

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**Optimización de extracción de ADN y amplificación de los marcadores universales 16S y 18S ADNr para código de barras de ADN de microorganismos presentes en el Lago de Atitlán, Sololá y en un humedal artificial en El Progreso, Guatemala**

Trabajo de graduación presentado por Adriana María Carrillo Pérez para optar al grado de licenciada en Bioquímica y Microbiología presentado

Guatemala

2019



**Optimización de extracción de ADN y amplificación de los marcadores universales 16S y 18S ADNr para código de barras de ADN de microorganismos presentes en el Lago de Atitlán, Sololá y en un humedal artificial en El Progreso, Guatemala**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades




**Optimización de extracción de ADN y amplificación de los marcadores universales 16S y 18S ADNr para código de barras de ADN de microorganismos presentes en el Lago de Atitlán, Sololá y en un humedal artificial en El Progreso, Guatemala**


Trabajo de graduación presentado por Adriana María Carrillo Pérez para optar al grado de licenciada en Bioquímica y Microbiología presentado

Guatemala


2019

(f)   
MSc. Yunuen Soto

Tribunal examinador:

(f)   
MSc. Yunuen Soto

(f)   
Dra. Mónica Orozco

(f)   
Dra. Leda Pedelini

Fecha de aprobación: Guatemala, 3 de diciembre 2019.

## PREFACIO

La elaboración de esta tesis surgió por el interés de la empresa *Cementos Progreso* de utilizar las aguas tratadas provenientes de aguas residuales de usos domésticos, con el fin de utilizar los microorganismos nativos para fines comerciales. En el caso del Lago Atitlán surgió por interés personal debido a la contaminación que se presenta en la actualidad, por lo que se buscaba implementar métodos fáciles y rápidos para la identificación de los microorganismos presentes para su posterior uso.

La investigación de tesis ha sido posible gracias a la colaboración de *Cementos Progreso*, Centros de Estudios en Biotecnología (CEB) de la Universidad del Valle y del Centro de Estudios en Atitlán (CEA) por permitir utilizar las diferentes instalaciones y materiales para llevarla a cabo. Quiero agradecer, en primer lugar, a Yunuen Soto, asesora principal de la investigación, por su orientación y enseñanza a lo largo del proceso experimental. En segundo lugar, quiero agradecer a mi directora de carrera, Pamela Pennington, por su compañía a lo largo de la investigación y por cada uno de los consejos para la realización de la parte experimental y saber guiarme a lo largo del proceso. En lo personal, agradezco a todas las personas que estuvieron a mi lado en todo el proceso del trabajo experimental principalmente a mi familia por su apoyo incondicional y por darme ánimos en todo momento.

# ÍNDICE

PREFACIO .....	i
LISTA DE FIGURA.....	iv
LISTA DE CUADROS .....	vii
RESUMEN.....	viii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS.....	2
III. HIPÓTESIS .....	3
V. MARCO TEÓRICO .....	5
A. Microalgas.....	5
1. Características .....	6
2. Clasificación.....	7
3. Condiciones de crecimiento (cultivos) .....	7
4. Tipos de cultivos .....	8
B. Microorganismos procariotas.....	9
C. Microorganismos eucariotas .....	9
D. Biomasa .....	10
1. Fuente como combustible.....	10
2. Fuente como biofertilizante.....	11
3. Aceites (Fuente como materia prima) .....	12
E. Humedal artificial .....	12
1. Componentes.....	12
2. Funciones .....	12
3. Tipos de humedales .....	13
4. Aplicaciones.....	14
F. Lago de Atitlán .....	14
1. Características .....	14
2. Actualidad .....	15
3. Ecología.....	15
4. Toxinas producidas por cianobacterias .....	15
G. Código de barras de ADN.....	16
H. Extracción de ADN.....	17
I. Marcadores universales 16S y 18S .....	18
1. Reacción en cadena de la polimerasa .....	19
VI. ANTECEDENTES.....	22

VII.	METODOLOGÍA .....	23
VIII.	RESULTADOS .....	30
IX.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	59
X.	CONCLUSIONES .....	65
XI.	RECOMENDACIONES .....	66
XII.	REFERENCIAS .....	67
XIII.	ANEXOS .....	73
XIV.	GLOSARIO.....	118

## LISTA DE FIGURA

Figura 1. Principales características de microalgas .....	6
Figura 2. Tipos de fotobiorreactores. A) Fotobiorreactor tubulares. B) Fotobiorreactor en placa. C) Fotobiorreactores en columna vertical. D) Fotobiorreactores semi-abierto .....	8
Figura 3. Morfología de microorganismos procariotas. ....	9
Figura 4. Clasificación de algas eucariotas. A) Euglenophyta B) Dinoflagelados C) Diatomeas D) Clorophyta (algas verdes) E) Phaeophyta F) Rhodophyta.....	10
Figura 5. Tipos de humedales artificiales según el flujo del agua .....	13
Figura 6. Humedal artificial de flujo subsuperficial horizontal .....	14
Figura 7. Flujo de trabajo para código de barras para ADN.....	17
Figura 8. Representación del gen ARNr 16S de las 9 regiones conservadas (V1-V9). Corresponden a la secuencia del genoma de <i>Escherichia coli</i> .....	19
Figura 9. Representación del gen ARNr 18S de las 9 regiones conservadas (V1-V9). Corresponden a la secuencia de <i>S. cerevisiae</i> .....	19
Figura 10. Diagrama del proceso de la reacción en cadena de la polimerasa.....	21
Figura 11. Flujo de trabajo (Los números corresponden a los objetivos específicos) .....	25
Figura 12. Cuadros de cámara Neubauer (El conteo de células se realizó en los cuadros resaltados en verde) .....	29
Figura 13. Diagrama del humedal artificial con la localización de los puntos de muestreo. H = humedal. ...	30
Figura 14. Localización del centro Weiss muestreado en el Lago de Atilán.....	31
Figura 15. Diagrama de dispersión de cuantificación por medio de espectrofotometría en muestras frescas y congeladas del humedal artificial. ....	34
Figura 16. Diagrama de dispersión de cuantificación por medio de fluorometría en muestras frescas y congeladas del humedal artificial. ....	35
Figura 17. Productos de amplificación de PCR 18S (Ek82_F y Proto5_R) de muestras frescas y congeladas del humedal artificial en gel de agarosa 0.8%. ....	37
Figura 18. Productos de amplificación de PCR 16S (27_F y 1492_R) de muestras frescas y congeladas humedal artificial en gel de agarosa 0.8%. ....	38
Figura 19. Productos de amplificación de PCR 16S (27_F y 1492_R) de muestras frescas del centro del Lago de Atilán y muestras preservadas con RNAlater del humedal artificial en gel de agarosa 0.8%. ....	39
Figura 20. Productos de amplificación de PCR 18S (Ek82_F y Proto5_R) de muestras frescas del centro Lago Atilán a distintas profundidades y muestras preservadas con RNAlater del humedal artificial en gel de agarosa 0.8%. ....	39
Figura 21. Productos de amplificación de PCR 18S (V4_F y V4_R) de muestras frescas del humedal artificial en gel de agarosa 0.8%. ....	40
Figura 22. Patrones de restricción obtenidos de la digestión enzimática con <i>RsaI</i> en productos 18S (Ek82_F y Proto5_R) de muestras frescas del centro Lago Atilán a distintas profundidades y muestras frescas del humedal artificial en gel de agarosa 2.0%. ....	41
Figura 23. Patrones de restricción obtenidos de la digestión enzimática con <i>RsaI</i> en productos de PCR 16S (27_F y 1492_R) de muestras congeladas del humedal artificial en gel de agarosa 2.0%. ....	42
Figura 24. Patrones de restricción obtenidos de la digestión enzimática con <i>RsaI</i> en productos de PCR 18S (Ek82_F y Proto5_R) de muestras congeladas del humedal artificial en gel de agarosa 2.0%. ....	43
Figura 25. Mapa de calor de bandas obtenidas de la digestión enzimática con <i>RsaI</i> en productos PCR 18S (Ek82_F y Proto5_R) para microorganismos presentes en humedal artificial y Lago de Atilán .....	44
Figura 26. Alineamiento de cebadores universales 18S V4_F y V4_R con las secuencias para el género <i>Nitzschia</i> sp. ....	48
Figura 27. Alineamiento de cebadores universales 18S V4_F y V4_R con secuencias para el género <i>Phormidium</i> sp. y <i>Phormidium autumnale</i> . ....	48
Figura 28. Alineamiento de cebadores universales 18S V4_F y V4_R con secuencias para el género <i>Calonesis</i> sp. ....	49
Figura 29. Alineamiento de cebadores universales 18S V4_F y V4_R con secuencias para el género <i>Spirogyra</i> sp. ....	49
Figura 30. Alineamiento de cebadores universales 18S V4_F y V4_R con secuencias para el género <i>Navicula</i> sp. ....	49

Figura 31. Alineamiento de cebadores universales 18S V4_F y V4_R con secuencias para el género <i>Euglena</i> sp. ....	50
Figura 32. Alineamiento de cebadores universales 18S V4_F y V4_R con secuencias para el género <i>Oocystis</i> sp. ....	50
Figura 33. Alineamiento de cebadores universales 18S V4_F y V4_R para secuencias para el género <i>Chlorococcum</i> sp. ....	51
Figura 34. Alineamiento de cebadores universales 18S V4_F y V4_R para secuencias para el género <i>Closterium</i> sp. ....	51
Figura 35. Alineamiento de cebadores universales 18S V4_F y V4_R para secuencias para el género <i>Wilmottia</i> sp. ....	52
Figura 36. Diagrama de los cebadores V643 y V804 para la región V4 .....	53
Figura 37. Identificación de microorganismos por PCR <i>in silico</i> del cebador V643 para la región V4 .....	53
Figura 38. Identificación de microorganismos por PCR <i>in silico</i> del cebador V804 para la región V4 .....	55
Figura 39. Promedio de conteo de células de los diferentes puntos de muestreo en el humedal artificial ....	57
Figura 40. Promedio de conteo de células de los diferentes puntos de muestreo en el humedal artificial ....	58
Figura 41. Diagrama de dispersión de dos métodos de cuantificación en muestras frescas del humedal artificial. ....	85
Figura 42. Diagrama de dispersión de dos métodos de cuantificación en muestras congeladas del humedal artificial. ....	85
Figura 43. Diagrama de dispersión de dos métodos de cuantificación en muestras frescas del centro del Lago Atitlán.....	86
Figura 44. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Nitzschia</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	86
Figura 45. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Nitzschia</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	87
Figura 46. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Euglena</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	88
Figura 47. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Euglena</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	89
Figura 48. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Caloneis</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	91
Figura 49. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Caloneis</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	92
Figura 50. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Spirogyra</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	93
Figura 51. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Spirogyra</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	95
Figura 52. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Navicula</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	96
Figura 53. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Navicula</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	97
Figura 54. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Oocystis</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	98
Figura 55. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Oocystis</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	98
Figura 56. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Chlorococcum</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	99
Figura 57. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Chlorococcum</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	100
Figura 58. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Closterium</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	101
Figura 59. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Closterium</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	102
Figura 60. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Wilmottia</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	103

Figura 61. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Wilmottia</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	105
Figura 62. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Phormidium</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	107
Figura 63. Alineamiento de cebadores V4_F y V4_R con secuencia del género <i>Phormidium</i> sp. por el programa Cluster Muscle .....	107

