y análisis de cultivos puros, que consiste en llegar a obtener muestras puras, cuyo ADN puede ser extraído sin dificultad y de buena calidad a partir de una muestra ambiental.

1. Filtrar y observar en el microscopio invertido (40x) las muestras ambientales recogidas para confirmar la presencia de diatomeas.
2. Sembrar 50 μ l en medios de cultivo sólidos BBM y CHU10 por duplicado, y dejar crecer por 4 semanas.
3. Al visualizar crecimiento de colonias de color parduzco, estas se aíslan por estriado sembrando de nuevo en el medio sólido correspondiente al que crecieron, y se dejan crecer por 2 semanas.
4. Con un asa metálica estéril se toma una colonia del aislamiento realizado en el medio sólido, de preferencia del extremo del aislado y se observa al microscopio para evidenciar que se trata de un cultivo puro, si es el caso se añade 50 μ l de medio líquido en tubos eppendorf, y se deja crecer por 1 semana (continúa paso 6).
5. Si al observar al microscopio no se visualiza la presencia de una sola especie, se debe repetir el proceso de aislamiento por estriado.
6. Tomar una alícuota del cultivo líquido y observar al microscopio para evidenciar el crecimiento de una sola especie.
6. Una vez identificada, realizar fotos para su identificación morfológica.
7. Cambiar con frecuencia el medio líquido de cada tubo eppendorf y distribuirlo en 3 alícuotas. De esta manera, una parte es destinada a la extracción de ADN, otra para el tratamiento de frústula y la última de reserva para tomar las fotos necesarias para su identificación y así mantener continuo su crecimiento.

Nota: Todo el protocolo debe ser realizado en cabina de bioseguridad de flujo laminar, temperatura ambiente y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Además, se recomienda realizar una pesca selectiva en caso de que

exista contaminación de clorófitas al alcanzar una buena densidad de diatomeas en cultivo líquido.

En la figura 11 se representa de manera gráfica cada paso descrito para la obtención de cultivos puros de diatomeas a partir de muestras ambientales.

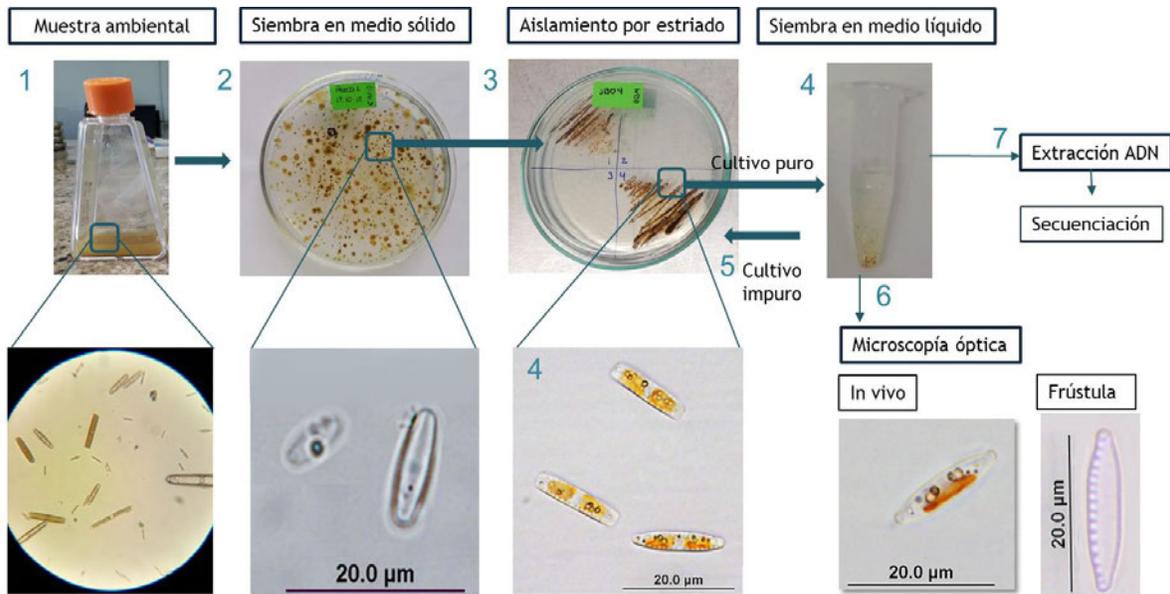


Figura 11. Esquema gráfico para la obtención de cultivos puros de diatomeas a partir de una muestra ambiental (Microscopio óptico: 1. 40x, 2.3.6. 100x).

Siguiendo la metodología anteriormente descrita, se obtuvieron 7 muestras puras de diatomeas epilíticas, que se nombraron como JB03, JB01, JB02-JB04, SP01, SP02-SP03.

4.3. Identificación taxonómica mediante microscopía óptica y SEM de las especies aisladas

La observación por microscopía óptica y electrónica de barrido nos permitió comprobar e identificar que se lograron aislar cinco especies de la región de la cuenca alta del río Guayllabamba (Tabla 5).

Tabla 5

Origen y código de las muestras puras aisladas.

Origen	Especies aisladas
Jambelí	Especie 1
	Especie 2
	Especie 3
San Pedro	Especie 4
	Especie 5

4.3.1. Identificación morfológica por microscopía óptica

Después de realizar un minucioso análisis morfológico en base a las micrografías tomadas en las muestras in vivo y reconocimiento de frústula, se logró identificar y mencionar el nombre correspondiente a cada especie aislada.

La **Especie 1** de acuerdo con la información en la base de datos *Diatoms of North America* se identificó como *Sellaphora saugerresii* (Desm.) Wetzel and Mann 2015 (University of Colorado, 2019).

A continuación, en la Figura 12 se reconocen las características descritas en plataformas virtuales y publicaciones referentes a la especie descritas en la Tabla 6 (Wetzel et al., 2015).

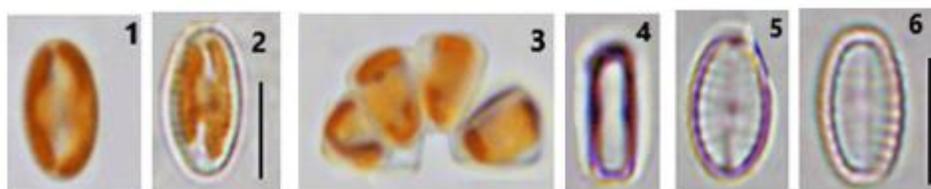


Figura 12. Especie 1. **In vivo** (Vista valvar externa (1,2) Agrupación de células en cadenas cortas (3)). **Frústula** (Vista pleural de la frústula (4) Vista valvar externa (5,6)). Barra: 5 μ m. Medidas de la 1-6 respectivamente (Largo 7.2, 7.9, 5.01,5.59, 5.85 ,6.23) μ m y (Ancho 3.74, 4.17, 3.21, 1.9, 3.05, 3.49) μ m.

Tabla 6

Características morfométricas identificables por microscopía óptica de la especie *Sellaphora saugerresii* (Desm.) Wetzel and Mann 2015.

Especie: *Sellaphora saugerresii* (Desm.) Wetzel and Mann 2015

Características morfométricas	Descripción
Rango de longitud	6.8 – 12.3 μ m
Rango de ancho	3.1 – 3.5 μ m
Valvas	Lineal-lanceoladas
Vértices	Redondeados
Estrías	Irradian ligeramente cerca del área central y paralelas cerca de los polos

La **Especie 2** de acuerdo con la información en la base de datos *Diatoms of North America* se identificó como *Sellaphora seminulum* (Grunow) D.G. Mann (1989) (University of Colorado, 2019).

A continuación, en la Figura 13 se reconocen las características descritas en plataformas virtuales y publicaciones referentes a la especie descritas en la Tabla 7 (Blanco et al., 2010).

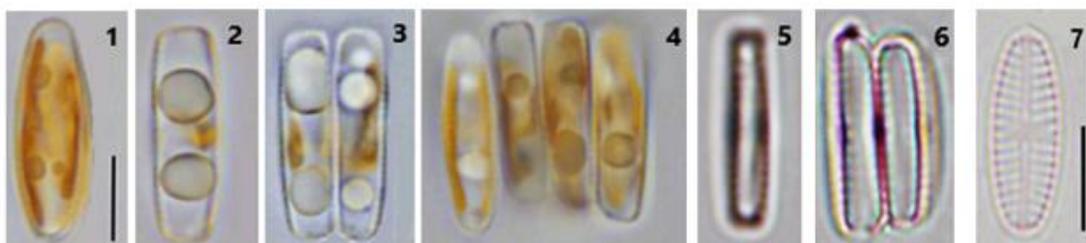


Figura 13. Especie 2. In vivo (Vista valvar (1,4), Vista pleural (2), de dos células (3)). Frústula (Vista pleural (5,6) Vista valvar (7)). Barra: 5µm. Medidas de la 1-7 respectivamente (Largo 12.58, 12.59, 12.34, 11.84, 9.33, 9.2, 10.16) µm y (Ancho 4.52, 4.14, 3, 3.3, 2.08, 2.48, 3.77) µm.

Tabla 7

Características morfométricas identificables por microscopía óptica de la especie *Sellaphora seminulum* (Grunow) D.G. Mann (1989).

Especie: *Sellaphora seminulum* (Grunow) D.G. Mann (1989)

Características morfométricas	Descripción
Rango de longitud	9.8 – 16.5 µm
Rango de ancho	3.4 – 4.4 µm
Valvas	Lanceoladas
Vértices	Redondeados
Estrías	Arqueadas

La **Especie 3** de acuerdo con la información la base de datos *Diatoms of North America* se identificó como *Achnantheidium minutissimum* (Kütz.) Zarzal. 1994 (University of Colorado, 2019).

A continuación, en la Figura 14 se reconocen las características descritas en plataformas virtuales y publicaciones referentes a la especie descritas en la Tabla 8 (Blanco et al., 2010).

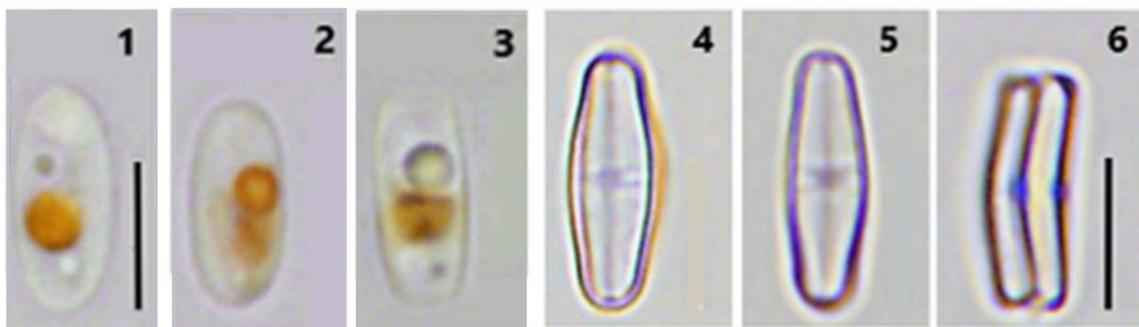


Figura 14. Especie 3. In vivo (Vista valvar (1,2), vista plural (3)). Frústula (Vista valvar (4,5). Vista pleural que muestra el esternón lanceolado elevado de la válvula (6)). Barra: 5 μ m. Medidas de la 1-6 respectivamente (Largo 7.72, 6.97, 7.25, 8.45, 8.32, 7.54) μ m y (Ancho 3.47, 3.22, 2.8, 2.72, 2.61, 1.36) μ m.

Tabla 8

Características morfométricas identificables por microscopía óptica de la especie *Achnantheidium minutissimum* (Kütz.) Zarzal. 1994.