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de microalgas según: divisiones, clase, orden (SILVA, 2019) .....	7
Cuadro 2. Marcadores universales 16S y 18S que se probaron en este estudio .....	19
Cuadro 3. Variables dependientes e independientes.....	24
Cuadro 4. Secuencia de cebadores utilizados en este estudio.....	27
Cuadro 5. Condiciones termociclador PCR 16S (27_F y 1492_R) y 18S (Ek82_F y Proto5_R).....	27
Cuadro 6. Condiciones termociclador PCR 18S cebadores V4_F y V4_R .....	28
Cuadro 7. Comparación de dos métodos de cuantificación de ADN por medio de espectrofotometría y fluorometría de muestras frescas del humedal artificial. ....	32
Cuadro 8. Comparación de dos métodos de cuantificación de ADN por medio de espectrofotometría y fluorometría de muestras frescas del centro de Lago Atitlán a distintas profundidades.....	32
Cuadro 9. Comparación de dos métodos de cuantificación de ADN por medio de espectrofotometría y fluorometría de muestras congeladas de humedal artificial.....	33
Cuadro 10. Prueba estadística Kruskal-Wallis para muestras frescas y congeladas. ....	35
Cuadro 11. Prueba Post-Hoc .....	35
Cuadro 12. Tamaño de bandas obtenidas de la digestión enzimática con RsaI en productos de 18S (Ek82_F y Proto5_R) de muestras frescas del centro Lago Atitlán a distintas profundidades y muestras frescas del humedal artificial en gel de agarosa 2.0%. ....	41
Cuadro 13. Tamaño de bandas obtenidas de la digestión enzimática con RsaI en productos de PCR 16S (27_F y 1492_R) de muestras congeladas del humedal artificial en gel de agarosa 2.0%. ....	42
Cuadro 14. Tamaño de bandas obtenidas de la digestión enzimática con RsaI en productos de PCR 18S (Ek82_F y Proto5_R) de muestras congeladas del humedal artificial en gel de agarosa 2.0%. ....	43
Cuadro 15. Identificación de microalgas y su posible aplicación.....	45
Cuadro 16. Diseño de cebador V643 para eucariotas para la región V4 .....	52
Cuadro 17. Diseño de cebador V804 para eucariotas para la región V4 .....	52
Cuadro 18. Prueba estadística Kruskal-Wallis para los diferentes puntos de muestreo.....	58

## RESUMEN

Las microalgas, procariota y eucariota tienen una amplia variedad de aplicaciones en biotecnología, alimentos, energía y agricultura. Suelen estar en exceso en diferentes cuerpos de agua naturales altamente contaminados por incremento de nutrientes. Asimismo, tienen un rol importante en la remediación de aguas residuales a través de sistemas de tratamiento de agua, por ejemplo, humedal artificial. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método molecular para la identificación de microalgas presentes en un humedal artificial (Sanarate) y en el Lago de Atitlán (Sololá). Para esto se realizó extracción de ADN de muestras frescas y congeladas por el método de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), amplificación de los marcadores universales 16S (cianobacterias) y 18S ADNr (eucariotas) y análisis de patrones de restricción por digestión enzimática de los amplicones con RSAI. Además, se realizó caracterización microscópica en muestras fijadas en lugol 2% y se cuantificaron con cámara de Neubauer. Se obtuvo amplificación de los dos marcadores universales en las muestras analizadas, sugiriendo presencia de microalgas de ambos orígenes. También se determinó diferencia en los patrones de restricción entre las muestras del humedal artificial y del Lago de Atitlán. Por último, en el humedal artificial se identificó morfológicamente (hasta género) y se encontró en mayor cantidad: *Chlorella* 44%, *Euglena* 8% y de morfología filamentosa 5% como *Spirogyra sp.* y *Wilmottia sp.* entre otras en muestras del humedal artificial. A partir de estos resultados se puede continuar con el desarrollo de un método molecular óptimo y más rápido para identificación de microalgas. También se sugiere el aprovechamiento de *Euglena sp.* y *Spirogyra sp.* para la producción de biocombustibles debido a su amplia aplicación en biotecnología.

# I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos unicelulares o agrupados, en colonias o filamentos, fotosintéticos que se encuentran en diferentes cuerpos de agua y en tierra. Se ha visto que estos microorganismos tienen capacidad biorremediadora, lo cual consiste en la eliminación o biotransformación de compuestos contaminantes de un medio natural. Los compuestos son captados por la biomasa algal y pueden ser recuperados mediante su cosecha, con el objetivo final de eliminación de contaminantes y producción de biomasa con fines comerciales como: biofertilizantes, biocombustibles de cuarta generación, alimentación animal, cosméticos, consumo humano, entre otros. Por lo tanto, esta investigación pretendió determinar la diversidad de microalgas y cianobacterias para evaluar su potencial como materias primas sustitutas de bajo costo e impacto ambiental e implementar en el laboratorio de Bioquímica y microbiología técnicas moleculares para la identificación de estos microorganismos. Este estudio se realizó en dos cuerpos de agua de diferente naturaleza: el primero fue un humedal artificial ubicado en Sanarate (El Progreso), el segundo en el Lago de Atitlán, ubicado en el departamento de Sololá. Las muestras de agua se recolectaron en los meses de julio y septiembre 2019 y se procesaron en los laboratorios de la Universidad del Valle de Guatemala para su análisis. El presente estudio se implementó un método óptimo de extracción de ADN y amplificación de los marcadores universales 16S y 18S ADN<sub>r</sub> de microalgas nativas de los cuerpos de agua mencionadas anteriormente. Se obtuvo amplificación de los dos marcadores universales en las muestras analizadas, sugiriendo presencia de microalgas de ambos orígenes. De modo que servirá de antecedente para posteriores estudios de caracterización molecular y análisis de código de barras de ADN (*DNA barcoding*) para funciones taxonómicas para posteriores investigaciones.

## II. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Implementar un método óptimo de extracción total de ADN y amplificación de los marcadores universales 16S y 18S ADNr de microalgas nativas de diferentes cuerpos de agua.

### B. Objetivos específicos

1. Optimizar el método de extracción de ADN de microorganismos presentes en diferentes muestras de agua.
2. Estandarizar la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para el marcador universal de procariotas 16S ADNr.
3. Estandarizar la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para el marcador universal de eucariotas 18S ADNr.
4. Determinar diferencia de patrones de restricción en productos de PCR de 16S y 18S en los diferentes puntos de muestreo.
5. Caracterizar y cuantificar microscópicamente organismos presentes en las muestras del Humedal artificial.
6. Diseñar cebadores 18S para la región V4 para la identificación de microalgas eucariotas.

### **III. HIPÓTESIS**

El método de extracción de ADN por el método de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y PCR pueden ser óptimos para microorganismos procariotas y eucariotas de los diferentes cuerpos de agua.

## IV. JUSTIFICACIÓN

El estudio se centró en dos diferentes cuerpos de agua: un humedal artificial ubicado en Sanarate (El Progreso) y el Lago de Atitlán (Sololá). El humedal es una zona que se encuentra en una superficie terrestre saturada de agua, regulada por factores climáticos y en constante interrelación con los seres vivos que se encuentran en su interior. Son utilizados para la mejora de la calidad de las aguas en ecosistemas naturales. Se seleccionó el humedal artificial de la empresa *Cementos Progreso* en la planta de San Miguel (Sanarate, El Progreso), construido en el año 2,000, con el fin de tratar las aguas residuales provenientes de usos domésticos. *Cementos Progreso* es una empresa guatemalteca que se compromete al cuidado del medio ambiente, se busca utilizar los microorganismos nativos para fines comerciales.

El Lago de Atitlán es un ecosistema que constituye el medio en el cual interactúan variedad de flora y fauna. Se caracteriza por ser una cuenca endorreica, es decir, que no tiene una salida de agua fluvial hacia el océano. Este cuerpo de agua que tiene alta contaminación principalmente por agua residuales, basura sólida y químicos usados en actividades agrícolas por ende afecta a las comunidades cercanas. Se tienen registros que, desde la década de 1980, los niveles de contaminación se han incrementado en el agua del lago debido al producto de la actividad humana en la cuenca. Principalmente por el aumento de la población que ha provocado una mayor descarga de aguas residuales sin tratamiento, mayor deforestación en la cobertura boscosa causando arrastre del suelo por escorrentía en la estación lluviosa, así como el aumento en el uso de detergentes y fertilizantes químicos. Estos factores han provocado el aumento en la concentración de nutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo) en el lago promoviendo florecimientos de microalgas potencialmente dañinas que afectan el ecosistema y a las comunidades aledañas.

En los últimos años se han realizado diferentes estudios en los cuales se ha demostrado que las microalgas y cianobacterias son materias primas alternativas para la producción de alimentos (alimentos fermentados, aditivos o suplementos, preservación de alimentos y biomasa), energía y medio ambiente (biocombustibles, biorremediación, ensayos de toxicidad y bioindicadores), agricultura (fijación de nitrógeno, biofertilizantes y ciclos de nutrientes) y biotecnología (producción de fármacos, suplementos dietéticos y pigmentos). Por lo tanto, esta investigación pretendió determinar la diversidad de microalgas y cianobacterias en el humedal artificial de *Cementos Progreso* y un análisis preliminar de muestras del Lago de Atitlán para evaluar su potencial como materias primas sustitutas de bajo costo e impacto ambiental.

## V. MARCO TEÓRICO

### A. Microalgas

Las microalgas son microorganismos unicelulares o agrupadas en colonias o filamentos fotosintéticos que se encuentran en diferentes cuerpos de agua (dulces, saladas, lagos hipersalinos, desiertos y ecosistemas árticos) (Ganesan V, 2014). El componente principal de las células eucariotas en su pared celular es la celulosa y además pueden contener macromoléculas como la pectina y peptidoglucano. Las células procariotas se dividen en dos grupos Gram-negativas y Gram-positivas ambas contienen en su pared celular peptidoglucano, con excepción que las Gram-positivas que carecen de una membrana externa pero se encuentran rodeadas por capas de peptidoglucano mucho más gruesas que las que se encuentran en las células Gram-negativas. Dentro de las capas de peptidoglucano se encuentran polímeros aniónicos, llamados ácidos teicoicos (Silhavy, Kahne, & Walker, 2010). Las microalgas se encuentran presentes en un rango bajo de temperaturas y nutrientes y son responsables de la producción del 50% del oxígeno y fijación del 50% del carbono en la tierra (Hernández, 2009). Se estima que existen más de 100,000 especies y se encuentran en diferentes formas, con un diámetro de 0.2 a 2.0  $\mu\text{m}$  y con una longitud de hasta 60m. Están constituidas por proteínas, carbohidratos y lípidos (Hernández, 2009), estos pueden ir variando según la manipulación que se reciba de nutrientes, cantidad luz solar y dióxido de carbono (Braidá, Tartaglia, Campot, & Nervi, 2015).

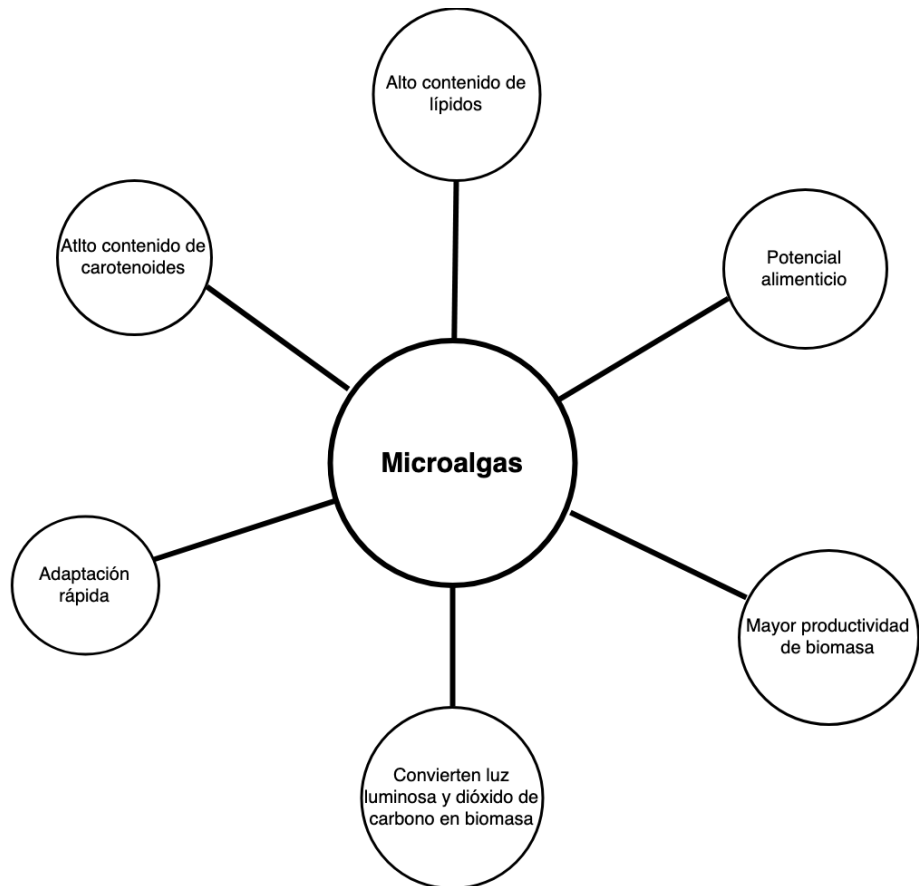
Al ser microorganismos fotosintéticos pueden ser autótrofos o heterótrofos (Guamán, Nory, & Romero, 2016). Los autótrofos almacenan energía química en moléculas de carbohidratos que sintetizan (Del Carmen & García, 2013). Los heterótrofos son algas dependientes de la glucosa u otras fuentes de carbono para el metabolismo del carbono y energía y algunas microalgas pueden crecer de forma mixotrófica (autótrofos y heterótrofos). Debido a que las microalgas son ricas en energía han recibido atención por su facilidad de adaptación para crecer en fotobiorreactores o estanques abiertos para la producción de aceites y lípidos para múltiples aplicaciones (Guamán *et al.*, 2016).

Las microalgas se pueden subdividir en algas eucariotas y procariotas (Ganesan V, 2014). Las eucariotas poseen orgánulos celulares definidos: núcleos, cloroplastos, mitocondrias, además presentan diferentes pigmentos fotosintéticos. Entre estas se encuentran: rodofitas, clorofitas, dinofitas, crisofitas, prymnesiofitas, bacillariofitas, xantofitas, eustigmatofitas, raphidofitas y feofitas. Las procariotas (cianobacterias o azul-verde) son primitivos y poseen la estructura celular más simple de las bacterias y se encuentran distribuidos en hábitat terrestres y acuáticos. Estos microorganismos son eficientes para convertir la energía solar en biomasa al tener acceso a agua, dióxido de carbono y otros nutrientes por medio de la fotosíntesis (Guamán *et al.*, 2016). Entre las microalgas importantes que convierten la energía solar en biomasa son: *Anthospira maxima*, *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chorella vulgaris*, *Dunaliella salina* y *Chaetoceros muelleri* (Ghayal & Pandya, 2013).

## 1. Características

Entre las características de las microalgas se encuentran (Vega Naranjo & la, 2014):

Figura 1. Principales características de microalgas



## 2. Clasificación

En el siguiente cuadro se presenta la clasificación de microalgas:

Cuadro 1. Clasificación de microalgas según: divisiones, clase, orden

Divisiones	Clase	Orden
Cryptophyta (Diatomeas)	Cryptophyceae	Cryptophyceae
Pyrophyta (Dinoflagellata)	Dinophyceae	Peridinales
	Adinophyceae	Procentrales
Haptophyta	Pymnesiophyceae	
Euglenophyta (Euglenozoa)	Euglenophyceae	Euglenales
Clorophyta (algas verdes)	Clorophyceae	
	Charophyceae	
	Mikromonadophyceae	
	Pleurastrophyceae	
Phaeophyta	Phaeophyceae	Laminariales
		Desmarestiales
		Ectocarpales
		Chordariales
		Dictyosiphonales
		Seytosiphonales
Ochrophyta	Bacillariophyceae	Dictyotales
		Fucales
Ochrophyta	Chrysophyceae	
		Dictyochophyceae

(SILVA, 2019)

## 3. Condiciones de crecimiento (cultivos)

Los cultivos de microalgas deben cumplir ciertas condiciones para su crecimiento entre ellas se encuentran (Hernández-Pérez & Labbé, 2014):

- Luz: Este es una de las condiciones más importantes para el cultivo de microalgas debido a que la ausencia de la misma no alcanzaría para su tasa de crecimiento y el aumento de la misma podría ocasionar la fotoinhibición; el cual es el punto de saturación que conduce a la muerte celular. El rango de luz óptimo es de 2,000-4,000lux y tienen un ciclo 10-30 horas.
- pH: Está influenciado por productividad algal, respiración, alcalinidad y composición iónica, actividad microbiana autotrófica y heterotrófica. El rango de pH para la mayoría de los cultivos se encuentra entre 7 y 9, siendo un rango óptimo de 8.2 a 8.7 (J, R. Benavente-Váldez, J.C. Montañez, C.N. Aguilar, 2009).
- Temperatura: Esta varía entre especies pero el rango de temperatura óptima se encuentra entre 28-35°C.
- Dióxido de carbono: Aumenta la productividad microalgal. La concentración de dióxido de carbono tolerable para diferentes especies de microalgas se encuentra entre 10-15%.

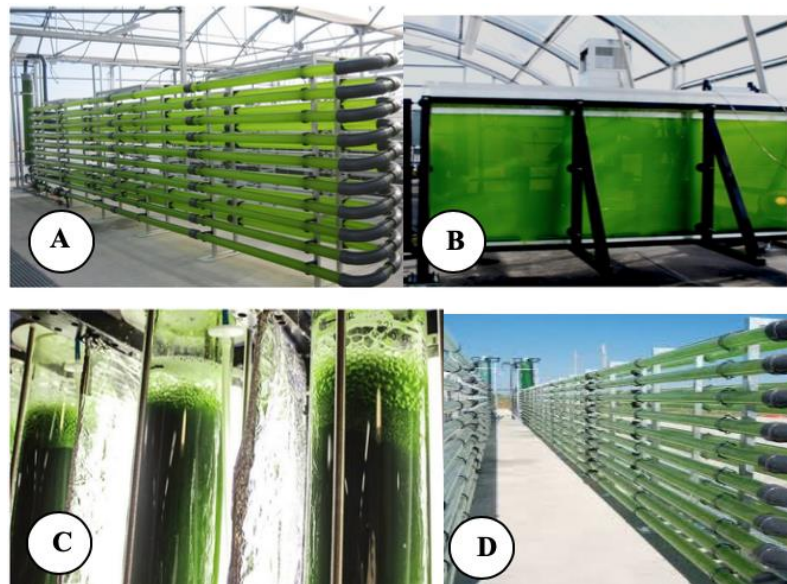
- Nutrientes: Entre los principales se encuentran nitrógeno y fósforo. Estos ayudan en la regulación de lípidos, en la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía.

#### 4. Tipos de cultivos

Los cultivos de microalgas se dividen en dos tipos: abiertos y cerrados. Los sistemas abiertos se refiere que la biomasa está expuesta a las condiciones del medio ambiente y los cerrados se encuentran en fotobiorreactores, es decir, no se encuentran en contacto con el medio externo (Ramírez, Queiroz Zepka, & Jacob-Lopes, 2013). Los sistemas cerrados son llamados fotobiorreactores los cuales son contenedores artificiales en dónde en su interior se puede generar condiciones necesarias para que los microorganismos se cultiven, crezcan y se desarrollen de manera rápida y eficiente para generar biomasa. En el campo de biotecnología, este tipo de biorreactor se utiliza para el cultivo de microalgas con el propósito de fijar dióxido de carbono para la producción de biomasa como se mencionó anteriormente, mediante la reacción de la fotosíntesis que se lleva a cabo (Mendoza-Guzmán, de la Jara-Valido, & Portillo-Hahnefeld, 2011).

Los sistemas cerrados tienen diversas ventajas entre ellas se encuentran: mayor rendimiento en la depuración del agua, mayor eficiencia del proceso de fotosíntesis, reducción de la pérdida de dióxido de carbono, evita los malos olores y la evaporación del agua, evita la contaminación por otros microorganismos lo cual ayuda a tener volúmenes de biomasa mayores y permite la regulación de parámetros que intervienen (Piñero, 2015). Los diseños de estos pueden ir variando. Pueden ser tubulares, columna vertical con burbujeo, semi-abierto y panel vertical/horizontal (ver Figura 3) (Ramírez *et al.*, 2013).

Figura 2. Tipos de fotobiorreactores. A) Fotobiorreactor tubulares. B) Fotobiorreactor en placa. C) Fotobiorreactores en columna vertical. D) Fotobiorreactores semi-abiertos.



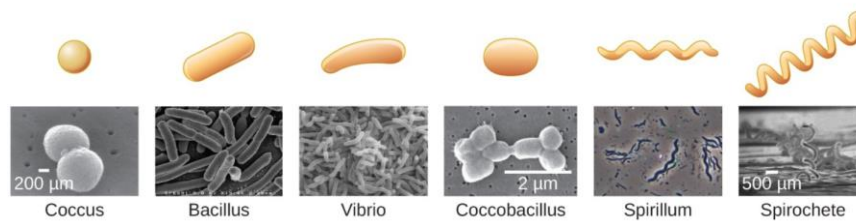
(Piñero, 2015)

## B. Microorganismos procariotas

Las bacterias se caracterizan por no tener su material genético en el núcleo (Lumen, 2018). Los microorganismos procariotas se encuentran en la mayoría de los hábitats de la Tierra: agua, suelo y sedimentos. Estas pueden llegar a medir entre 0.2-2.0  $\mu\text{m}$ . Son componentes importantes en los ciclos biogeoquímicos de la biósfera y representan una gran parte de la diversidad genética (Whitman, Coleman, & Wiebe, 1998).

Las formas comunes son cocos (esféricas), bacilos (bastones), espirilo, espiroqueta o Vibrio (curvas) (ver Figura 4) (Lumen, 2018).

Figura 3. Morfología de microorganismos procariotas.



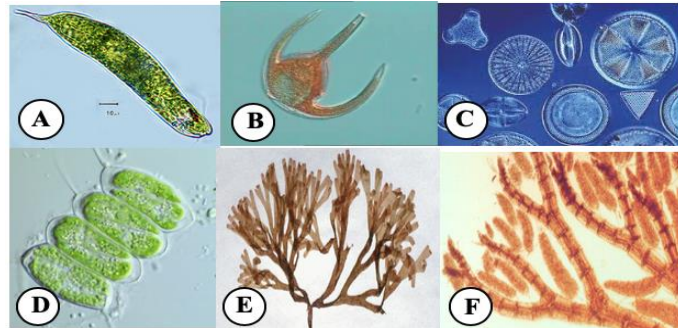
(Lumen, 2015)

## C. Microorganismos eucariotas

El dominio Eukarya incluye a las eucariotas unicelulares o pluricelulares, por ejemplo: protistas, hongos, plantas, algas y animales. La característica principal es que su material genético se encuentra dentro de un núcleo (Lumen, 2018). Además, estas cuentan con orgánulos que les permite realizar reacciones bioquímicas las cuales les ayuda sobrevivir y reproducirse.

Las algas son organismos fotosintéticos que extraen energía del sol y liberan oxígeno y carbohidratos a su alrededor; su pared celular es de celulosa y carbohidratos. Estas se pueden dividir en varios tipos según su morfología o modo de crecimiento (Robert A. Andersen Ralph A. Lewin, 2019). Se pueden dividir en algas verdes, rojas, pardas y doradas (ver Figura 4)

Figura 4. Clasificación de algas eucariotas. A) *Euglenophyta* B) *Dinoflagelados* C) *Diatomeas* D) *Clorophyta* (algas verdes) E) *Phaeophyta* F) *Rhodophyta*



(Braidia *et al.*, 2015)

## D. Biomasa

En la fotosíntesis por medio de la luz solar y dióxido de carbono se produce variedad de moléculas orgánicas y biomasa, por medio de este proceso los organismos fotoautotróficos como las plantas, algas y cianobacterias almacenan energía solar y esto tiene potencial para cubrir una parte significativa de la demanda mundial de energía (Benedetti; *et al*, 2018). Es parte importante para el ciclo del carbono de la Tierra, ya que ayuda a regular la cantidad de luz solar que entra en la atmósfera de la Tierra (Ghayal & Pandya, 2013). Se han utilizado diferentes combustibles de biomasa para la generación de energía bioenergética, como los residuos agrícolas, residuos de madera, cultivos energéticos específicamente como materiales de desecho (Freiberg, Scharfe, Murta, & Seidler, 2018)

### 1. Fuente como combustible

Los lípidos son la fuente principal para la producción de biodiesel y se encuentran presentes entre el 20-50% de su peso seco o incluso valores más altos. Esto se debe a la eficiencia fotosintéticas que tiene las microalgas y se define como la función de la energía luminosa absorbida que es fijada como energía química en la biomasa durante el crecimiento autotrófico. Las microalgas aprovechan la radiación solar entre los 400 y 700nm de longitud de onda denominado Radiación fotosintéticamente activa (Hernández, 2009).