Especie: *Achnantheidium minutissimum* (Kütz.) Zarzal. 1994

Características morfométricas	Descripción
Rango de longitud	5.6 – 20.8 μ m
Rango de ancho	1.5 – 3.3 μ m
Valvas	Lanceoladas, con una porción central ensanchada que da como resultado un margen de válvula ondulado Esternón lanceolado elevado (Figura 10.6)
Estrías	Irradian casi paralelas en ambas valvas

La **Especie 4** de acuerdo con la información la base de datos *AlgaeBase* se identificó como *Nitzschia paleaformis* Hustedt (Krammer & Ange-Bertalot, 1998) (Guiry & Guiry, 2019).

A continuación, en la Figura 15 se reconocen las características descritas en plataformas virtuales y publicaciones referentes a la especie descritas en la Tabla 9.

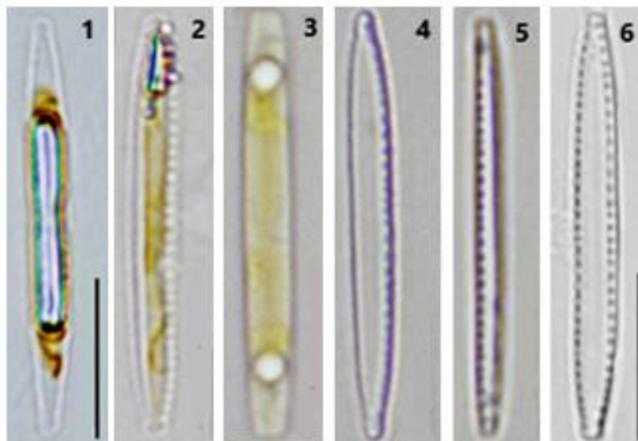


Figura 15. Especie 4. **In vivo** (Vista valvar (1,2) Vista pleural (3)). **Frústula** (Vista valvar (4,6) Vista pleural (5)). Barra: 10 μ m. Medidas de la 1-6 respectivamente (Largo 25.23, 25.29, 25.58, 25.77, 25.06, 25.86) μ m y (Ancho 2.92, 3.07, 3.35, 2.57, 1.79, 2.75) μ m.

Tabla 9

Características morfométricas identificables por microscopía óptica de la especie *Nitzschia paleaformis* Hustedt.

Especie: *Nitzschia paleaformis* Hustedt

Características morfométricas	Descripción
Rango de longitud	12 – 42 μ m
Rango de ancho	3 – 4 μ m
Valvas	Lanceoladas y estrechas en los polos
Vértices	Subcapitados
Estrías	Apenas visibles

La **Especie 5** de acuerdo con la información la base de datos *Diatom of North America* se identificó como *Nitzschia fonticola* (Grunow) Grunow in Van Heurck 1881 (University of Colorado, 2019).

A continuación, en la Figura 16 se reconocen las características descritas en plataformas virtuales y publicaciones referentes a la especie descritas en la Tabla 10 (Bey & Ector, 2013).

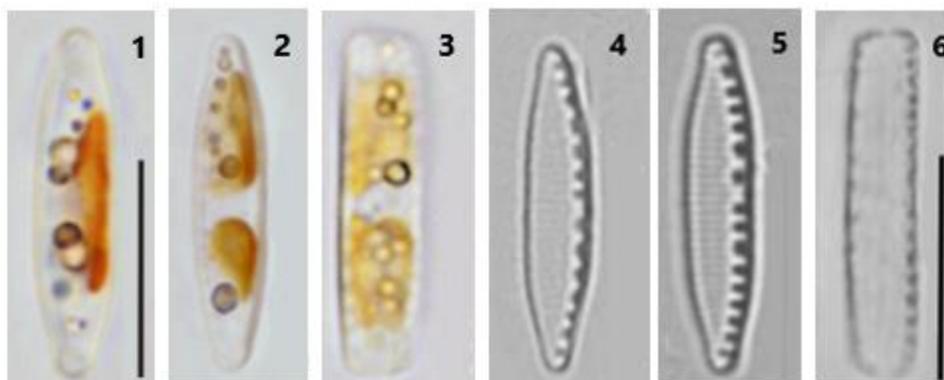


Figura 16. Especie 5. **In vivo** ((Vista valvar (1,2) Vista pleural (3)). **Frústula** (Vista valvar (4,6) Vista pleural (5)). Barra: 10µm. Medidas de la 1-6 respectivamente (Largo 15.99, 15.48, 15.74, 15.14, 15.55, 15.91) µm y (Ancho 3.54, 3.34, 3, 3.2, 3.37, 3.34) µm.

Tabla 10

Características morfométricas identificables por microscopía óptica de la especie *Nitzschia fonticola* (Grunow) Grunow in Van Heurck 1881.

Especie: *Nitzschia fonticola* (Grunow) Grunow in Van Heurck 1881

Características morfométricas	Descripción
Rango de longitud	10 – 55 µm
Rango de ancho	2.5 – 4.5 µm
Valvas	Lanceoladas

	Márgenes curvados que se estrechan hacia los extremos
Vértices	Redondeados
Estrías	Distintas y paralelas
Fíbulas	Distintas

4.3.2. Identificación morfológica por microscopía electrónica de barrido

Por microscopía electrónica de barrido (SEM) se tomaron micrografías y se comprobaron de manera más específica y detallada la morfología de las 5 especies para una mejor identificación.

Las características morfológicas de la **Especie 1** (Figura 17) coinciden con las descritas en publicaciones como (Wetzel et al., 2015), detalladas en la Tabla 11 referente a la especie *Sellaphora saugerresii* (Desm.) Wetzel and Mann 2015.

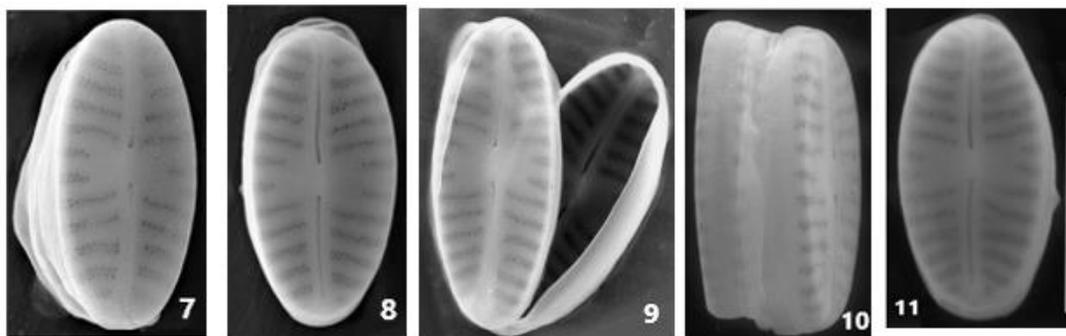


Figura 17. Especie 1. (Vista valvar (7,8,9,11) Vista pleural (10)). Barra: 5 μ m.

Tabla 11

Características morfológicas identificables por SEM de la especie *Sellaphora saugerresii* (Desm.) Wetzel and Mann 2015.

Característica morfológica	Descripción
Areolas	Pequeñas y redondas
Área central	Amplia, más o menos simétrica Presenta dos o tres estrías más cortas y desiguales
Rafe	Recto Extremos proximales ligeramente curvados, en forma de lágrima

Las características morfológicas de la **Especie 2** (Figura 18) coinciden con las descritas en publicaciones como (Wetzel et al., 2015), detalladas en la Tabla 12 referente a la especie *Sellaphora seminulum* (Grunow) D.G. Mann (1989).

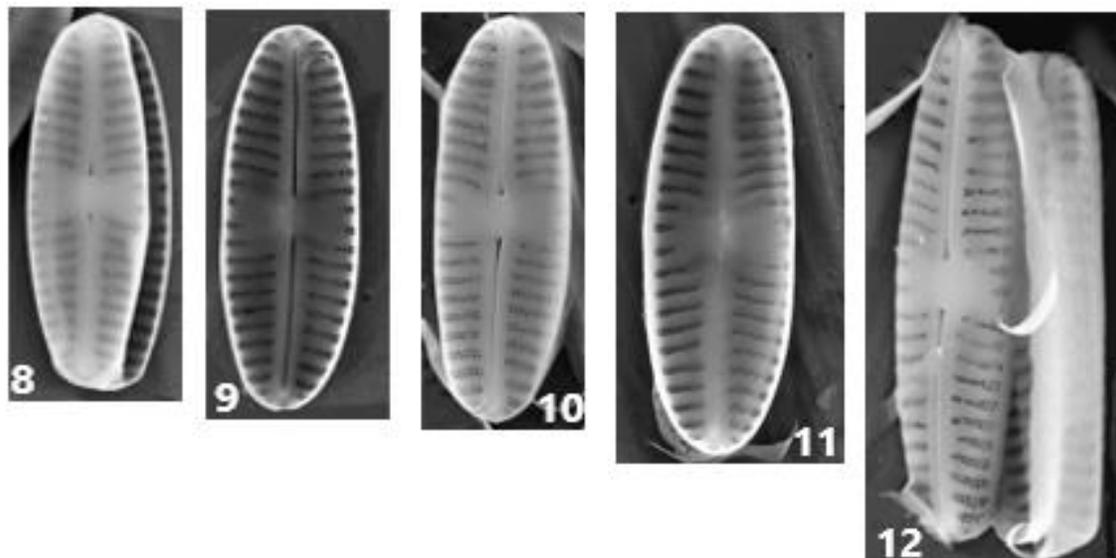


Figura 18. Especie 2. Vista valvar (8,9,10,11) Vista pleural (12)). Barra: 5 μ m.

Tabla 12

Características morfológicas identificables por SEM de la especie *Sellaphora seminulum* (Grunow) D.G. Mann (1989).

Característica morfológica	Descripción
Areolas	Pequeñas y redondas
Área central	Rodeada por tres estrías más cortas de forma variada
Rafe	Uniforme y recto Curva suavemente hacia el lado primario externo Terminaciones del rafe central ligeramente similares a una gota

Las características morfológicas de la **Especie 3** (Figura 19) coinciden con las descritas en publicaciones como (Hlúbiková et al., 2011), detalladas en la Tabla 13 referente a la especie *Achnanthidium minutissimum* (Kütz.) Zarzal. 1994.

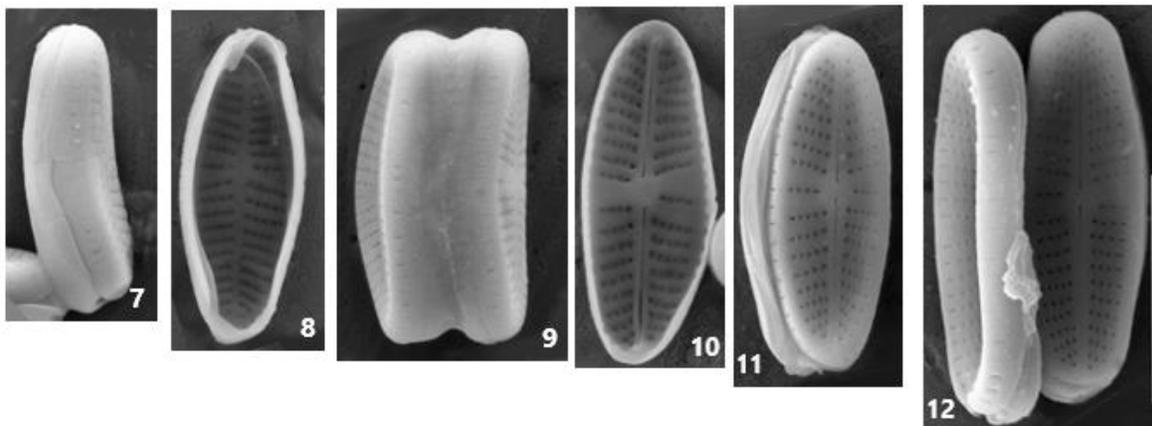


Figura 19. Especie 3. Vista valvar (8,10,11) Vista pleural (7) de dos células (9,12)).
Barra: 5 μ m.