Los lípidos producidos por microalgas se clasifican en dos: no polares (almacenamiento: acilgliceroles, esteroides, ácido grasos libres y ésteres de esterilo) y polares (estructurales). Los principales componentes de lípidos de almacenamiento se encuentran triacilgliceroles (TAGs) entre los cuales se encuentran ácidos grasos saturados e insaturados, glucolípidos, fosfolípidos y pigmentos; entre los lípidos estructurales se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Chen, Wang, Qiu, & Ge, 2018). Es importante mencionar que

no todos los lípidos sintetizados por las microalgas son funcionales para la producción de biodiesel. Las cantidades de estos lípidos varían según la especie, las condiciones de crecimiento y el ambiente. Se sabe que el contenido de lípidos varía entre 20-50% de la biomasa seca, entre estas se encuentran: *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium* y *Tetraselmis* (Sajjadi, Chen, Raman, & Ibrahim, 2018). Entre los apropiados se encuentran ácidos grasos, libres y unidos covalentemente al glicerol y sus derivados, los cuales son producidos con mayor frecuencia, usualmente se encuentran entre el 20-40% (Hernández, 2009). La producción de biocombustibles se puede clasificar de 2 formas: conversión termoquímica y bioquímica. Conversión termoquímica la biomasa se descompone por medio de calor y la conversión bioquímica consiste en la degradación biológica de la biomasa por medio de reacciones químicas y biológicas asociadas a procesos metabólicos (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

Las investigaciones que se han realizado acerca de esta nueva fuente de combustibles tienen diversas ventajas entre ellas se encuentra que las condiciones de cultivo pueden ser controlados por medio de la limitación de nutrientes y no requieren productos agrícolas o tierras de cultivo para su producción. Además, esta tecnología conlleva al reciclaje del dióxido de carbono liberado en las emisiones industriales. Adicional a esto la biomasa residual ha sido factible para la alimentación para los seres vivos y en la producción de otros biocombustibles o de fertilizantes (Hernández, 2009).

## **2. Fuente como biofertilizante**

Los biofertilizantes son compuestos orgánicos de los microorganismos vivos para promover el crecimiento de semillas, plantas o bacterias del suelo mediante nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo, potasio, etc. Las características principales de estos es la mejora de la productividad de los cultivos en un tiempo relativamente corto, reducción de consumo de energía, aumento en la fertilidad de los suelos y el control biológico de los organismos fitopatógenos (Win, Barone, Secundo, & Fu, 2018). Estudios recientes han observado que diferentes tipos de microorganismos fotosintéticos como las microalgas eucariotas y procariotas ayudan en la recirculación y biodisponibilidad de elementos importantes como lo son el fósforo, hierro y nitrógeno, por lo tanto, son importantes para el acondicionamiento de suelos agrícolas. Actualmente, se ha utilizado para incrementar la productividad de diferentes cultivos principalmente en maíz y arroz ya que estos se utilizan para alimentación de seres humanos, ganado y aves, los cultivos en los últimos años han ido aumentando la demanda por lo que se debe de mejorar su crecimiento y rendimiento (Dineshkumar *et al.*, 2019). Para la utilización de algunas técnicas de conversión se encuentra la pirólisis en esta técnica se produce carbón vegetal, llamado Biochar o Biocarbón, el cual posee un alto potencial como fertilizante en la agricultura (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Los biofertilizantes a base de algas ha ido aumentando desde el año 2015. Se ha utilizado como modelo *Chlorella sp.* y se ha observado que las especies de *Anabaena* han mostrado la capacidad de promover la fertilidad del suelo (Win *et al.*, 2018).

### **3. Aceites (Fuente como materia prima)**

Contienen entre 25-77% de aceites los cuales se pueden convertir en biocombustible, estos presentan una alternativa para los problemas ambientales como el aumento en las emisiones de dióxido de carbono (Al Hattab M, Ghaly A, 2015). Los aceites principales que se encuentran en las microalgas son ácidos grasos poliinsaturados especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA), araquidónico, aminoácidos y ácido docosahexaenoico (DHA, siglas en inglés) (Molina-Grima, Antonio, & Pérez, 1993). El 30% de la producción de las microalgas se utilizan para el consumo animal entre los cuales se encuentran gatos, perros, peces, aves ornamentales, caballos, vacas, toros, moluscos y crustáceos (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

### **E. Humedal artificial**

Es una zona que se encuentra en la superficie terrestre saturada de agua, regulada por factores climáticos y en constante interrelación con los seres vivos que se encuentran dentro de él. Realizan diferentes procesos físicos, químicos y biológicos, los cuales se basan en fitorremediación. Es una técnica que aprovecha la capacidad de las plantas para absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en suelo, aire, agua o sedimentos, como metales pesados (Romero, 2015). En estos humedales crecen y se desarrollan diferentes tipos de vegetales, animales y microorganismos adaptados a estas condiciones de inundaciones temporales o permanentes.

#### **1. Componentes**

Los principales componentes son (Shi; *et al*, 2011):

- Sustrato o materia granular: esto sirve de soporte a la vegetación y permite fijación de biopelícula bacteriana la cual interviene en los procesos de eliminación de contaminantes.
- Vegetación: se encuentra mayormente por macrófitas emergentes las cuales contribuyen a la oxigenación del sustrato, eliminación de nutrientes de absorción o extracción y al desarrollo del sustrato y la vegetación.
- Agua que tratar: esta circula por la vegetación y el sustrato.

#### **2. Funciones**

Las funciones de un humedal artificial son (Richardson, 1994):

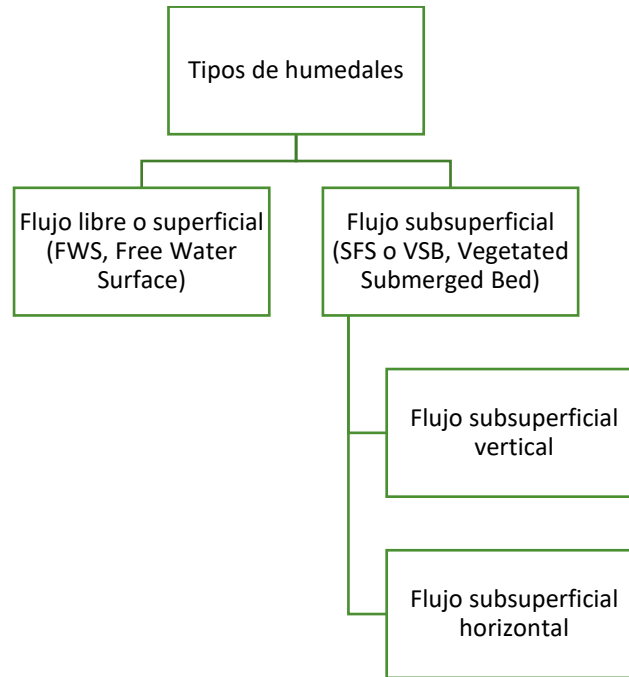
1. Fijar los contaminantes en la superficie de suelo y materia orgánica.
2. Utilizar y transformar los elementos por intermedio de los microorganismos.
3. Alcanzar los niveles de tratamiento de aguas residuales consistentes con un bajo consumo de energía y bajo mantenimiento.

4. Mejorar la calidad del agua.

### 3. Tipos de humedales

La Figura 5 muestra los diferentes tipos de humedales artificiales según el contacto del agua con la atmósfera:

Figura 5. Tipos de humedales artificiales según el flujo del agua

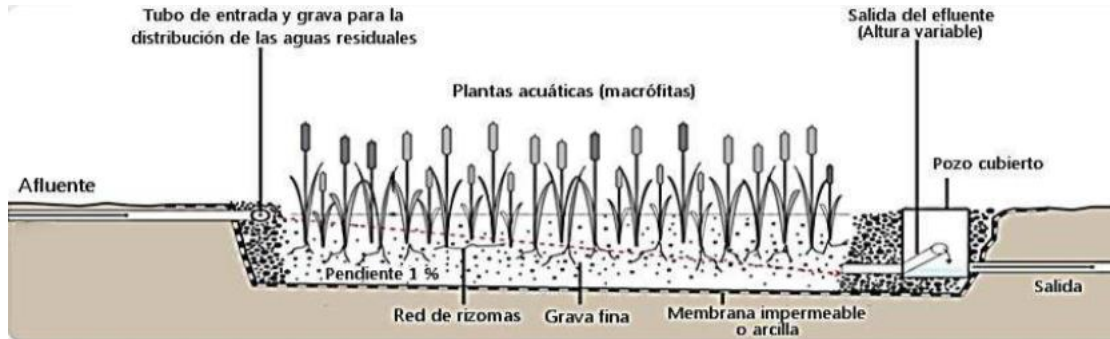


(Romero, 2015)

#### i. Humedal artificial de flujo subsuperficial horizontal

En el humedal artificial de flujo subsuperficial horizontal el agua circula horizontalmente a través del sustrato y de la vegetación de forma continua. Estos tienen una fase de tierra o arena al fondo la cual está recubierta por una membrana impermeable para evitar filtraciones del suelo y contiene macrófitas acuáticas (Romero, 2015). El agua residual para tratar es colocada en un extremo y es recogida por el tubo de drenaje que se encuentra en el otro extremo; esta se trata conforme esta fluye. Esta agua residual no entra directamente al sistema, sino que esta tiene un sistema de amortiguación generalmente por tierra/arena de mayor grosor (Salazar, 2015), según se observa en la Figura 6.

Figura 6. Humedal artificial de flujo subsuperficial horizontal.



(Salazar, 2015)

#### 4. Aplicaciones

Los humedales artificiales son utilizados para la mejora de la calidad de las aguas en ecosistemas naturales. Principalmente para aguas residuales de diferentes orígenes, entre ellos se mencionan a continuación (Hoffmann, Platzer, Winker, & Muench, 2011):

- Doméstico o municipal: Municipios urbanos y rurales, centros de salud, campamentos, instalaciones hoteleras, clubes deportivos, escuelas.
- Industrial: Refinerías, fábricas de productos químicos, de papel, curtiduría, textiles, destilerías, mataderos.
- Alimentario: Producción de leche, quesos, azúcares, conserveras.
- Piscifactorías: Cría de peces.
- Lixiviados de diferentes orígenes: Agrícolas, aeropuertos, autopistas, invernaderos, viveros, vertederos de basura.

#### F. Lago de Atitlán

El Lago de Atitlán se ubica en el departamento de Sololá, Guatemala. La cuenca del Lago tiene una superficie de  $541 \text{ km}^2$ , un perímetro de 118.5 Km y cuenta con cuatro sub-cuencas las cuales están formadas por los ríos Quiscab, Panajachel y la sub-cuenca Azul (Castillo & Edith, 2016).

##### 1. Características

La cuenca tiene un origen volcánico esto provoca que se tenga un 79% del suelo no apto para cultivos (Recinos & Ruiz, 2012). El Lago es altamente vulnerable y susceptible a los cambios en sus diferentes áreas de captación de agua por ser una cuenca endorreica, lo cual significa que es cerrada. Los departamentos (Totonicapán y El Quiché) que se encuentran alrededor de Sololá, son importantes debido a que estos tienen

un impacto directo para la degradación de los recursos naturales, por lo mismo es indispensable que tengan un manejo adecuado de sólidos y líquidos que se producen (AMSCLAE, 2017).

Por lo anterior, la cuenca fue declarada “Área protegida de Reserva de Uso Múltiple” por medio del decreto no. 64-97 del Congreso de la República y correspondió a que la cuenca está siendo degradada por lo tanto la recuperación y conservación de la calidad ambiental y ecológico, es importante (AMSCLAE, 2017).

## **2. Actualidad**

El Lago sufre diferentes problemas de contaminación entre los cuales se encuentran químicos, biológicos y físicos. Entre los químicos están los fertilizantes agrícolas, plaguicidas, jabones, detergentes, aceites, lubricantes y combustibles. En los biológicos se encuentran los desechos humanos y de animales domésticos, hospitalarios, plantas de tratamientos, entre otros y los físicos se encuentran desechos sólidos (Recinos & Ruiz, 2012).

## **3. Ecología**

Con el tiempo se han ido realizando diferentes estudios en los cuales se ha demostrado que en el Lago se ha ido degradando todo el ecosistema. En el año 2008, ocurrió la primera floración de cianobacterias principalmente por *Dolichospermum*, *Microcystis* y *Limnographis*; en el año 2009 ocurrió la segunda (AMSCLAE, 2017). Se ha tenido preocupación de estos microorganismos por el aumento de los florecimientos, por lo que esto ocasiona una reducción en el turismo, por lo tanto, la reducción de medios de subsistencia para las comunidades y los daños en la salud por las toxinas. Por lo mismo, se ha creado el proyecto financiado por la USAID llamado Unidos por el Lago de Atitlán, con el fin de documentar las condiciones actuales del Lago de Atitlán y así encontrar posibles soluciones (Sudeep Chandra, Margaret Dix, Eliška Rejmánková, Virginia Mosquera, 2013).