Tabla 13

Características morfológicas identificables por SEM de la especie *Achnanthydium minutissimum* (Kütz.) Zarzal. 1994

Característica morfológica	Descripción
Areolas	Pequeñas y circulares, acortadas en un lado del área central ausente
Área central	Redondeada o Ausente Muestra los extremos del rafe proximal Areolas interrumpidas para formar una fascia simétrica o asimétrica
Rafe	Recto a lo largo de toda la longitud de la válvula Terminación proximal curvadas muy suavemente en las direcciones opuestas Terminaciones distales rectas y simples, por lo general alcanzan el nivel de las últimas estrías valvulares

Las características morfológicas de la **Especie 4** (Figura 20) coinciden con las descritas en publicaciones como, detalladas en la Tabla 14 referente a la especie *Nitzschia paleaformis* Hustedt.

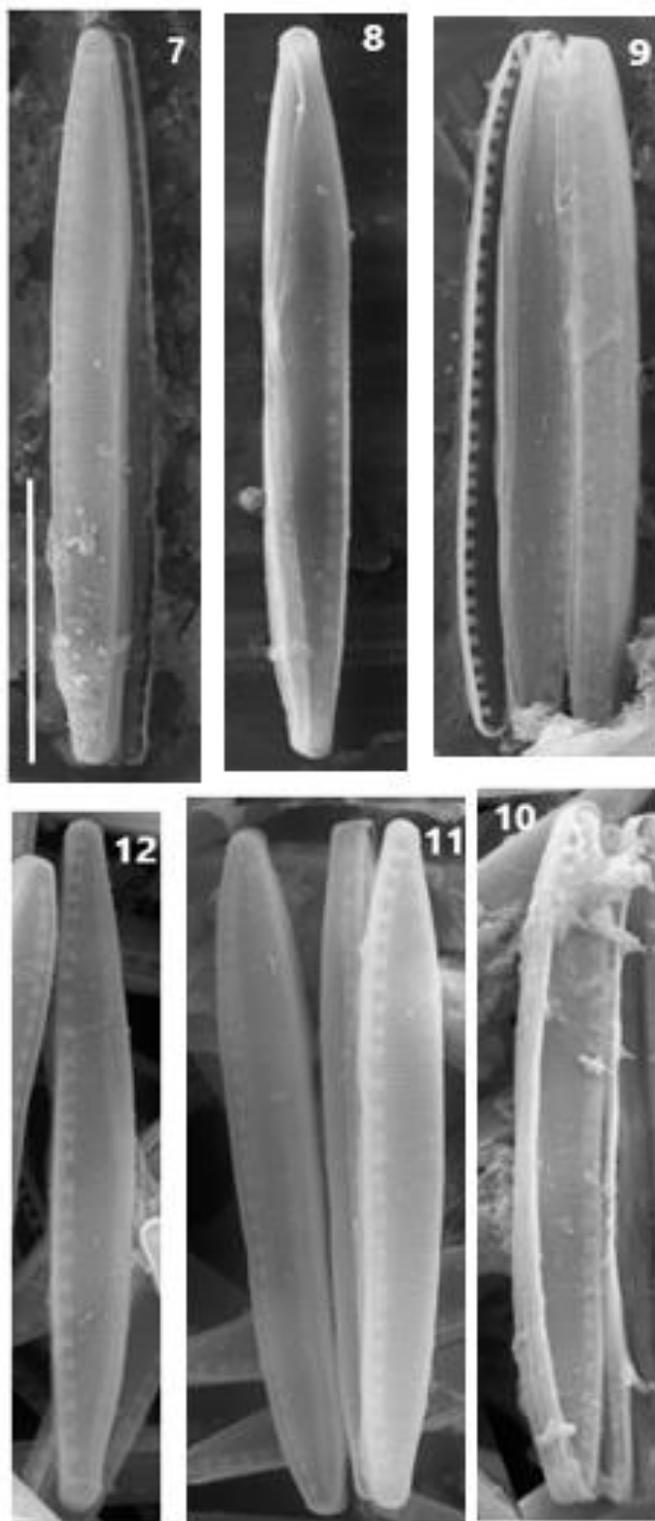


Figura 20. Especie 4. Vista valvar (7,8,10,12) de tres células (9,11). Barra: 10 μ m.

Tabla 14

Características morfológicas identificables por SEM de la especie *Nitzschia paleaformis* Hustedt.

Característica morfológica	Descripción
Areolas	Pequeñas y poco visibles
Rafe	Excéntrico con terminaciones rectas proximales
Fíbulas	Dispuestas a lo largo del margen de la válvula Formas variadas: pequeñas, cuadradas o rectangulares con una distancia casi igual Separación más amplia entre las dos fíbulas centrales

Las características morfológicas de la **Especie 5** (Figura 21) coinciden con las descritas en publicaciones como (Tudesque, Rimet, & Ector, 2008), detalladas en la Tabla 15 referente a la especie *Nitzschia fonticola* (Grunow) Grunow in Van Heurck 1881.

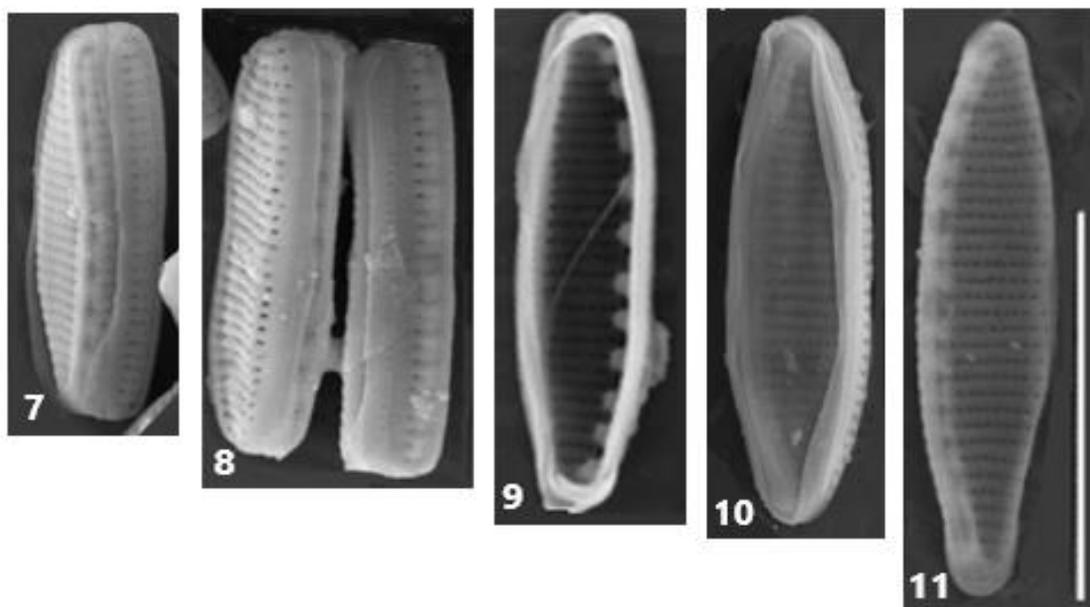


Figura 21. Especie 5. Vista valvar (9-11) Vista pleural (7) de dos células (8). Barra: 10 μ m.

Tabla 15

Características morfológicas identificables por SEM de la especie *Nitzschia fonticola* (Grunow) Grunow in Van Heurck 1881.

Característica morfológica	Descripción
Areolas	Pequeñas y redondeadas o menos alargadas
Rafe	Excéntrico con terminaciones rectas proximales
Fíbulas	Dispuestas a lo largo del margen de la válvula Formas variadas: pequeñas, cuadradas o rectangulares con una distancia casi igual Separación más amplia entre las dos fíbulas centrales

4.4. Identificación molecular de las especies aisladas

Para validar la relación entre la identificación tradicional morfológica y molecular de las especies de diatomeas es indispensable la selección de un código de barras de ADN, para ello se deben considerar varios aspectos al aplicar marcadores genéticos según como es su amplificación universal por PCR, cuyo rango de diversidad taxonómica y poder de diferenciación entre las especies sea mínimo, siendo oportuno el empleo de dos o más pares de cebadores universales diseñados a partir de regiones conservadas, en este trabajo se evaluaron dos marcadores de dos genes candidatos (*gen 18S ARNr* y *gen rbcL*), con el fin de caracterizar las secuencias de estos genes considerados como códigos de barras en las especies de diatomeas epilíticas del Ecuador.

El resultado de la electroforesis confirmó la amplificación exitosa de los dos genes de interés, para el gen 18S con región V4 del ARN ribosomal se obtuvo un fragmento de 300pb y con respecto al gen de la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (*rbcL*) del cloroplasto un fragmento de 600pb, confirmando la calidad del material extraído, como se muestra en las Figuras 22 y 23; lo cual facilitará su posterior secuenciación.

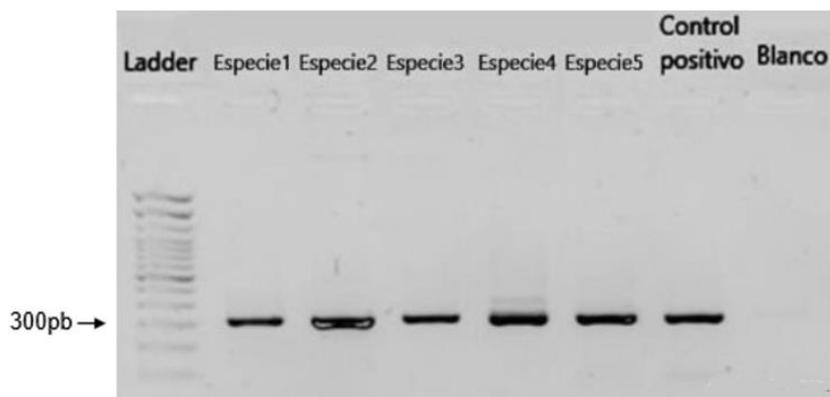


Figura 22. Gel de electroforesis de los productos de amplificación obtenidos para el gen nuclear 18S ARNr - Gen 18s.

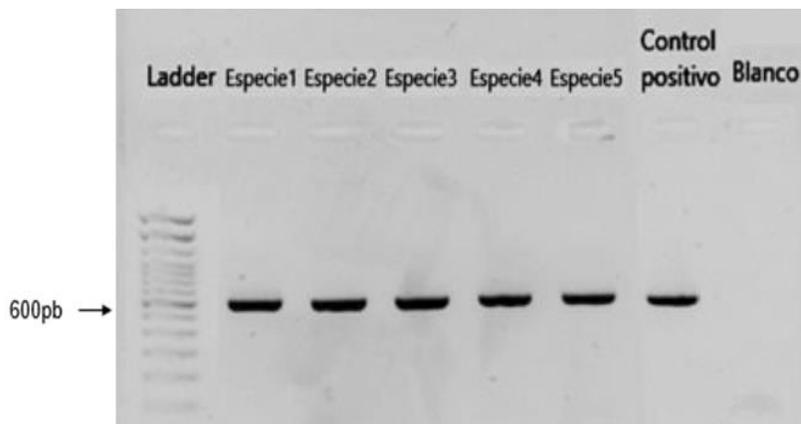


Figura 23. Gel de electroforesis de los productos de amplificación obtenidos para el gen del cloroplasto *rbcL*.

Posteriormente, el alineamiento por BLAST de las 5 especies obtenidas reflejó los resultados detallados en la Tabla 16, de acuerdo con el porcentaje de identidad a excepción del gen *rbcL* de la especie 4, debido a que la cantidad de ADN extraído fue mínima, cuya secuencia obtenida no pudo ser alineada por la falta de confiabilidad.