## **4. Toxinas producidas por cianobacterias**

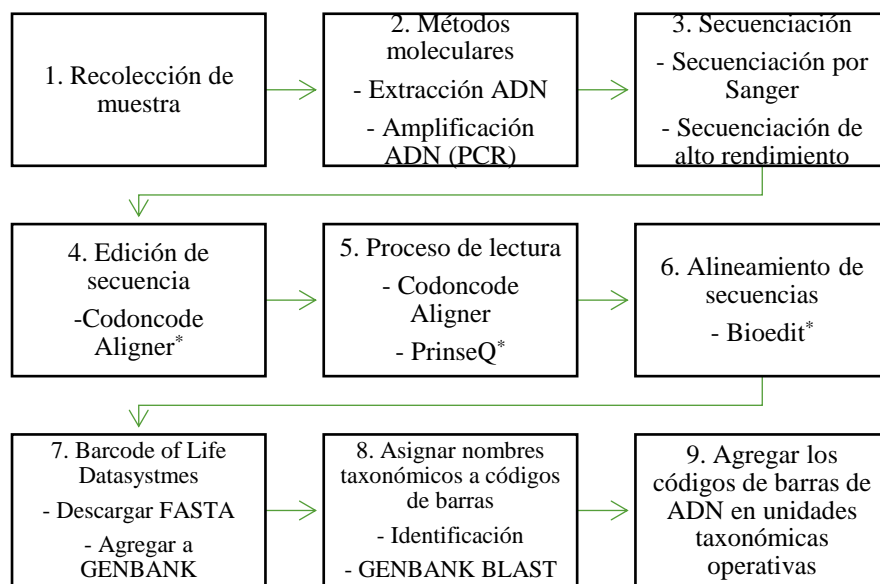
En la mayoría de los ambientes acuáticos se puede encontrar toxinas producidas por cepas de cianobacterias de varias especies. Según *Whitman et al.* (1998), la mayoría de las procariotas se encuentran en aguas saladas y dulces, especialmente las cianobacterias autótrofas. Estas han sido uno de los principales filos procarióticos que han colonizado varios hábitats tales como aguas frescas, salobres, marinas, termales, hipersalinos, suelos y desiertos. La única limitante para el crecimiento de estas es el pH ya que tiene a preferir condiciones neutras o básicas. La presencia de toxinas tiene un impacto ambiental, salud humana y animal, turismo, recreación y acuicultura. Entre las toxinas que se presentan comúnmente son: hepatoxinas (microcistina y nodularina), cilindrospermopsina, nodularin, neurotoxinas, antoxinas y saxitoxina. Estas pueden ser producidas por procariotas en particular las cianobacterias estas representan uno de los principales

filamentos bacterianos que exhiben las características generales de bacterias Gram-negativo entre estas se encuentran *Microcystis*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Snowella* y *Woronichinia* (Valério, Chaves, & Tenreiro, 2010)

## **G. Código de barras de ADN**

El código de barras (*DNA barcoding*, en inglés) es una herramienta que se ha utilizado para la identificación de especies basada en secuencia de ADN, esta técnica compara toda la estructura del genoma y expresión. Estos códigos de barras de ADN consisten en un estándar de secuencias cortas de ADN (400-800pb) que al inicio se deben de generar y caracterizar fácilmente para todas las especies del mundo. Los criterios que se debe de cumplir para la elaboración de un código de barras de ADN son: contener una genética significativa a nivel de especie y divergencia, poseer sitios flanqueantes conservados para el desarrollo de cebadores universales de PCR para su amplia aplicación taxonómica y tener una longitud corta de secuencia para facilitar las capacidades actuales de extracción de ADN y amplificación (Kress & Erickson, 2008). Al usar el código de barras de ADN, se refiere al uso de secuencias de ADN cortas y estandarizadas como marcadores para el reconocimiento de especies. Para realizar un trabajo de bioinformática de código de barras de ADN se debe de seguir un flujo de trabajo (ver Figura 8) para producir productos con representación limpia y confiable para obtener información sobre la taxonomía de la muestra desconocida por medio de algoritmos que permiten la comparación de secuencias de ADN junto con bibliotecas de secuencias de ADN. Es importante realizar una biblioteca completa antes de la exploración de códigos de barras de ADN para el reconocimiento de especies (Wilson, Sing, & Jaturas, 2019). Los programas \*Codoncode Aligner, PrinseQ y Bioedit son programas utilizados para el análisis de secuencias de los genomas.

Figura 7. Flujo de trabajo para código de barras para ADN



(Wilson *et al.*, 2019)

## H. Extracción de ADN

El objetivo de extracción de ADN es separarlo de proteínas, membranas y otro material celular contenido de la célula que se extrae. Este proceso se requiere un manejo cuidadoso del material biológico para evitar contaminación y el entrecruzamiento con otro ADN. Los diferentes procedimientos tienen tres pasos básicos: lisar las células, separar el ADN de los componentes celulares, aislar el ADN y precipitar con un alcohol (Elkins, 2013).

El método de extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico se basa en la solubilidad del ADN, proteínas y lípidos en solventes orgánicos. Es útil para la extracción de ADN de pequeños volúmenes (<0.4mL) a concentraciones  $\leq 1$  mg/mL (Richlen & Barber, 2005). Los reactivos cumplen ciertas funciones: fenol desnaturaliza las proteínas y estas se encuentran en la interfaz entre lo acuoso y lo orgánico, el cloroformo estabiliza las fases y el alcohol isoamílico evita la formación de espuma en la mezcla y ayuda en la separación de las fases orgánicas y acuosas. Por lo tanto la combinación de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico es utilizado para la eliminación de contaminantes proteicos y en la estabilización. Por otro lado, la enzima proteinasa K ayuda en la digestión de proteínas, incluyendo las nucleasas. Isopropanol contribuye a la precipitación de ADN. El ADN se sedimenta después de la etapa de precipitación, se lava con etanol al 70% para eliminar sales y pequeñas moléculas orgánicas y se debe de resuspender en tampón a una concentración adecuada (Moore, 1998).

Posterior a la extracción de ADN es necesario realizar una cuantificación del material genético, esto se puede realizar por medio de un espectrofotómetro el cual usa la absorbancia/transmisión de luz a través de

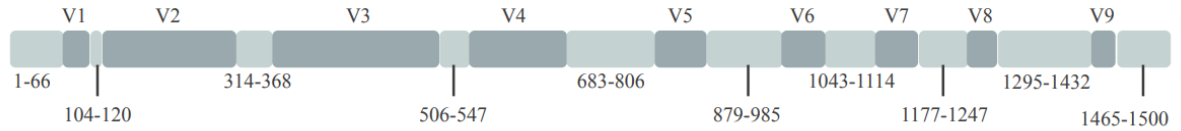
un líquido para determinar la concentración de la muestra que se está analizando. Las moléculas absorben diferentes longitudes de onda de luz en diversos grados y la mayoría tiene una longitud de onda específica que absorben al máximo. Al medir la absorbancia de la muestra se puede estimar la concentración de una muestra. Para medir con precisión la concentración de una sustancia en función de su absorbancia, se debe conocer la longitud de onda de la luz que la muestra absorbe al máximo. En el caso de ADN y ARN, la absorbancia máxima es de 260nm. La proteína absorbe al máximo a 280nm y la proporción de ácido nucleico a proteína (260/280) se usa generalmente como un indicador de la pureza de las muestras de ADN (Pachchigar, Khunt, & Hetal, 2011). Otra técnica para la cuantificación de ADN es por fluorometría, la cual se basa en los estados vibracionales y electrónicos de las moléculas. Primero la muestra se excita mediante la absorción de un fotón de luz y luego la molécula desciende luego a los distintos niveles de vibración del estado basal, emitiendo un fotón en el proceso y así se crea la fluorescencia que es detectada por el quipo (Promega Corporation, 2017).

## **I. Marcadores universales 16S y 18S**

El ARN ribosomal 16S (ARNr) es un componente de la subunidad pequeña 30S de los ribosomas de las células procariontas. Los genes del ARN 16S han sido clasificados como objetivos para estudios filogenéticos y taxonomía bacteriana debido a que se encuentra una copia al menos en su genoma y en el genoma mitocondrial (Arena-Ortiz & Chiappa-Carrera, 2017). La región variante, V1-V9, de los genes 16 ARNr (ADNr) se han utilizado para la identificación de especies (Baker, Smith, & Cowan, 2003). Para los ADNr 16S, los cebadores (15–20 nucleótidos (nt)) están ubicados en las regiones conservadoras que flanquean una región objetivo utilizado para el análisis filogenético. Los primeros conjuntos de cebadores fueron diseñados mediante el uso de regiones conservadoras de secuencias de ADNr 16S de diferentes especies y fueron nombrados de acuerdo con sus posiciones en *Escherichia coli* 16S ADNr (Wang & Qian, 2009).

El ARNr 18S es el centro activo de síntesis de proteínas en la subunidad ribosómica 40S. El aumento de la cantidad de ribosomas, conlleva a aumentos en la cantidad de ARN por lo tanto la transcripción y síntesis de proteínas son proporcional a los aumentos en 18S ARNr (Hayashi, 2014). El ARNr se encuentra presente en todas las células vivas con una función altamente conservada y hay algunas diferencias entre secuencias en eucariotas en comparación con procariontas. En procariontas, la región V6 ha sido considerada la región más variable por lo tanto ha sido adecuada para estudios de biodiversidad en procariontas, pero esta región está más conservada en eucariotas y por lo tanto se evita. Por otro lado, la región V4 es la región variable para eucariotas. En diversos estudios han aplicado esta región en evaluaciones de la composición de comunidades de microorganismos. Para estudios de diversidad eucariota han sugerido que las regiones variables, siendo V4 y V9 los mejores candidatos (Hadziavdic *et al.*, 2014). Los números de la Figura 8 indican las posiciones de inicio y fin de las regiones variables.

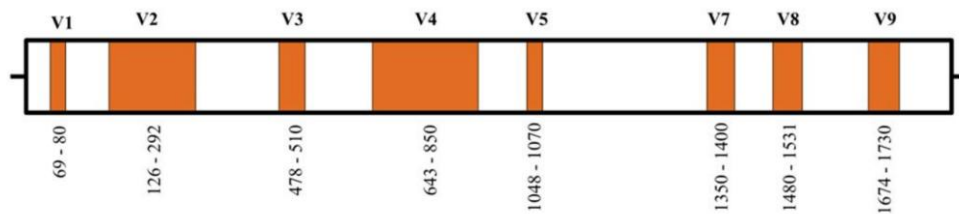
Figura 8. Representación del gen ARNr 16S de las 9 regiones conservadas (V1-V9). Corresponden a la secuencia del genoma de *Escherichia coli*



(Arena-Ortiz & Chiappa-Carrera, 2017)

Los números de la Figura 9 indican las posiciones de inicio y fin de las regiones variables.

Figura 9. Representación del gen ARNr 18S de las 9 regiones conservadas (V1-V9). Corresponden a la secuencia de *S. cerevisiae*



(Reich & Labes, 2017)

Cuadro 2. Marcadores universales 16S y 18S que se probaron en este estudio

Cebadores	Marcadores universales	Secuencia	Referencia
EK82_F Proto5_R	18S	GAAACTGCGAATGGCTC GACGGGCGGTGTGTAC	(Auinger, Pfandl, & Boenigk, 2008)
V4_F V4_R	18S	CCAGCASCYCGGTAATTCC ACTTTCGTTCTTGAT	(Bradley, Pinto, & Guest, 2016)
27_F 1492_R	16S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGTACCTTGTACGACTT	(De Lillo et al., 2006)

## 1. Reacción en cadena de la polimerasa

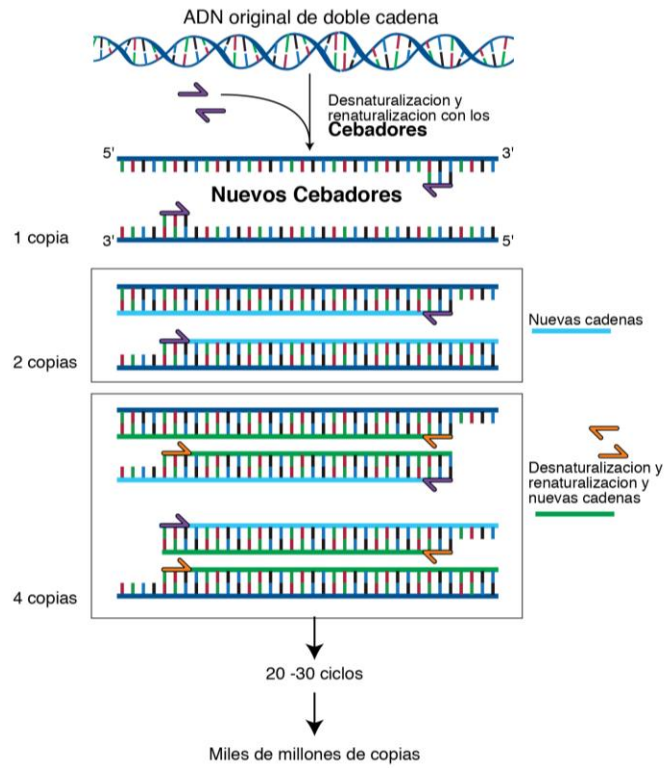
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es un ensayo enzimático, que permite la amplificación de un fragmento de ADN específico en un complejo de ADN. Mullis (1990) declaró que el ensayo de PCR “permite elegir el fragmento de ADN de interés y tener tanto como uno quiera”. Para realizar PCR se puede utilizar variedad de tejidos y organismos. Lo que se requiere son cantidades pequeñas de ADN para que la PCR realice suficientes copias para analizar con métodos convencionales de laboratorio (Bruns, Ashwood, & Burtis, 2007).