Tabla 16. Alineamiento de cada secuencia correspondiente a las especies aisladas y su especie emparejada de acuerdo con su porcentaje de identidad.

Nombre	Marcador molecular	Especie	Porcentaje de identidad
Especie 1	<i>18s</i>	<i>Fistulifera saprophila</i>	99.29 %
	<i>rbcL</i>	<i>Fistulifera saprophila</i>	99.49 %
Especie 2	<i>18s</i>	<i>Achanthidium minutissimum</i>	100%
	<i>rbcL</i>	<i>Achanthidium minutissimum</i>	99.66%
Especie 3	<i>18s</i>	<i>Sellaphora seminulum</i>	98.95 %
	<i>rbcL</i>	<i>Sellaphora seminulum</i>	100 %
Especie 4	<i>18s</i>	<i>Nitzschia draveillensis</i>	96.49%

	<i>rbcL</i>		
Especie 5	<i>18s</i>	<i>Nitzschia fonticola</i>	98.25 %
	<i>rbcL</i>	<i>Mayamaea terrestris</i>	93.74 %

La especie 1 identificada morfológicamente como *Sellaphora saugerresii*, obtuvo una homología del 99% como *Fistulifera Saprophila*. Este porcentaje de homología se considera suficiente (Taylor et al., 2013) como para considerar la secuencia perteneciente a esta especie. Sin embargo, no existen secuencias en el NCBI para la especie *S. saugerresii* (NCBI Resource Coordinators, 2002), por lo que no podemos comparar si ambas especies comparten homología en la secuencia *V4 18S* y *rbcL*. No obstante, es poco probable que ambas secuencias, seleccionadas por su grado de divergencia interespecífica, coincidan casi al 100% con otra especie. Por ello, si la identificación morfológica se ha llevado a cabo correctamente, lo más probable es que existió algún tipo de contaminación del cultivo con *F. saprophila*, lo que conllevaría a una amplificación errónea del ADN de esta última.

Por otro lado, se consideraron las características morfométricas de la especie aislada con respecto a la especie *F. saprophila* (Taylor et al., 2013) y tiene concordancia con la mayoría, aunque no en su totalidad a pesar de que su porcentaje de homología para el gen *18S* es de 99.29% y para el gen *rbcL* 99.49%, siendo necesario llevar a cabo una amplificación con más secuencias específicas, permitiendo probar y demostrar la monofilia del género (Taylor et al., 2013) y poder obtener una secuencia específica para la especie aislada.

En el caso de la Especie 4 morfológicamente se identificó como *Nitzschia paleaformis* pero de manera molecular como *Nitzschia draveillensis*, además no se logró conseguir la secuencia para el gen *18S* debido a la dificultad de obtener cultivo puro. Para ello se comparó las características morfométricas de la especie *N. draveillensis* (Bey & Ector, 2013) con la especie aislada pero no presentaban concordancia evadiendo su identificación molecular, ya que presenta un porcentaje

de homología del 96.49%. Por lo cual es necesario la obtención de mayor cantidad de ADN para poder complementar con la secuencia del gen *rbcL* y contrarrestar su porcentaje de homología con las secuencias habilitadas en el NCBI (NCBI Resource Coordinators, 2002).

Considerando que un código de barras de ADN es amplificado de manera confiable, es universal para todos los taxones de acuerdo con nivel taxonómico electo y es suficientemente variable para separar las especies, se puede establecer que la región V4 del gen 18S asegura ser amplificada y secuenciada con éxito para todas las cepas cultivadas, debido a su universalidad, cuyo locus V4 es corto y de fácil acceso permitiendo discriminar entre especies provenientes de muestras ambientales. Por consiguiente, este marcador genético cumple con los dos primeros criterios de un código de barras adecuado, identificando fácilmente muestras de cepas pequeñas o al diferenciar entre taxones estrechamente relacionados (Luddington et al., 2012).

Estudios recientes cuyo enfoque se orienta en analizar la relación entre datos morfológicos como moleculares, ha aumentado la tasa de detección de especies aunque muestra dificultad al tratarse de diatomeas, debido a que presentan una diversidad críptica significativa en casi todos los estudios publicados, siendo necesario la estandarización de nuevos marcadores genéticos con la finalidad de descubrir nuevas especies, ya que los marcadores empleados como *rbcL* o el gen de 18S ARNr, no reflejan completamente la diversidad de las especies a nivel global (MacGillivray & Kaczmarska, 2011).

Eventualmente, se han propuesto varios códigos de barras para varios grupos de organismos, entre ellos las regiones plastídicas *rbcL*, las regiones ribosomales 18S (SSU), 28S (LSU) y 23S del gen ARNr, el gen mitocondrial *cox1* y los marcadores nucleares ITS. No obstante, el gen mitocondrial *cox1* a pesar de presentar mucha variabilidad no presenta cebadores universales, de igual manera el marcador ITS

no es universalmente amplificable con los protocolos de laboratorio estándar. No obstante, la combinación del gen ARNr 5.8S y ITS2 frecuentemente ha sido sugerido como un locus de código de barras alternativo, cuyo potencial para identificar especies es prometedora y se ha demostrado en muchos protistas, hongos y plantas (Zimmermann, et al., 2011).

Uno de los problemas que influye en la especificidad del gen *rbcL* radica en que las diatomeas presentan una variación heteroplásmica al ser aisladas de manera reproductiva, debido al cruce de padres genéticamente diferentes y la producción consecutiva de una progenie con genotipos híbridos, dado que los cloroplastos pueden heredarse por vía materna, paterna o biparental, lo que conlleva a que no se produzca una progenie viable, por lo tanto delimita el acoplamiento y datos de la secuencia al ser amplificada (Guo et al., 2015).

Sin embargo, se podría optar por una alternativa comprobada en plantas con flores denominada “*dual- locus DNA barcoding*”, la cual consiste en combinar información de diferentes partes del genoma del organismo orientada a segregar la gran mayoría de especies de diatomeas, incluyendo a especies recientemente divergidas o estrechamente relacionadas, semicrípticas o crípticas (MacGillivray & Kaczmarska, 2011). De esta manera, se optaría por combinar marcadores con un alto poder discriminatorio como la región 5.8S + ITS2 junto con la alta tasa de éxito de amplificación y secuenciación de *rbcL*, de esta manera reflejaría la tasa de divergencia de los genomas nucleares y el genoma del cloroplasto ya que en promedio evolucionan a diferentes velocidades, logrando generar un código de barras de doble locus efectivo en diatomeas. Además de presentar ciertas ventajas como la facilidad de amplificación, secuenciación y alineación, con carencia de indels e intrones y menor probabilidad de amplificar contaminantes heterotróficos (MacGillivray & Kaczmarska, 2011).

Una vez, culminado el proceso de alineamiento y validación de las especies aisladas, han sido incluidas como parte de la Colección de Ficología del Ecuador (CFE) de la UDLA, ya que efectivamente cada especie corresponde al sitio de muestreo de donde se han colectado, asignadas la siguiente nominación: para los aislados de provincias del Ecuador se los cita como CFE-UDLA-06 (número asignado para la provincia de Pichincha) y D (por su inicial se refiere al grupo de diatomeas) – 001 (número correspondiente para cada especie aislada), de esta manera la nominación validada se refleja en la Tabla 17.

Tabla 17. Descripción de los cultivos de diatomeas (axénicos) obtenidos en diferentes sitios

Origen	Especies aisladas	Nominación UDLA
Jambelí	Especie 1	CFE-UDLA-07D-001
	Especie 2	CFE-UDLA-07D-002
	Especie 3	CFE-UDLA-07D-003
San Pedro	Especie 4	CFE-UDLA-07D-004
	Especie 5	CFE-UDLA-07D-005

En consecuencia, el código de barras del ADN merece una cuidadosa consideración como un medio para mejorar la confiabilidad de las identificaciones y el descubrimiento de especies, y también aumentar la calidad y cantidad de información taxonómica, incluida la morfología, por esta razón se pretende estandarizar la metodología descrita para iniciar con la creación de una base de datos que incluya micrografías asociadas a secuencias y puntos de colecta para la eventual identificación de diatomeas epilíticas en el Ecuador.

4.5. Alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas

Las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias similares disponibles en la base de datos NCBI (NCBI Resource Coordinators, 2002) para cada especie y cada gen correspondiente mediante el software MEGA 7, con el fin de establecer la variación que pueden tener las especies del Ecuador en relación con otras regiones del mundo.

En general, el gen 18S posee una fuerte representación en GenBank, lo cual representa una base de secuencia de referencia con la que se pueden comparar secuencias desconocidas facilitando su comparación e identificación. En este caso el alineamiento de las especies 1-5 logró ser comparada con la misma especie identificada difiriendo en los clones de distintas regiones, presentando poca variabilidad en el extremo 5' para la mayoría en relación con la secuencia consenso, aunque en la especie 5 la posición de 53 bp no presenta un codón repetitivo en comparación con las secuencias (Figura 24).

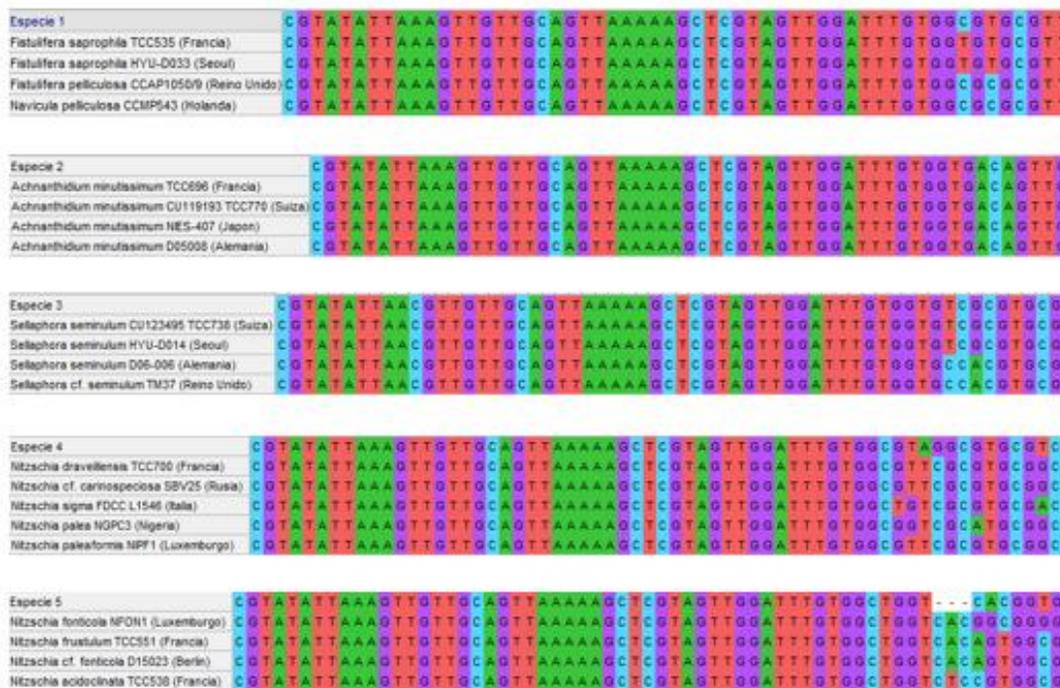


Figura 24. Alineamiento de las especies de diatomeas epilíticas obtenidas con respecto al gen 18S región V4 mediante el programa MEGA7.