Para cada ensayo de PCR se requiere la presencia de molde de ADN, cebadores, nucleótidos y ADN polimerasa. La ADN polimerasa es una enzima clave que une los nucleótidos individuales, las cuales son las cuatro bases: adenina, timina, citosina y guanina (A, T, C, G), que se encuentran en el ADN. Estos actúan como bloques de construcción que utiliza la ADN polimerasa para crear el producto de PCR resultante (Terpe, 2013). Los cebadores en la reacción especifican el producto de ADN exacto a amplificar. Los cebadores son fragmentos de ADN cortos con una secuencia definida complementaria al ADN objetivo que al ser detectado y amplificado sirven como un punto de extensión para que la ADN polimerasa pueda construir. Los componentes mencionados anteriormente se mezclan en un tubo de ensayo o en una placa de 96 pocillos y luego se colocan en un termociclador el cual permite hacer ciclos repetitivos de amplificación de ADN en tres pasos básicos (Garibyan & Avashia, 2013).

La solución de reacción se calienta primero por encima del punto de fusión de las dos cadenas de ADN complementarias del ADN objetivo, que permite que las cadenas se separen, un proceso llamado desnaturalización. Luego se baja la temperatura para permitir que los cebadores específicos se unan a los segmentos de ADN objetivo, un proceso conocido como hibridación o recocido. Recocido entre los cebadores y el ADN objetivo ocurre solo si son complementarios en secuencia, La temperatura se eleva nuevamente, en ese momento la ADN polimerasa es capaz de extender los cebadores agregando nucleótidos a la cadena de ADN en desarrollo (ver Figura 10). Con cada repetición de estos tres pasos, el número de moléculas de ADN copiadas se duplica (Sforza, Simionato, Giacometti, Bertucco, & Morosinotto, 2012).

Los resultados de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa se visualizan en electroforesis en gel. Esta es una técnica que se utiliza una corriente eléctrica que impulsa los fragmentos de ADN a través de una matriz en gel y los fragmentos de ADN se separan según su tamaño. Se debe de incluir un estándar o un marcador de peso molecular para determinar el tamaño de los fragmentos de la muestra de PCR. Estos fragmentos de ADN de la misma longitud forman una banda en el gel que se puede identificar a simple vista al teñir el gel con un pigmento que se intercala en el ADN, este puede ser bromuro de etidio o GelRed (Lee, Costumbrado, Hsu, & Kim, 2012).

Figura 10. Diagrama del proceso de la reacción en cadena de la polimerasa



(Loftus, 2015)

## VI. ANTECEDENTES

La investigación de microalgas ha ido incrementando en los últimos años ya que estas constituyen una fuente sostenible de biomasa para la producción de biofertilizantes, biombustibles, alimento, entre otros. Desde 1975, estos microorganismos han sido de mucha importancia en áreas de bioproductos y ecología química. Aproximadamente 500 especies de algas son utilizadas como complementos alimenticios humanos, y cerca de 160 especies son comercialmente valiosas. Desde 1,979 en India se ha utilizado microalgas para el uso de fertilizantes en donde realizan un inóculo mixto el cual es secado y mezclado con el suelo en cultivos de arroz (Braida *et al.*, 2015).

Se ha encontrado que las microalgas tienen capacidad fitorremediadora lo cual consiste en la eliminación o biotransformación de contaminantes de un medio. Los compuestos son captados por la biomasa algal y pueden ser recuperados por su cosecha, teniendo como objetivo la eliminación de contaminantes y producción de biomasa con fines comerciales. La biomasa de estos microorganismos a lo largo del tiempo ha proporcionado productos biotecnológicos con usos en la industria alimenticia, salud y medicina humana, alimentos para animales y biocombustibles. Por lo anterior, es importante el uso de microalgas para los problemas ambientales existentes en todo el mundo en la actualidad (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

En Guatemala en el año 2,009 el Instituto de Recursos Energéticos de la Universidad Galileo evaluó el porcentaje de aceites y ácidos grasos de microalgas que se encuentran en el Lago de Amatitlán por medio de la formación de biomasa para producción de biodiesel y se encontró que las óptimas son los aceites de *Chlorella sp.* y *Monoraphidium griffithii* (Díaz, 2011). En el año 2015, se estudió si la microalga *Chorella vulgaris* encontrada también en el Lago de Amatitlán era óptima para la obtención de ácidos grasos con el interés alimentario y se encontraron presencia de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados para consumo alimenticio (Brisset *et al.*, 2018). En el año 2013 se realizó un estudio en el Lago de Atilán el cual consistía determinar las variaciones espaciales y temporales de fitoplancton en función de las variables temperatura y concentración de nutrientes en los diferentes sitios de lago, y se concluyó que los primeros meses del año se encontraba mayor diversidad de microorganismos. Las especies dominantes para el periodo de tiempo del estudio fueron *Aulacoseira granulata* (*Bacillariophyta*), *Coelastrum sp.* (*Chlorophyta*) y *Limnorphis robusta* (Ochaeta, 2014). Para completar estudios previos se elaboró la optimización de extracción de ADN y su amplificación de los marcadores 16S y 18S para su posterior análisis de código de barras de ADN (*DNA barcoding*) para funciones taxonómicas y evaluar su potencial como materias primas sustitutas de bajo costo e impacto ambiental.

## **VII. METODOLOGÍA**

### **A. Sitio de estudio**

El estudio se realizó en dos cuerpos de agua de origen artificial y natural. El cuerpo de agua natural fue el Lago de Atitlán exactamente en Panajachel, ubicado en el Departamento de Sololá, Guatemala. El cuerpo de agua artificial fue un humedal ubicado en Sanarate, El Progreso.

### **B. Sujetos de estudio**

Microrganismos eucariotas y procariotas en muestras de agua de ambos cuerpos de agua de origen natural y artificial.

### **C. Diseño, enfoque y tipo de investigación**

La investigación fue de diseño no experimental transversal debido a que no se realizaron cambios intencionales en las variables independientes para evaluar su efecto en las variables dependientes. El diseño de este estudio fue experimental con enfoque cualitativo.

### **D. Tipo y tamaño de muestra**

Se utilizaron muestras de agua de dos diferentes cuerpos de agua (artificial y natural). El tamaño de muestra total fue de 17 muestras, las cuales se dividieron en 11 muestras del cuerpo de agua natural y 6 muestras del cuerpo de agua artificial. Los muestreos se realizaron en los meses de julio (artificial) y septiembre (natural). Los 6 puntos del cuerpo de agua natural se tomaron de la siguiente manera: 2 puntos en entradas de aguas residuales, 2 puntos medios y 2 puntos en la salida de agua; con el fin de observar alguna diferencia de microorganismos en los diferentes puntos. El tipo de muestreo del estudio fue no probabilístico por conveniencia.

## E. Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión para el estudio son aquellos cuerpos de agua dulce y que el agua no sea en corriente como, por ejemplo: lagunas, lagos, estanques, etc.

Los criterios de exclusión son todos aquellos cuerpos de agua salado y agua como lo son ríos y océanos.

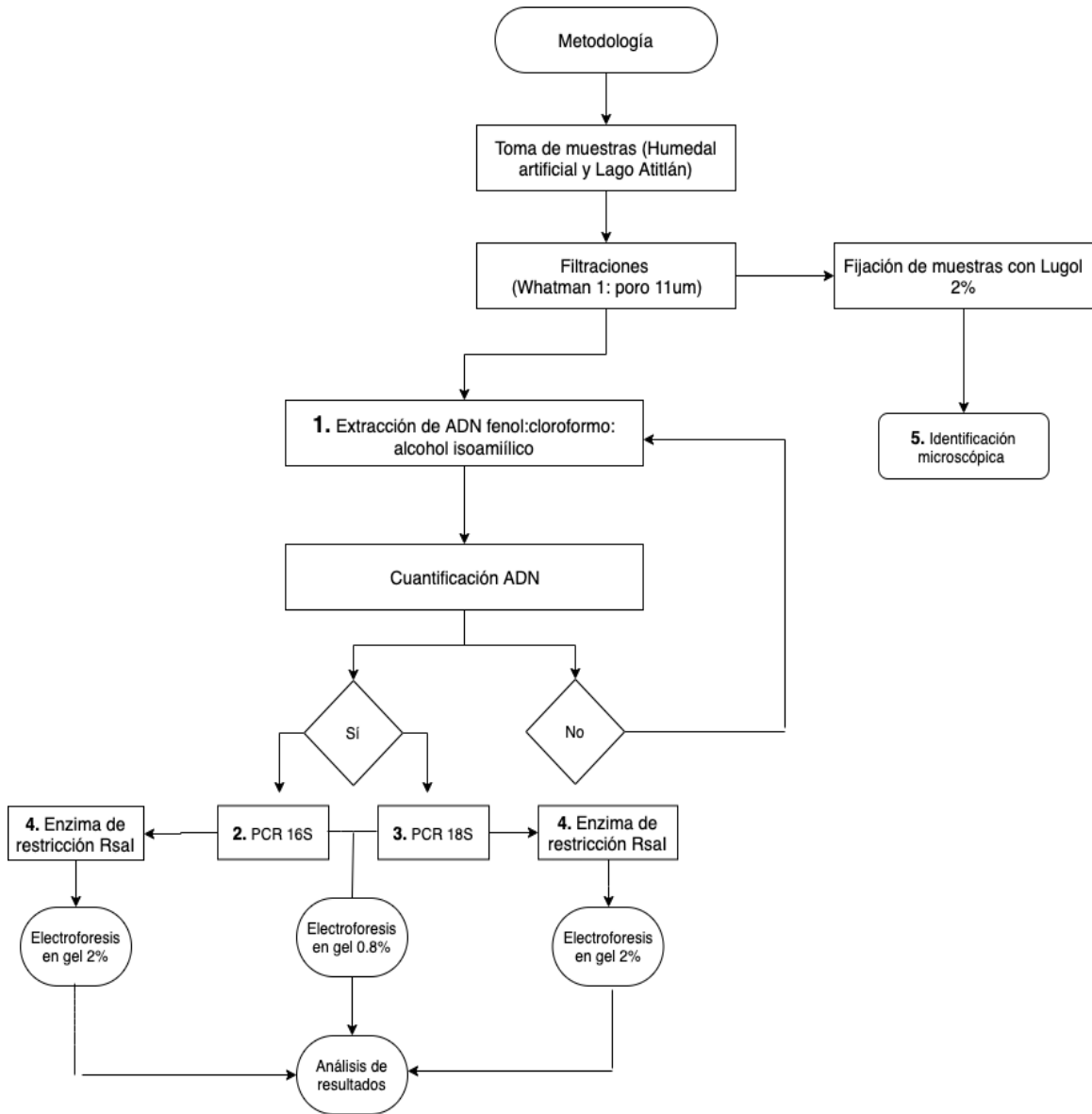
## F. Variables (conceptualización y operacionalización)

Cuadro 3. Variables dependientes e independientes

Número de variable	Variable	Definición	Naturaleza	Interrelación	Unidades de medición
1	Concentración de ADN	Cantidad de ADN genómico en un determinado volumen	Cuantitativa	Dependiente	$\mu g/mL$
2	Presencia o ausencia de bandas en gel de agarosa 0.8%	Productos de PCR utilizando cebadores específicos	Cualitativa	Dependiente	pb
3	Volumen de muestra	Cantidad de microorganismos	Cuantitativa	Independiente	mL
4	Patrón enzima de restricción	Productos de PCR utilizando enzima de restricción RsaI	Cualitativa	Dependiente	pb

## G. Metodología

Figura 11. Flujo de trabajo (Los números corresponden a los objetivos específicos)



## H. Toma de muestra Lago Atitlán y Humedal artificial

El proceso de toma de muestra se llevó a cabo en dos diferentes cuerpos de agua para los cuales se tomaron en botes autoclaveables 300mL de muestra en los puntos asignados según la técnica descrita en el Procedimiento de Operación Estándar No. 1 (POE No. 1-9.3) que se encuentra en la sección de Anexos. En el humedal artificial ubicado en Sanarate se tomaron 6 puntos, se sujetó la botella con una mano y con la otra

se retiró la tapa, se lavó varias veces la botella antes de tomar la muestra final, se invirtió la botella completamente y se sumergió a una profundidad de 0.2m por debajo de la superficie y se giró hacia arriba y hacia la corriente, al estar llena se retiró y se volvió a colocar la tapa. Por otro lado, para el procedimiento de toma de muestra del Lago de Atitlán se siguió el Protocolo establecido por los Laboratorios de Análisis y Monitoreo, Centro de Estudios Atitlán de la Universidad del Valle de Guatemala Altiplano el cual consistió en utilizar botella Van Dorn para sumergirla a distintas profundidades en el centro del Lago, en cada toma de muestra se necesitó lavar 3 veces el bote antes de tomar la muestra definitiva. Para la toma de muestra de la superficie se llenó el bote sumergiéndolo lateralmente con la boca en dirección de la corriente. Las muestras se almacenaron en hielera y se transportaron a 4°C aproximadamente para su posterior análisis. Se siguió el procedimiento del POE No. 1-9.2 que se encuentra en la sección de Anexos.