El gen *rbcL* discrepa en algunos de los resultados ya que en la actualidad no existe la disponibilidad de datos de secuencia de referencia cuyas cepas sean probadas, siendo oportuno la realización de pruebas adicionales en diatomeas. En este caso el alineamiento de las especies 1-3,5 logró ser comparada con la especie identificada, aunque difiere en la existencia de similares especies en distintas regiones, presentando mayor variabilidad en el extremo 5' para la mayoría en relación con la secuencia consenso, de manera más significativa en la especie 5 donde varias bases nitrogenadas no coinciden de manera aleatoria (Figura 24).

Especie 1	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C T T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C T G C G A C
Fistulifera saprophila TCC535 (Francia)	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C T T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C T G C G A C
Fistulifera pelliculosa IK_MTA116 (Francia)	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C T T A T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C T G C G A C
Amphora aff. atomoides D54_002 (Alemania)	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C A T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C G G C G A C
Amphora copulata 9557-AMPH021 (USA)	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C A T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C G A C
Especie 2	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C A T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C T A C
Achnanthisdium sp. MIC10_53 (Belgica)	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C A T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C T A C
Achnanthisdium minutissimum TCC667 (Francia)	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C A T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C T A C
Achnanthisdium minutissimum strain B443 (Rusia)	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C A T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C T A C
Achnanthisdium cf. lineare NA-2016 (Rusia)	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C A T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C T A C
Especie 3	A G A A G A T A T G C G T A T T C C G C A C T C T T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C T A C
Sellaphora seminulum D06_006 (Alemania)	A G A A G A T A T G C G T A T T C C G C A C T C T T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C T A C
Sellaphora cf. laevisima KEL-2015 (Canada)	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C T T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C T A C
Sellaphora cf. seminulum TM37 (Reino Unido)	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C T T A T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C T A C
Sellaphora seminulum TCC461 (Francia)	A G A A G A C A T G C G T A T T C C G C A C T C T T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C T A C
Eolimna minima D03_030 (Canada)	A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C T T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C G A C
Especie 5	T T T A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C T T A C T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C T G C A A C A
Mayamaea terrestris D27_006 (Alemania)	T T T A G A A G A T A T G C G T A T T C C G C A T T C T T A T T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C T G C T A C A
Nitzschia fonticola TCC533 (Francia)	T T T A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A C T C A T A T T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C T G C A A C T
Nitzschia_fonticola_B-RT25 (España)	T T T A G A A G A T A T G C G T A T T C C T C A T T C A T A T T T A A A A A C A T T C C A A G G T C C A G C A A C A

Figura 24. Alineamiento de las especies de diatomeas epilíticas obtenidas con respecto al gen *rbcL* mediante el programa MEGA7.

En vista de que, la especie 5 presente extremos 5' variables tanto para el gen 18S como para el gen *rbcL* en relación con las demás especies, se resuelve que la secuencia consenso obtenida presenta errores de manipulación, que directamente estaría involucrado con la contaminación del cultivo puro de la especie al momento de aislarlo, siendo pertinente realizar un nuevo aislamiento donde se asegure con

certeza la obtención de material genético válido para la evaluación de los dos genes candidatos mencionados.

4.6. Matriz de distancias Variabilidad intra o interespecífica

Para realizar el árbol filogenético, se analizaron las diferentes secuencias de cada especie aislada de manera conjunta para el género *Sellaphora* y *Nitzschia* y de forma separada para cada uno de los marcadores moleculares (*18S* y *rbcL*).

El árbol filogenético para las especies 1-5 en base a las secuencias disponibles en la base de datos NCBI con respecto al gen *18S* mediante el software MEGA 7, se presenta en la Figura 25.

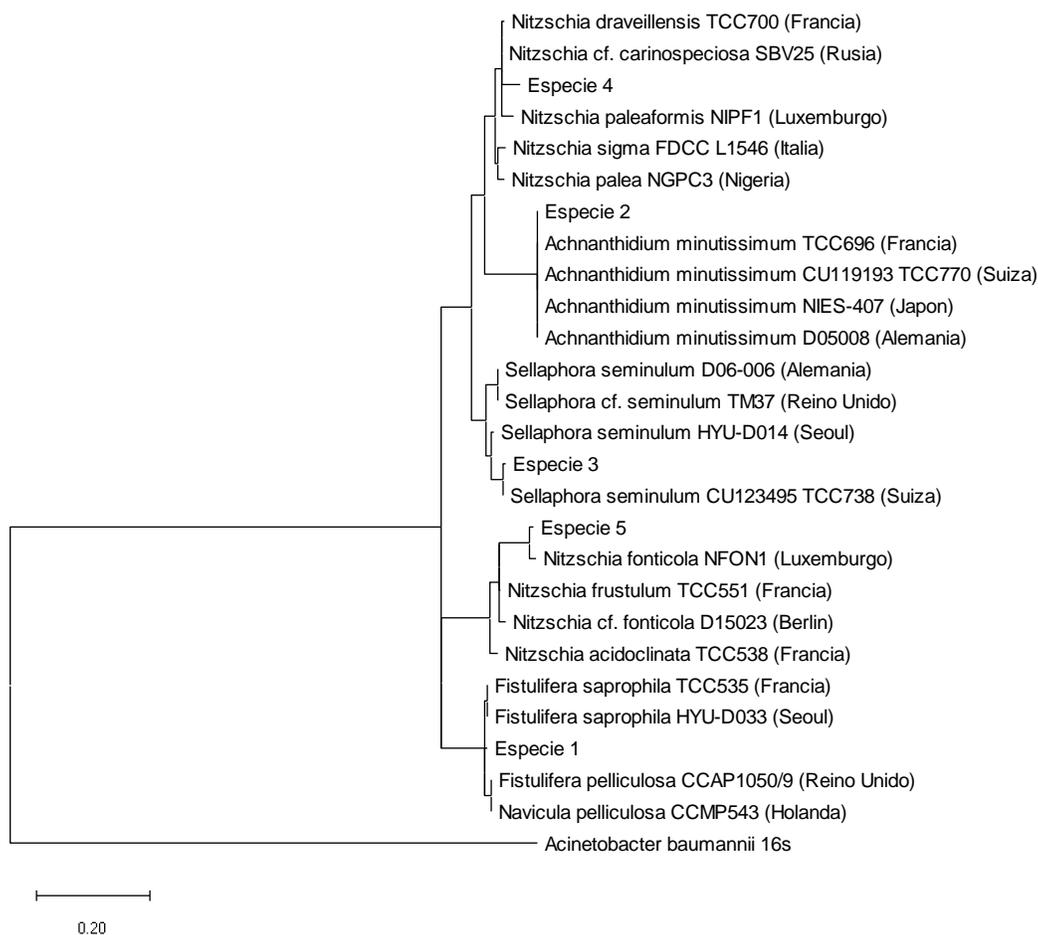


Figura 25. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las secuencias aisladas y secuencias de la base de datos NCBI con respecto al gen 18S. Blanco: *Acinetobacter baumannii* 16s.

Tabla 18

Porcentaje de similitud entre las secuencias del NCBI con cada aislada en base al gen 18S.

Especies aisladas	Porcentaje de similitud
Especie 1	
Fistulifera_saprophila_TCC535_(Francia)	99,29%

Fistulifera_saprophila_HYU-D033_(Seúl)	99,29%
Fistulifera_pelliculosa_CCAP1050/9_(Reino Unido)	98,57%
Navicula_pelliculosa_CCMP543_(Holanda)	98,57%
Especie 2	
Achnantheidium_minutissimum_TCC696_(Francia)	100%
Achnantheidium_minutissimum_CU119193_(Suiza)	100%
Achnantheidium_minutissimum_NIES-407_(Japón)	100%
Achnantheidium_minutissimum_D05008_(Alemania)	100%
Especie 3	
Sellaphora_seminulum_CU123495_TCC738_(Suiza)	99,65%
Sellaphora_seminulum_HYU-D014_(Seúl)	97,49%
Sellaphora_seminulum_D06-006_(Alemania)	94,89%
Sellaphora_cf._seminulum_TM37_(Reino Unido)	94,89%
Especie 4	
Nitzschia_cf._carinospeciosa_SBV25_(Rusia)	96,72%
Nitzschia_draveillensis_TCC700_(Francia)	96,36%
Nitzschia_paleaformis_NIPF1_(Luxemburgo)	95,23%
Nitzschia_sigma_FDCC_L1546_(Italia)	95,22%
Nitzschia_palea_NGPC3_(Nigeria)	95,22%
Especie 5	
Nitzschia_fonticola_NFON1_(Luxemburgo)	98,22%
Nitzschia_frustulum_TCC551_(Francia)	93,77%
Nitzschia_cf._fonticola_D15023_(Berlín)	93,79%
Nitzschia_acidoclinata_TCC538_(Francia)	91,43%

La especie 1 presenta un porcentaje mayor de similitud del 99,29% con respecto a la especie *Fistulifera saprophila* aisladas en Francia y Seúl, lo cual contrarresta con su identificación morfológica. Aunque, presenta un 98,57% de similitud entre *Navicula pelliculosa* considerado en la actualidad como un sinónimo de *Fistulifera pelliculosa* (*Kützing*) *Lange-Bertalot*, el cual representa un tipo de la especie

Fistulifera saprohila (Guiry & Guiry, 2019). Por lo tanto, los porcentajes de similitud no varían de manera significativa ya que representan de manera contigua a una sola especie.

La especie 2 presenta una relación directa con los clones aislados de diferentes regiones con un porcentaje de similitud del 100%, valorando que la secuencia aislada obtenida en este estudio pertenece directamente a la especie *Achnantheidium minutissimum* (Pinseel et al., 2017).

La especie 3 presenta una relación directa con el clon aislado de *Sellaphora seminulum* de Suiza con un porcentaje de similitud del 99,65%, sin embargo, al compararlos con la misma especie pero en diferentes regiones como Seoul, Alemania y Reino Unido existe mucha variabilidad intraespecífica, por lo tanto sería oportuno examinar el hábitat de las especies de diatomeas y otras microalgas para determinar valores y límites con respecto a los datos ecológicos, biogeográficos y la medida en que la morfología de las especies evoluciona (Evans et al., 2008).

La especie 4 presenta un porcentaje de similitud del 96,72% con *Nitzschia cf. Carinospeciosa Lange-Bertalot & Kulikovskiy SBV25*, cuyas características concuerdan con la especie aislada en este estudio, identificando como las valvas lineales lanceoladas se estrechan en pequeños extremos subcapitados, con un rango de longitud 24–27 μm y anchura 2–2.5 μm , y en cuanto a sus estrías no son perceptibles con un microscopio óptico, estas dos cepas se agrupan con *Nitzschia draveillensis* con un porcentaje de similitud de 96,36%, cuya diferencia radica en la morfología de la válvula de esta especie, la cual presenta es fusiforme con extremos prolongados y diferentes números de estrías y areolas (Petrushkina et al., 2017).

La especie 5 presenta un mayor porcentaje de similitud del 98,22% con el clon de *Nitzschia fonticola* perteneciente a Luxemburgo y un menor porcentaje de similitud del 93,79% con la cepa *Nitzschia cf. Fonticola* de Berlín, además, presenta un 91,43% de similitud con la cepa *Nitzschia acidoclinata* de Francia, estas cepas

mostraron una importante variabilidad morfológica ya que han sido aisladas de diferentes entornos (lagos, ríos, arroyos) y regiones, a pesar de esta variación en la estudios donde se ha registrado esta variación las secuencias genéticas de ARNr 18S muestran muy pocas diferencias (Rimet et al., 2011), lo cual en este caso no se ve reflejado en los porcentajes de similitud alcanzados, siendo considerable tomar en cuenta la capacidad evolutiva a nivel de secuencia de nuestra especie aislada.