Para la preservación de muestras se colocaron en tubos falcon® 50mL de muestra, se filtraron con Whatman 1 (poro 11um) y entre cada muestra se lavó el embudo con etanol 70%, cloro y agua estéril. Se centrifugó a 15,000rpm por 15 minutos, a unas de las muestras se agregó RNAlater según el peso y se almacenó a 4°C por 24 horas para la extracción de ADN. Las demás muestras se congelaron a -20°C hasta su posterior uso.

## **I. Extracción de ADN**

El proceso de extracción de ADN genómico se llevó a cabo con las muestras de los diferentes cuerpos de agua. Para el cuerpo de agua artificial se extrajo ADN en muestras frescas y congeladas, en cambio, para el cuerpo de agua natural se extrajo ADN en muestras frescas. El procedimiento de extracción fue optimizado en las diferentes fases de los métodos convencionales de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico siguiendo los pasos del POE No.2 que se encuentra en la sección de Anexos. Se utilizó buffer de lisis CTAB con 0.2%  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma Aldrich) y proteinasa K, se centrifugó a 5,500rpm por 15 minutos se retiró sobrenadante y se agregó 1mL de buffer de lisis previamente preparado y se dejó digerir por 1 hora a 60°C. Se maceró con pistilo estéril y se añadió fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Merck) y se mezcló. Se realizó otra centrifugación a alta velocidad a 4°C por 10 minutos y se pasó sobrenadante a un tubo de 2mL, se añadió isopropanol frío y se dejó incubar por 1 hora a -20°C, se realizó una centrifugación a 4,000xg por 15 minutos y se realizaron lavados con etanol 70% al pellet y se realizó una última centrifugación a máxima velocidad a 4°C por 5 minutos y el pellet fue resuspendido en 50uL de TE (Promega). Se dejó una noche a 4°C y se midieron las concentraciones con NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific) (espectrofotometría) y QuantiFluor® One dsDNA System (fluorometría).

## J. Análisis de cebadores

El análisis de cebadores se realizó por medio de estudios previos para su elección y se analizaron por medio de la página NCBI (Primer-BLAST y SILVA). En donde se colocaron las secuencias de los cebadores y se seleccionó el organismo que se quiere analizar. Los parámetros que se tomaron en cuenta es la similitud, mayor número de entrada, temperatura, contenido GC y los organismos que este puede analizar.

Cuadro 4. Secuencia de cebadores utilizados en este estudio

Cebadores	Secuencia
EK82_F	GAAACTGCGAATGGCTC
Proto5_R	GACGGGCGGTGTGTAC
V4_F	CCAGCASCYGCGGTAATTCC
V4_R	ACTTTCGTTCTTGAT
27_F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492_R	GGTTACCTTGTTACGACTT

## K. PCR 16S ADN<sub>r</sub> y 18S ADN<sub>r</sub>

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el kit Plantinum<sup>TM</sup> II Hot-Start PCR Master Mix (2X) (Invitrogen) y se utilizó un marcador de peso molecular para determinar el tamaño de los fragmentos de 100pb (TrackIt). Se siguió el procedimiento de POE No.3 que se encuentra en la sección de Anexos. Los cebadores utilizados para 18S son V4\_F y V4\_R, EK82\_F y Proto5\_R para la PCR 16S se utilizaron cebadores universales (27\_F y 1492\_R) (ver Cuadro 4). Los productos se observaron en un gel de agarosa 0.8% de 6cm de largo el cual se corrió a 100v por 25min. La reacción de amplificación de cada cebador se realizó en termociclador siguiendo los siguientes programas:

Cuadro 5. Condiciones termociclador PCR 16S (27\_F y 1492\_R) y 18S (Ek82\_F y Proto5\_R)

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	1min	10
Alineamiento	52°C	1min	
Extensión	72°C	2min	
Extensión final	72°C	5min	1
Hold	4°C	∞	-

Cuadro 6. Condiciones termociclador PCR 18S cebadores V4\_F y V4\_R

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	30s	25
Alineamiento*	70°C	45s	
Extensión	72°C	10min	
Desnaturalización	94°C	30s	20
Alineamiento	50°C	45s	
Extensión	72°C	1min	
Extensión final	72°C	5min	1
Hold	4°C	∞	-

\*Alineamiento: Se bajo un 1°C en cada ciclo para cumplir los 25 ciclos.

#### L. Diseño de cebadores universales 18S

Se utilizaron secuencias de los programas de NCBI y SILVA para el alineamiento de 18S de microalgas eucariotas identificadas en la caracterización microscópica (sección G) en el programa CLC Sequence Viewer 7.7.1. Luego, el conceso de las secuencias se colocaron en Primer-BLAST para obtener los posibles cebadores y fueron analizados en Oligo-Analyzer.

#### M. Enzima de restricción RsaI para productos PCR 16S y 18S

Los productos de PCR 16S y 18S se les colocó 0.5uL de enzima de restricción RsaI y se incubaron por 2 horas a 37°C y 10 minutos a 4°C. Los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2%.

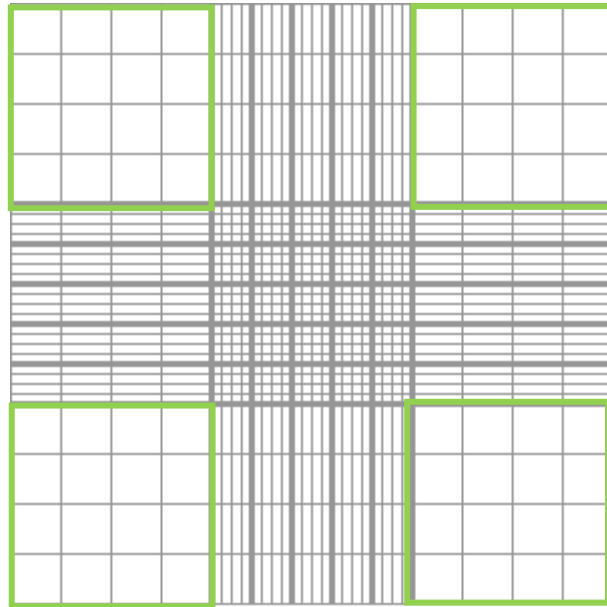
#### N. Caracterización microscópica

Las muestras de agua se fijaron con Lugol 2% para su caracterización microscópica y se siguió el procedimiento de POE No. 1-9.4. Para esto se prepararon tubos cónicos con 49mL de muestra y 1mL de Lugol para la conservación de plancton para su posterior análisis morfológico, se utilizaron diferentes guías para la identificación entre ellas se utilizaron: Guía práctica de identificación de Fitoplancton (AMSCLAE), Identification guide (Manaali Whenua Landcare Research) y el libro *Freshwater Algae* segunda edición (Bellinger, E & Sigee, D). Se observarán hasta aumento 100X.

## O. Conteo de células por cámara Neubauer

Las muestras fijadas con Lugol 2% se dejaron reposar durante 4 semanas aproximadamente, se les quitó el sobrenadante y se dejaron con 5mL. Se lavó la cámara Neubauer y el cubreobjeto con agua destilada y alcohol, se secaron con kimwipe, estos lavados se realizaron en cada muestra. Se puso el cubreobjeto encima de la cámara y se removió el cultivo para homogenizarlo y se tomaron 20uL de la muestra y se puso la punta de la pipeta en una de las ranuras de la cámara y, por capilaridad, las células se distribuyen en la cámara. Si se creaba en la cámara una burbuja de aire se debía repetir el procedimiento. Se colocó la cámara en el microscopio para realizar la observación, se contó en los cuadros grandes (ver Figura 10). Se observaron hasta aumento 10X.

Figura 12. Cuadros de cámara Neubauer (El conteo de células se realizó en los cuadros resaltados en verde)



$$\frac{(\# \text{ de células por cuadro}) * (\text{factor dilución})}{\text{Volumen muestra}} = \text{Total de células}$$

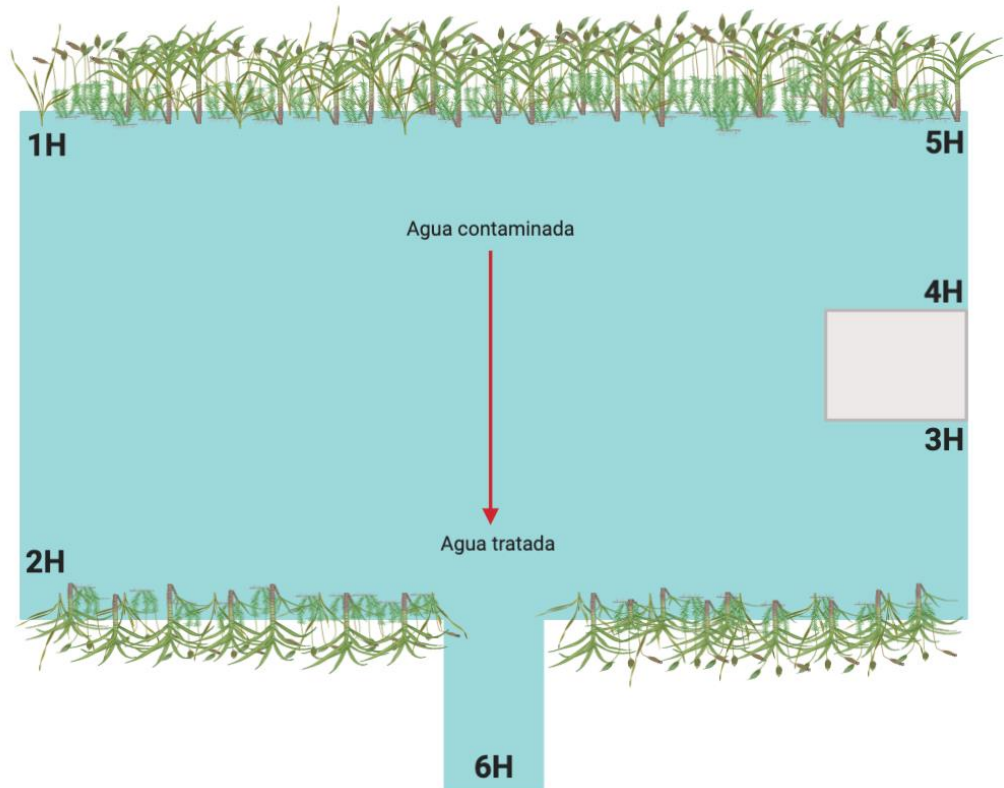
Ecuación 1. Fórmula para conteo de células

## VIII. RESULTADOS

### A. Toma de muestra-Puntos de muestreo

En la Figura 13, se observan los seis diferentes puntos de muestreo que se realizó en el humedal artificial en el mes de julio de 2019.

Figura 13. Diagrama del humedal artificial con la localización de los puntos de muestreo. H = humedal.



En la Figura 14, se observa las coordenadas del punto del Centro Weiss del Lago de Atitlán en donde se tomaron a 10 diferentes profundidades (0-300m) en el mes de septiembre de 2019.