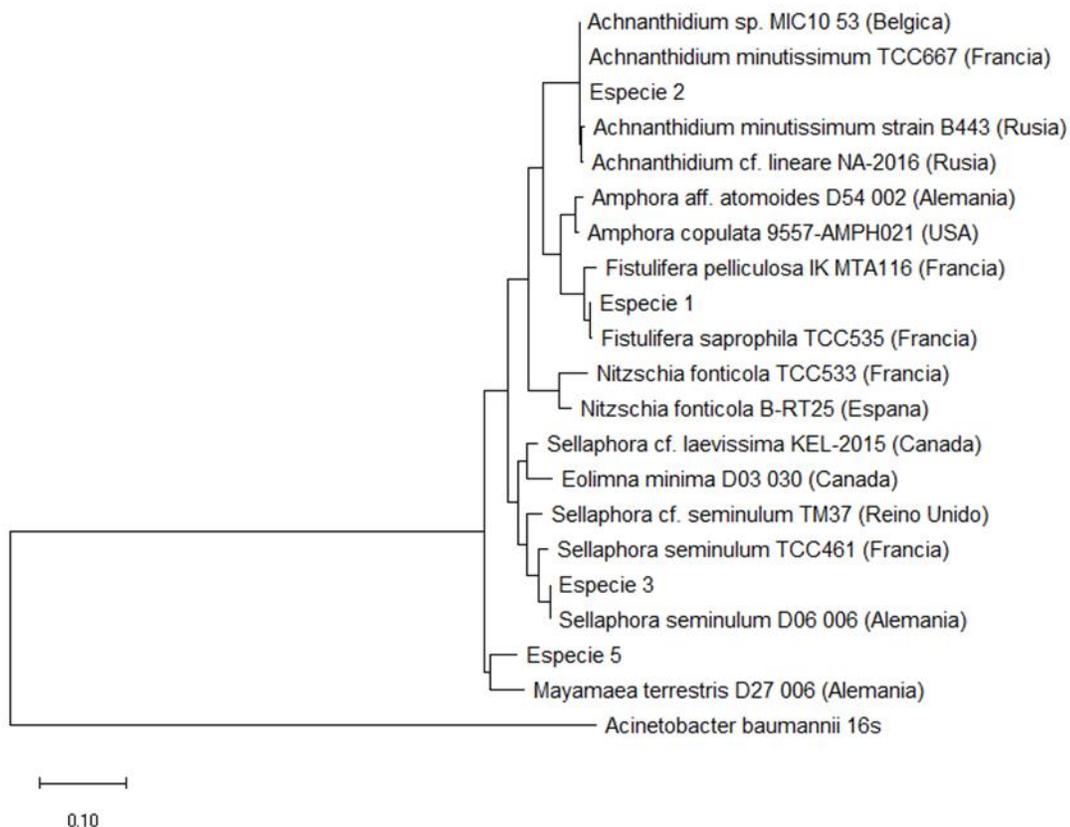


Figura 25. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las secuencias aisladas y secuencias de la base de datos NCBI con respecto al gen *rbcL*. Blanco: *Acinetobacter baumannii* 16s.

Tabla 19

Porcentaje de similitud entre las secuencias del NCBI con cada aislada en base al gen *rcbL*.

Especies aisladas	Porcentaje de similitud
Especie 1	
Fistulifera_saprophila_TCC535_(Francia)	99,49%
Fistulifera_pelliculosa_IK_MTA116_(Francia)	97,75%
Amphora_aff. atomoides_D54_002_(Alemania)	94,34%
Especie 2	
Achnanthidium_sp._MIC10_53_(Belgica)	99,83%
Achnanthidium_minutissimum_TCC667_(Francia)	99,66%
Achnanthidium_cf._lineare_NA-2016_(Rusia)	99,32%
Achnanthidium_minutissimum_B443 (Rusia)	99,15%
Especie 3	
Sellaphora_seminulum_D06_006_(Alemania)	100%
Sellaphora_seminulum_TCC461_(Francia)	97,43%
Sellaphora_cf._seminulum_TM37_(Reino Unido)	95,48%
Eolimna_minima_D03_030_(Canadá)	94,92%
Sellaphora_cf._laevissima_KEL-2015_(Canadá)	94,57%
Especie 5	
Mayamaea_terrestris_D27_006_(Alemania)	92,94%
Nitzschia_fonticola_B-RT25_(España)	88,00%
Amphora_copulata_9557-AMPH021_(USA)	88,41%
Nitzschia_fonticola_TCC533_(Francia)	86,57%

La especie 1 presenta un mayor porcentaje de similitud del 99.49% con *Fisfulifera saprophila*, lo cual concuerda con la identificación morfológica, evadiendo su porcentaje de similitud del 94,34% con *Amphora aff. Atomoides* (Zimmermann,

Abarca, et al., 2014) ya que las características morfológicas no coinciden en su mayoría con la especie aislada en este estudio.

La especie 2 mantiene un porcentaje de similitud mayor al 99% con la especie *Achnantheidium minutissimum* en distintas regiones como Bélgica, Francia y Rusia, lo cual comprueba la universalidad del gen *rbcL* para esta especie en específico. Aunque presenta un porcentaje de similitud del 99,32% con *Achnantheidium cf. Lineare* descrita originalmente por Smith en 1855, considerado como un sinónimo de *A. minutissimum* (Van de Vijver et al., 2011).

La especie 3 presenta un porcentaje de similitud del 100% con *Sellaphora seminulum*, lo cual concuerda con la identificación morfológica, a pesar de tener una disminución de hasta el 95% de similitud con la misma especie, pero en distintas regiones. Además, presenta un 94,92% de similitud con *Eolinma minima* perteneciente a un complejo junto con *Sellaphora seminulum*, el cual permanece en constante evaluación debido a la dificultad de identificar la densidad de las estrías inferiores de la especie, por lo tanto su relación se descartaría por falta de detalles en su morfología (Wetzel et al., 2015).

La especie 5 presenta un porcentaje de similitud 92,94% con *Mayamaea terrestres*, aunque morfológicamente no se relacionan, al validar su secuencia se encontró que esta especie provoca alta variación en el taxón al cual pertenece (Zimmermann, Abarca, et al., 2014), por lo tanto, se descartaría su relación. De esta manera se tomaría en cuenta los porcentajes de similitud del 88% y 86,57% con *Nitzschia fonticola*, ya que morfológicamente son idénticas (Tudesque et al., 2008).

Se deben tomar varias consideraciones al descartar varias lecturas, debido a razones técnicas más que a sesgos de biología molecular como extracción de ADN o amplificación por PCR. De manera que el porcentaje de coincidencia recomendado oscila entre los 96%, ya que la mayoría de los desajustes en las

secuencias se deben a una discrepancia muy pequeña (de uno a cuatro indeles) ya sea al principio o final de las secuencias. Por lo tanto, las lecturas consideradas en este alineamiento han sido limitadas en este valor (Kermarrec et al., 2014).

Además, algunos problemas estadísticos pueden explicar las diferencias taxones, ya que la variabilidad entre secuencias asciende o permanece en varios casos lo que dificulta la detección de una señal filogenética dependiendo tanto de la filogenia como la entrada de datos, e incluso el tamaño de la muestra ambiental de donde proviene el ADN extraído, generando incertidumbre y variación del índice de señal filogenética al utilizar las secuencias habilitadas en la base de datos de referencia empleada (Kermarrec et al., 2013).

Por otro lado, la mejor estimación entre la morfología y secuencia de las diatomeas tanto a nivel de especie y género se obtuvo utilizando un umbral de identidad de secuencia del 99% (Esteves et al., 2017) para ambos marcadores (*18SV4* y *rbcL*) garantizando su especificidad.

En particular, es interesante como varias secuencias relacionadas con el *gen ARNr 18S* y *rbcL* paralelamente han mostrado relaciones cercanas con las especies nominadas en la identificación morfológica de manera in vivo y de frústula. Sin embargo algunas pertenecen al continente europeo o asiático mas no en relación al continente americano (Santhosh Kumar et al., 2015), por lo tanto los genes candidatos empleados en este estudio muestran menos variaciones filogeográficas permitiendo su utilidad como código de barras de ADN para diatomeas epilíticas del Ecuador.

El análisis filogenético muestra la variedad de cepas en distintas regiones del mundo, lo cual permite entender la distribución y evolución de las especies presentes en Ecuador, considerando ciertas variaciones morfológicas como las más repetitivas como son el contorno de la válvula, su área central y números de areola,

llegando a establecer variaciones fenotípicas intraespecífica distintas en cada especie en relación con sus distancias genéticas y geográficas.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Las especies aisladas pertenecientes al género *Sellaphora* tienen preferencia por el medio CHU10 frente al BBM para su crecimiento, por lo contrario, las especies aisladas pertenecientes al género *Nitzchia* se desarrollaron preferencia por el medio BBM.

El medio WC a pesar de ser suplementado con silicato de sodio y solución de vitaminas no es óptimo para el cultivo de diatomeas epilíticas.

La identificación morfológica de las especies de tamaño menor a cinco micrómetros no es eficaz al microscopio óptico, ya que la observación de varias características se ven limitadas, por ello es oportuno el empleo de un microscopio electrónico de barrido con el fin de obtener micrografías donde todas las características morfológicas sean visibles.

Los dos genes (*18SV4* y *rbcL*) han sido amplificados de manera satisfactoria logrando especificarse como códigos de barras de ADN de diatomeas epilíticas del Ecuador.

La identificación molecular de diatomeas además de complementar su identificación taxonómica, permite realizar análisis filogenéticos con el fin de estudiar y entender su variabilidad genética considerando la región a la cual pertenece, siendo pertinente implementar el cultivo de cepas provenientes de muestras ambientales

en laboratorio generando una reserva de diatomeas para posteriores estudios, ya sea para probar nuevos marcadores moleculares y ampliar su código de barras genético o realizar nuevas técnicas de PCR garantizando la obtención de secuencias específicas en el Ecuador.

La variabilidad genética de las secuencias obtenidas se relacionó con distintas secuencias habilitadas en la base de datos NCBI de diversas regiones, considerando un porcentaje de similitud mayor al 96% alcanzando porcentajes de hasta el 100 %, lo cual refleja que no existieron diferencias significativas en su diversidad genética; a excepción de la Especie 5, la cual se debe tomar en consideración en estudios posteriores.

5.2. Recomendaciones

Replicar los cultivos puros constantemente para no perder biomasa y de esta manera obtener ADN de manera constante, este ADN servirá para realizar diferentes secuenciaciones y poder evaluar la especificidad de los marcadores moleculares empleados.

Recurrir a expertos en taxonomía de diatomeas para lograr contrarrestar su identificación morfológica y molecular.

Tomar en cuenta el sitio de muestreo con el fin de registrar la distribución y diversidad global de cada especie de acuerdo con su naturaleza en la que se desarrolla.

REFERENCIAS

- Abarca, N., Jahn, R., Zimmermann, J., & Enke, N. (2014). Does the cosmopolitan diatom *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing have a biogeography? *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086885>
- An, S. M., Choi, D. H., Lee, J. H., Lee, H., & Noh, J. H. (2017). Identification of benthic diatoms isolated from the eastern tidal flats of the Yellow Sea: Comparison between morphological and molecular approaches. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179422>
- Andersen, R. A., & Harrison, P. J. (2004). Algal Culturing Techniques. *Academic Press Books*, (January 2005), 437–475.
- Apothéloz-Perret-Gentil, L., Cordonier, A., Straub, F., Iseli, J., Esling, P., & Pawlowski, J. (2017). Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*, 12(10), 3218–3221. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Bey, M.-Y., & Ector, L. (2013). *Atlas des diatomées de la région Rhône-Alpes* (DREAL Rhôn). Direction Regionale de L'environnement, de L'aménagement et du Logement Rhone-Alpes.
- Blanco, S., Cejudo-Figueiras, C., Álvarez-Blanco, I., Bécares, E., Hoffmann, L., & Ector, L. (2010). Diatom atlas of the Duero Basin. In *Atlas de las Diatomeas de la cuenca del Duero* (p. 328). León: Universidad de León.
- Castellani, C., & Edwards, M. (2017). *Marine Plankton: A practical guide to ecology, methodology, and taxonomy*. Oxford University Press.
- Castillejo, P., Chamorro, S., Paz, L., Heinrich, C., Carrillo, I., Salazar, J. G., ... Lobo, E. A. (2018). Response of epilithic diatom communities to environmental gradients along an Ecuadorian Andean River. *Comptes Rendus - Biologies*. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2018.03.008>
- Cimarelli, L., Singh, K. S., Mai, N. T. N., Dhar, B. C., Brandi, A., Brandi, L., & Spurio,

- R. (2015). Molecular tools for the selective detection of nine diatom species biomarkers of various water quality levels. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(5), 5485–5504. <https://doi.org/10.3390/ijerph120505485>
- Dulias, K., Stoof-Leichsenring, K. R., Pestryakova, L. A., & Herzs Schuh, U. (2017). Sedimentary DNA versus morphology in the analysis of diatom-environment relationships. *Journal of Paleolimnology*, 57(1), 51–66. <https://doi.org/10.1007/s10933-016-9926-y>
- Edwards et al. (1991). DNA Extraction Protocol. *Nar*, (19:1349), 1991.
- Esteves, S. M., Keck, F., Almeida, S. F. P., Figueira, E., Bouchez, A., & Rimet, F. (2017). Can we predict diatoms herbicide sensitivities with phylogeny? Influence of intraspecific and interspecific variability. *Ecotoxicology*, 26(8), 1065–1077. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1834-z>
- Evans, K. M., Wortley, A. H., & Mann, D. G. (2007). An Assessment of Potential Diatom “Barcode” Genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their Effectiveness in Determining Relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist*, 158(3), 349–364. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2007.04.001>
- Evans, K. M., Wortley, A. H., Simpson, G. E., Chepurnov, V. A., & Mann, D. G. (2008). A molecular systematic approach to explore diversity within the Sellaphora pupula species complex (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 44(1), 215–231. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00454.x>
- Fránková, M., Poulíčková, A., Neděla, V., Tihlaříková, E., Šumberová, K., & Letáková, M. (2018). The low temperature method for environmental scanning electron microscopy—a new method for observation of diatom assemblages in vivo. *Diatom Research*, 33(3), 397–403. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2018.1545703>
- Gautam, S., Arya, A., & Vinayak, V. (2016). Protocol to establish axenic cultures for diatoms of fresh water. *International Journal of Science and Research*,

- 5(11), 410–418. <https://doi.org/10.21275/ART20162689>
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2019). *AlgaeBase. World-wide electronic publication*. Galway. Retrieved from http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=31828
- Guo, L., Sui, Z., Zhang, S., Ren, 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(2015), 1369–1380. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000076>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Heinrich, C. G., Leal, V. L., Schuch, M., Düpont, A., & Lobo, E. A. (2014). Epilithic diatoms in headwater areas of the hydrographical sub-basin of the Andreas Stream, RS, Brazil, and their relation with eutrophication processes, 26(4), 347–355.
- Hernández-Becerril, D. U. (2014). Biodiversidad de algas planctónicas marinas (Cyanobacteria, Prasinophyceae, Euglenophyta, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatophyceae, Parmophyceae, Raphidophyceae, Bacillariophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Dinoflagellata) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.), 44–53. <https://doi.org/10.7550/rmb.32037>
- Hlúbiková, D., Ector, L., & Hoffmann, L. (2011). Examination of the type material of some diatom species related to *Achnanthes minutissimum* (Kütz.) Czarn. (Bacillariophyceae). *Algological Studies*, 136(1), 19–43. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2011/0136-0019>
- Ishii, K.-I., Imai, I., Natsuike, M., Sawayama, S., Ishino, R., Liu, W., ... Ishikawa, A. (2018). A simple technique for establishing axenic cultures of centric

- diatoms from resting stage cells in bottom sediments. *Phycologia*, 57(6), 674–679. <https://doi.org/10.2216/17-73.1>
- Jahn, R., Zetzsche, H., Reinhardt, R., & Gemeinholzer, B. (2007). Diatoms and DNA barcoding: a pilot study on an environmental sample. *Proceedings of the 1st Central European Diatom Meeting 2007*, 113(May 2006), 63–68. <https://doi.org/10.3372/cediatom.113>
- Kermarrec, L., Franc, A., Rimet, F., Chaumeil, P., Humbert, J. F., & Bouchez, A. (2013). Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: A test for freshwater diatoms. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 607–619. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12105>
- Kermarrec, Lenaïg, Franc, A., Rimet, F., Chaumeil, P., Frigerio, J.-M., Humbert, J.-F., & Bouchez, A. (2014). A next-generation sequencing approach to river biomonitoring using benthic diatoms. *Freshwater Science*, 33(1), 349–363. <https://doi.org/10.1086/675079>
- Kirkham, A. R., Richthammer, P., Schmidt, K., Wustmann, M., Maeda, Y., Hedrich, R., ... Mock, T. (2017). A role for the cell-wall protein silacidin in cell size of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *ISME Journal*, 11(11), 2452–2464. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.100>
- Krammer, K., & Ange-Bertalot, H. (1998). Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. In *Bacillariophyceae 2* (p. 610). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kuo, Y. M., Yu, H. L., Kuan, W. H., Kuo, M. H., & Lin, H. J. (2016). Factors controlling changes in epilithic algal biomass in the mountain streams of subtropical Taiwan. *PLoS ONE*, 11(11), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166604>

- Li, G., & Campbell, D. A. (2017). Interactive effects of nitrogen and light on growth rates and RUBISCO content of small and large centric diatoms. *Photosynthesis Research*, 131(1), 93–103. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0301-7>
- Lobo, E. A., Heinrich, C. G., Schuch, M., Düpont, A., Costa, A. B. da, Wetzel, C. E., & Ector, L. (2016). *Índice Trófico De Qualidade Da Água: Guia Ilustrado Para Sistemas Lóticos Subtropicais E Temperados Brasileiros*. E-book. Retrieved from www.unisc.br/edunisc
- Lobo, E. A., Heinrich, C., Schuch, M., Wetzel, C. E., Heinrich, C. G., Wetzel, C. E., & Ector, L. (2016). Diatoms as Bioindicators in Rivers, (July). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31984-1>
- Lobo, E. A., Schuch, M., Heinrich, C. G., da Costa, A. Ben, Düpont, A., Wetzel, C. E., & Ector, L. (2015). Development of the Trophic Water Quality Index (TWQI) for subtropical temperate Brazilian lotic systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(6). <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4586-3>
- Luddington, I. A., Kaczmarska, I., & 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045664>
- MacGillivray, M. L., & Kaczmarska, I. (2011). Survey of the efficacy of a short fragment of the rbcL gene as a supplemental DNA barcode for diatoms. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58(6), 529–536. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2011.00585.x>
- Mann, D. G., Sato, S., Trobajo, R., Vanormelingen, P., & Souffreau, C. (2010). DNA barcoding for species identification and discovery in diatoms. *Cryptogamie*, 31(4), 557–577.
- Mapsdirections.info. (2018). Maps & Directions. Retrieved from <https://www.mapsdirections.info/>
- McGowan, S., Gunn, H. V., Whiteford, E. J., John Anderson, N., Jones, V. J., & Law,

- A. C. (2018). Functional attributes of epilithic diatoms for palaeoenvironmental interpretations in South-West Greenland lakes. *Journal of Paleolimnology*, 60(2), 273–298. <https://doi.org/10.1007/s10933-017-9968-9>
- Medlin, L. K. (2016). Evolution of the diatoms: major steps in their evolution and a review of the supporting molecular and morphological evidence. *Phycologia*, 55(1), 79–103. <https://doi.org/10.2216/15-105.1>
- Misaghi, F., Delgosha, F., Razzaghmanesh, M., & Myers, B. (2017). Introducing a water quality index for assessing water for irrigation purposes: A case study of the Ghezel Ozan River. *Science of the Total Environment*, 589, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.226>
- Molino, P. J., & Wetherbee, R. (2008). The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling*, 24(5), 365–379. <https://doi.org/10.1080/08927010802254583>
- Moniz, M., & Kaczmarek, I. (2009). Barcoding diatoms : Is there a good marker ?, 9, 65–74. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02633.x>
- Nanjappa, D., Sanges, R., Ferrante, M. I., & Zingone, A. (2017). Diatom flagellar genes and their expression during sexual reproduction in *Leptocylindrus danicus*. *BMC Genomics*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4210-8>
- NCBI Resource Coordinators. (2002). Basic Local Alignment Search Tool. Retrieved from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Nunes, M., Adams, J. B., & Bate, G. C. (2019). The use of epilithic diatoms grown on artificial substrata to indicate water quality changes in the lower reaches of the St Lucia Estuary, South Africa. *Water SA*, 45(1), 149. <https://doi.org/10.4314/wsa.v45i1.17>
- Oram, B. (2014). Monitoring the Quality of Surface Waters (WQI Calculator). Retrieved from <https://www.water-research.net/index.php/water-treatment/water-monitoring/monitoring-the-quality-of-surfacewaters>
- Pawlowski, J., Lejzerowicz, F., Apotheloz-Perret-Gentil, L., Visco, J., & Esling, P.

- (2016). Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: Time for change. *European Journal of Protistology*, 55(October), 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.02.003>
- Pawlowski, Jan, Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., ... de Vargas, C. (2012). CBOL Protist Working Group: Barcoding Eukaryotic Richness beyond the Animal, Plant, and Fungal Kingdoms. *PLoS Biology*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001419>
- Petrushkina, M., Gusev, E., Sorokin, B., Zotko, N., Mamaeva, A., Filimonova, A., ... Kuzmin, D. (2017). Fucoxanthin production by heterokont microalgae. *Algal Research*, 24, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.016>
- Pinder, M. I. M., Johansson, O. N., Almstedt, A., Kourtchenko, O., Clarke, A. K., Godhe, A., & Töpel, M. (2019). Genome Sequence of *Kordia* sp. Strain SMS9 Identified in a Non-Axenic Culture of the Diatom *Skeletonema marinoi*. *Journal of Genomics*, 7, 46–49. <https://doi.org/10.7150/jgen.35061>
- Pinseel, E., Vanormelingen, P., Hamilton, P. B., Vyverman, W., Van de Vijver, B., & Kopalova, K. (2017). Molecular and morphological characterization of the *Achnanthydium minutissimum* complex (Bacillariophyta) in Petuniabukta (Spitsbergen, High Arctic) including the description of *A. digitatum* sp. nov. *European Journal of Phycology*, 52(3), 264–280. <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1283540>
- Potapova, M., & Charles, D. F. (2007). Diatom metrics for monitoring eutrophication in rivers of the United States. *Ecological Indicators*, 7(1), 48–70. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2005.10.001>
- Purty, R., & Chatterjee, S. (2016). DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 3(1), 1–10.
- Raven, P., Evert, R., & Eichhom, S. (1992). Life cycle of a centric diatom. In *Biology of Plants* (5th ed., p. 260). New York: Worth Publishers.

- Richard, C., Mitbavkar, S., & Landoulsi, J. (2017). Diagnosis of the Diatom Community upon Biofilm Development on Stainless Steels in Natural Freshwater. *Scanning*, 2017, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/5052646>
- Rimet, F. (2012). Recent views on river pollution and diatoms. *Hydrobiologia*, 683(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0949-0>
- Rimet, F., Chaumeil, P., Keck, F., Kermarrec, L., Vasselon, V., Kahlert, M., ... Bouchez, A. (2015). R-Syst::diatom a barcode database for diatoms and freshwater biomonitoring data sources and curation procedure. *INRA Report*, 14. <https://doi.org/10.1093/database/baw016>
- Rimet, F., Chaumeil, P., Keck, F., Kermarrec, L., Vasselon, V., Kahlert, M., ... Bouchez, A. (2016). R-Syst::diatom: An open-access and curated barcode database for diatoms and freshwater monitoring. *Database*, 2016, 1–21. <https://doi.org/10.1093/database/baw016>
- Rimet, F., Kermarrec, L., Bouchez, A., Hoffmann, L., Ector, L., & Medlin, L. K. (2011). Molecular phylogeny of the family bacillariaceae based on 18s rDNA sequences: Focus on freshwater nitzschia of the section lanceolatae. *Diatom Research*, 26(3), 273–291. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2011.597988>
- Round, F.E., Crawford, R.M. and Mann, D. G. (1990). (1990). Biology and Morphology of the Genera. In *The diatoms* (p. 747). Cambridge: Cambridge University Press.
- Saade, A., & Bowler, C. (2009). Molecular Tools for Discovering the Secrets of Diatoms. *BioScience*, 59(9), 757–765. <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.9.7>
- Salomoni, S., Rocha, O., Hermany, G., & Lobo, E. (2011). Application of water quality biological indices using diatoms as bioindicators in the Gravataí river, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 71(4), 949–959. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000500015>
- Sánchez, C., Cristóbal, G., & Bueno, G. (2019). Diatom identification including life

- cycle stages through morphological and texture descriptors. *PeerJ*, 7, e6770. <https://doi.org/10.7717/peerj.6770>
- Santhosh Kumar, C., Prabu, V. A., & Prasanna Kumar, C. (2015a). DNA Barcode Genes (rbcL, 18s rRNA and ITS Phylogeny in *Skeletonema costatum* Grevelli (Cleve, 1873). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(9), 195–203. Retrieved from <http://www.ijcmas.com>
- Santhosh Kumar, C., Prabu, V. A., & Prasanna Kumar, C. (2015b). Original Research Article DNA Barcode Genes (rbcL, 18s rRNA and ITS Phylogeny. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 4(9), 1873. Recuperado el 10 de febrero de 2019 de <http://www.ijcmas.com>
- Segura-García, V., Cantoral-Uriza, E., Israde, I., & Maidana, N. (2012). Diatomeas epilíticas como indicadores de la calidad del agua en la cuenca alta del río Lerma, México. *Hidrobiológica*, 22(1), 16–27. Recuperado el 30 de enero de 2019 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-88972012000100003&script=sci_arttext
- Sharma, A., Prasad, V., Kumar, K., & Thakur, B. (2011). Diatom distribution and its relationship with water quality in the Mahi River Basin. *SCIENTIFIC CORRESPONDENCE*, 101(8), 1011–1015.
- Shishlyannikov, S. M., Zakharova, Y. R., Volokitina, N. A., Mikhailov, I. S., Petrova, D. P., & Likhoshway, Y. V. (2011). A procedure for establishing an axenic culture of the diatom *Synedra acus* subsp. *Radians* (Kütz.) Skabibitsch. From Lake Baikal. *Limnology and Oceanography: Methods*, 9(OCTOBER), 478–484. <https://doi.org/10.4319/lom.2011.9.478>
- Spilling, K., Tamminen, T., Andersen, T., & Kremp, A. (2010). Nutrient kinetics modeled from time series of substrate depletion and growth: Dissolved silicate uptake of Baltic Sea spring diatoms. *Marine Biology*, 157(2), 427–436. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1329-4>
- Taylor, P., Zgrundo, A., Lemke, P., Pniewski, F., Cox, E. J., & Lata, A. (2013). Morphological and molecular phylogenetic studies on *Fistulifera*

- saprophila, 37–41. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2013.833136>
- Tenorio, C., Uribe, E., Gil-Kodaka, P., Blanco, J., & Álvarez, G. (2016). Morphological and toxicological studies of Pseudo-nitzschia species from the central coast of Peru. *Diatom Research*, 31(4), 331–338. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2016.1247018>
- Terneus, E., Hernández, K., & Recine, M. J. (2012). EVALUACIÓN ECOLÓGICA DEL RÍO LLIQUINO A TRAVÉS DE MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS, PASTAZA – ECUADOR. *Revista de Ciencias, Universidad Del Valle*, 31–45. Recuperado el 15 de diciembre de 2019 de <http://praxisfilosofica.univalle.edu.co/index.php/rciencias/article/view/2043/1965>
- Terneus, E., & Yáñez, P. (2018). Principios fundamentales en torno a la calidad del agua , el uso de bioindicadores acuáticos y la restauración ecológica fluvial en Ecuador. *Revista de Ciencias de La Vida*, 27(1), 36–50.
- Tornés, E., Cambra, J., Gomà, J., Leira, M., Ortiz, R., & Sabater, S. (2007). Indicator taxa of benthic diatom communities: a case study in Mediterranean streams. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 43(1), 1–11.
- Tudesque, L., Rimet, F., & Ector, L. (2008). A new taxon of the section nitzschiae lanceolatae grunow: *Nitzschia costei* sp. nov. compared to *n. fonticola* grunow, *n. macedonica* hustedt, *n. tropica* hustedt and related species. *Diatom Research*, 23(2), 483–501. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2008.9705771>
- University of Colorado. (2019). DIATOMS OF NORTH AMERICA. Retrieved from <https://diatoms.org/>
- Urbánková, P., & Veselá, J. (2013). DNA-barcoding: A case study in the diatom genus *Frustulia* (Bacillariophyceae). *Nova Hedwigia*, 142(September), 147–162.
- Valegård, K., Andralojc, P. J., Haslam, R. P., Pearce, F. G., Eriksen, G. K.,

- Madgwick, P. J., ... Andersson, I. (2018). Structural and functional analyses of Rubisco from arctic diatom species reveal unusual posttranslational modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 293(34), 13033–13043. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003518>
- Van de Vijver, B., Ector, L., Beltrami, M. E., de Haan, M., Falasco, E., Hlúbiková, D., Wojtal, A. Z. (2011). A critical analysis of the type material of *Achnanthes lineare* W. Sm. (Bacillariophyceae). *Algological Studies*, 136(1), 167–191. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2011/0136-0167>
- Vasselon, V., Rimet, F., Tapolczai, K., & Bouchez, A. (2017). Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: Scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island, France). *Ecological Indicators*, 82(March), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.024>
- Virta, L., & Soininen, J. (2017). Distribution patterns of epilithic diatoms along climatic, spatial and physicochemical variables in the Baltic Sea. *Helgoland Marine Research*, 71(1). <https://doi.org/10.1186/s10152-017-0496-9>
- Visco, J. A., Apothéoz-Perret-Gentil, L., Cordonier, A., Esling, P., Pillet, L., & Pawlowski, J. (2015). Environmental Monitoring: Inferring the Diatom Index from Next-Generation Sequencing Data. *Environmental Science and Technology*, 49(13), 7597–7605. <https://doi.org/10.1021/es506158m>
- Wetzel, C. E., Ector, L., Van De Vijver, B. V.D., Compère, P., & Mann, D. G. (2015). Morphology, typification and critical analysis of some ecologically important small naviculoid species (Bacillariophyta). *Fottea*, 15(2), 203–234. <https://doi.org/10.5507/fot.2015.020>
- WFD. (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Parliament*, L327(22.12.2000), 1–82. <https://doi.org/10.1039/ap9842100196>
- Zimmermann, J., Abarca, N., Enk, N., Skibbe, O., Kusber, W. H., & Jahn, R. (2014).

Taxonomic reference libraries for environmental barcoding: A best practice example from diatom research. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108793>

Zimmermann, J., Jahn, R., & Gemeinholzer, B. (2011a). Barcoding diatoms: Evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity and Evolution*, 11(3), 173–192. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0050-6>

Zimmermann, J., Jahn, R., & Gemeinholzer, B. (2011b). Barcoding diatoms: Evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity and Evolution*, 11(3), 173–192. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0050-6>

Zimmermann, J., Jahn, R., & Gemeinholzer, B. (2014). Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies, (October). <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12336>

ANEXOS

Anexo 1

PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

1. Recoger 500 μ l de cultivo líquido de la muestra pura identificada en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Añadir 400 μ l de tampón de extracción y mezclarlo por vortex.
3. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 7 minutos.
4. Recoger el sobrenadante (aproximadamente 350 μ l, evitar tomar precipitado) y depositarlo en un tubo eppendorf nuevo.
5. Añadir 300 μ l de isopropanol y mezclarlo bien por inversión del tubo.
6. Dejar reposar por 2 minutos a temperatura ambiente (mejor en frío).
7. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 7 minutos.
8. Retirar el sobrenadante, por inversión que no se cae el pellet (si queda algún resto se quita golpeando el eppendorf sobre papel secante, no hace falta quitar con pipeta).
9. Añadir 500 μ l de etanol 70%, procurando despegar el pellet.
10. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 7 minutos.
11. Eliminamos todo el etanol, por inversión del tubo, y dejamos los tubos abiertos un ratito. Si después de todo sigue quedando.
12. Añadir 50 μ l de agua milli-Q, y dejar 5 minutos a temperatura ambiente para que se resuspenda el ADN (no pipetear ya que se podría mezclar con restos que no se han limpiado con los lavados).

ANEXO 2

Composición química de cada medio de cultivo empleado

Tabla 20

Composición química Medio CHU#10

Componente	Solución stock (g-L-1 dH₂O)	Cantidad utilizada	Concentración final del medio (M)
Ca(NO₃)₂	40	1mL	2.44 x 10 ⁻⁴
K₂HPO₄	5	1mL	2.87 x 10 ⁻⁵
MgSO₄·7H₂O	25	1mL	1.01 x 10 ⁻⁴
Na₂CO₃	20	1mL	1.89 x 10 ⁻⁴
Na₂SiO₃	25	1mL	2.05 x 10 ⁻⁴
FeCl₃	0.8	1mL	4.93 x 10 ⁻⁶

Tabla 21

Composición química Medio BBM

Componente	Solución stock (g-L-1 dH₂O)	Cantidad utilizada	Concentración final del medio (M)
Macronutrientes			
NaNO ₃	25	10mL	2.94 x 10 ⁻³
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.5	10mL	1.70 x 10 ⁻⁴
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.5	10mL	3.04 x 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	7.5	10mL	4.31 x 10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	17.5	10mL	1.29 x 10 ⁻³

NaCl	2.5	10mL	4.28 x10 ⁻⁴
Solución alcalina EDTA		1mL	
EDTA	50		1.71 x 10 ⁻⁴
KOH	31		5.53 x 10 ⁻⁴
Solución de Hierro acidificado		1mL	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98		1.79 x 10 ⁻⁵
H ₂ SO ₄			
Solución de Boro		1mL	
H ₃ BO ₃	11.42		1.85 x 10 ⁻⁴
Solución de metales traza		1mL	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82		3.07 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44		7.28 x 10 ⁻⁶
MoO ₃	0.71		4.93 x 10 ⁻⁶
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57		6.29 x 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49		1.68 x 10 ⁻⁶
Compuesto adicional			
Na ₂ SiO ₃	25	1mL	2.05 x 10 ⁻⁴

Tabla 22

Composición química Medio WC

Componente	Solución stock (g·L⁻¹ dH₂O)	Cantidad utilizada	Concentración final del medio (M)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36.76	1mL	2.50 x 10 ⁻⁴
MgSO ₄ ·7H ₂ O	36.97	1mL	1.50 x 10 ⁻⁴
NaHCO ₃	12.6	1mL	1.50 x 10 ⁻⁴
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	28.42	1mL	1.00 x 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	8.71	1mL	5.00 x 10 ⁻⁵

Solución de metales traza	1mL
Solución de vitaminas	1mL