Figura 14. Localización del centro Weiss muestreado en el Lago de Atitlán



### **B. Optimización del método de extracción de ADN por medio de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico de muestras frescas y congeladas de diferentes cuerpos de agua**

En los Cuadros 7 y 8, se presentan los valores de cuantificación del ADN con sus respectivas purezas en las diferentes muestras frescas de los dos diferentes cuerpos de agua, obtenidas mediante de la optimización del método de extracción de ADN por medio de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Las purezas adecuadas son A260/280 es aproximadamente 1.8 y el rango de A260/230 es de 2.0-2.1. Se encontró que el valor máximo fue para la muestra 1H del humedal artificial  $126.17 \pm 59.87 \text{ ng/mL}$  y el valor mínimo para la muestra a una profundidad de 100m del Lago de Atitlán  $1.77 \pm 1.07 \text{ ng/mL}$  mediante la cuantificación por espectrofotometría. Para la cuantificación con fluorometría se encontró que el valor máximo fue para la muestra 1H del humedal artificial  $4.6 \pm 1.94 \text{ ng/mL}$  y el valor mínimo para la muestra del Lago de Atitlán a 40m  $0.0060 \pm 0.0052 \text{ ng/mL}$ . Además, se presentan los valores correspondientes a la medición de las demás muestras por espectrofotometría y por fluorometría de cada una de las muestras. La extracción de las muestras congeladas del humedal artificial se realizó en duplicado con excepción para los puntos 3 y 4 debido a que no se tenía suficiente muestra.

Cuadro 7. Comparación de dos métodos de cuantificación de ADN por medio de espectrofotometría y fluorometría de muestras frescas del humedal artificial.

Identificación de muestras	Concentración fluorometría	Concentración espectrofotometría	Pureza	
	(ng/uL)	(ng/uL)	A260/280	A260/230
1H*	4.6±1.94	126.17±59.87	1.52±0.09	1.53±0.86
2H*	4.3±3.76	56.07±4.50	1.66±0.03	2.50±0.57
3H*	0.5±0.45	27.67±2.63	1.40±0.05	3.65±1.57
Ac1H	0.7±1.01	7.73±2.30	1.93±0.24	0.68±4.44
Ac2H	3.9±2.98	11.23±3.53	2.11±0.46	0.42±2.06
Ac3H	1.3±0.83	11.57±3.78	2.24±0.20	4.32±3.08

\*1H, 2H, 3H corresponden a los puntos de muestreo en el humedal artificial (ver Figura 12). Se obtuvo Ac1H, Ac2H, Ac3H debido a que en las muestras originales se obtuvo una concentración alta de ADN. Por lo que éstas se diluyeron con buffer TE y se centrifugaron, la parte acuosa se separó y se colocaron en tubos nuevos. En donde, Ac: Acuosa, ±: desviación estándar, A: Absorbancia, 260/280: Contaminación por proteínas o fenol residual, 260/230: Residuos de fenol o carbohidrato. Concentración por fluorometría se realizó por QuantiFluor® One dsDNA System y espectrofotometría por NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific). Además, se presentan los valores de pureza medidos por NanoDrop™.

Cuadro 8. Comparación de dos métodos de cuantificación de ADN por medio de espectrofotometría y fluorometría de muestras frescas del centro de Lago Atitlán a distintas profundidades.

Identificación de muestras	Concentración fluorometría	Concentración espectrofotometría	Pureza	
	(ng/uL)	(ng/uL)	A260/280	A260/230
L.1	0.0075±0.0061	2.30±0.75	1.86±0.46	0.78±0.13
L.2	0.0213±0.0100	24.37±0.47	1.31±0.02	1.12±0.03
L.3	0.0122±0.0065	7.63±0.21	1.38±0.04	0.93±0.02
L.4	0.0253±0.0209	55.80±11.26	1.44±0.15	0.74±0.42
L.5	0.0060±0.0052	7.90±0.30	1.36±0.04	3.15±0.59
L.6	0.0635±0.0771	3.07±1.85	1.92±0.28	0.35±0.08
L.7	0.0665±0.0327	72.40±0.26	1.30±0.01	1.29±0.02
L.8	0.0441±0.0106	33.77±0.31	1.38±0.01	1.00±0.01
L.9	0.0193±0.0130	1.77±1.07	1.74±0.50	5.23±3.52
L.10	0.0391±0.0328	53.87±0.12	1.35±0.01	1.12±0.01
L.11	0.0167±0.0136	37.23±0.32	1.30±0.01	1.51±0.02
A1*	0.0279±0.0112	3.07±1.18	1.89±0.83	0.46±0.11

\*En donde A1 corresponde al blanco del método de extracción,  $\pm$ : desviación estándar, A: Absorbancia, 260/280: Contaminación por proteínas o fenol residual, 260/230: Residuos de fenol o carbohidrato. Concentración por fluorometría se realizó por QuantiFluor® One dsDNA System y espectrofotometría por NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific), L.1: 0m, L.2: 10m, L.3: 20m, L.4: 30m, L.5: 40m, L.6: 50m, L.7: 60m, L.8: 80m, L.9: 100m, L.10: 200m y L.11: 300m. Además, se presentan los valores de pureza medidos por NanoDrop™.

En el Cuadro 9, se presentan los valores de cuantificación del ADN con sus respectivas purzas en las diferentes muestras congeladas del humedal artificial, obtenidas mediante de la optimización del método de extracción de ADN por medio de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se encontró que el valor máximo fue para la muestra 1A  $334.50 \pm 0.92 \text{ ng/mL}$  y el valor mínimo para la muestra 6A  $25.17 \pm 0.32 \text{ ng/mL}$  para la cuantificación con Nanodrop. Para la cuantificación por fluometría se encontró que el valor máximo fue para la muestra 4A  $4.31 \pm 2.11 \text{ ng/mL}$  y el valor mínimo para la muestra 1A y 5B  $0.30 \pm 0.22 \text{ ng/mL}$ . Además, se presentan los valores correspondientes a la medición de las demás muestras por espectrofotometría y por fluorometría de cada una de las muestras.

Cuadro 9. Comparación de dos métodos de cuantificación de ADN por medio de espectrofotometría y fluorometría de muestras congeladas de humedal artificial.

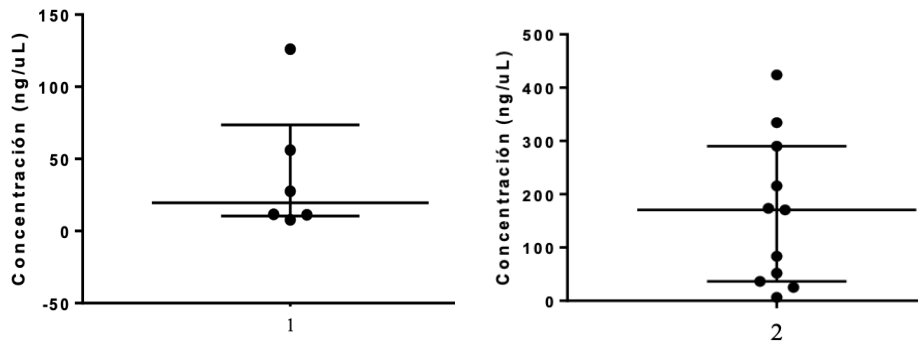
Identificación de muestras	Concentración fluorometría	Concentración espectrofotometría	Pureza	
	(ng/uL)	(ng/uL)	A260/280	A260/230
1AH*	$0.68 \pm 0.11$	$334.50 \pm 0.92$	$1.51 \pm 0$	$2.05 \pm 0$
1BH*	$0.30 \pm 0.22$	$215.83 \pm 0.75$	$1.45 \pm 0.01$	$1.87 \pm 0.01$
2AH*	$0.68 \pm 0.05$	$424.10 \pm 4.07$	$1.6 \pm 0.01$	$1.90 \pm 0.11$
2BH*	$0.36 \pm 0.06$	$290.03 \pm 121.56$	$1.51 \pm 0.09$	$1.82 \pm 0.02$
3AH*	$1.42 \pm 0.52$	$170.73 \pm 0.32$	$1.49 \pm 0$	$1.73 \pm 0.04$
4AH*	$4.31 \pm 2.11$	$83.60 \pm 0.10$	$1.85 \pm 0.03$	$2.30 \pm 0.03$
5AH*	$0.64 \pm 0.09$	$173.50 \pm 0.52$	$1.41 \pm 0.01$	$2.04 \pm 0.02$
5BH*	$0.30 \pm 0.04$	$36.43 \pm 0.46$	$1.34 \pm 0.01$	$2.0 \pm 0.04$
6AH*	$0.68 \pm 0.08$	$25.17 \pm 0.32$	$1.47 \pm 0.02$	$2.91 \pm 0.08$
6BH*	$0.41 \pm 0.29$	$51.77 \pm 0.67$	$1.41 \pm 0.01$	$2.38 \pm 0.13$
Blanco	$0.09 \pm 0.08$	$6.47 \pm 0.06$	$1.33 \pm 0.04$	$5.85 \pm 12.41$

\*En donde Blanco corresponde al blanco del método de extracción. Las extracciones se realizaron en duplicado. A representa la primera extracción y B la segunda extracción.  $\pm$ : desviación estándar, A: Absorbancia, 260/280: Contaminación por proteínas o fenol residual, 260/230: Residuos de fenol o carbohidrato. Concentración por fluorometría se realizó por QuantiFluor® One dsDNA System y

espectrofotometría por NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific). Además, se presentan los valores de pureza medidos por NanoDrop™.

En la Figura 15, se presenta la variación de los valores de concentración según la cuantificación por medio de espectrofotometría en muestras frescas y congeladas por medio de un diagrama de caja y bigote. Se observa en las muestras frescas menor variación en la cuantificación de ADN en cambio en las muestras congeladas se puede observar mayor variación en los datos y se puede observar datos atípicos. Sin embargo, se observó que las muestras congeladas tienen una mayor concentración con una media de  $164.74 \pm 139.59$  ng/mL que las frescas que tiene una media de  $40.07 \pm 45.85$  ng/mL.

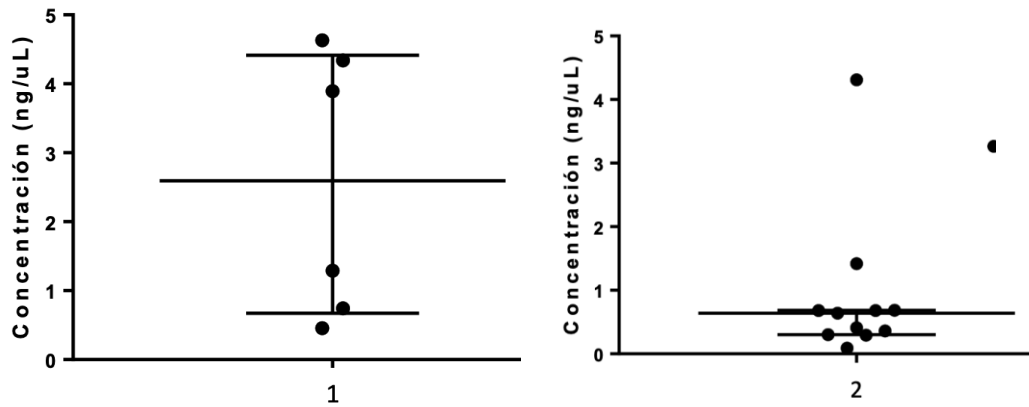
Figura 15. Diagrama de dispersión de cuantificación por medio de espectrofotometría en muestras frescas y congeladas del humedal artificial.



1: Muestras frescas 2: Muestras congeladas

En la Figura 16, se presenta la variación de los valores de concentración según la cuantificación por medio de fluorometría en muestras frescas y congeladas por medio de un diagrama de caja y bigote. Se observa en las muestras frescas menor variación en la cuantificación de ADN en cambio en las muestras congeladas se puede observar mayor variación en los datos y se puede observar datos atípicos. Sin embargo, se observó que las muestras congeladas tienen una mayor concentración con una media de  $0.99 \pm 1.18$  ng/mL que las frescas tiene una muestra media de  $2.56 \pm 1.93$  ng/mL. Además, se puede observar que los datos se encuentran debajo de la mediana y en las muestras congeladas se encuentran tres datos atípicos.

Figura 16. Diagrama de dispersión de cuantificación por medio de fluorometría en muestras frescas y congeladas del humedal artificial.



1: Muestras frescas 2: Muestras congeladas

Se decidió realizar la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis para determinar si existía una diferencia significativa entre las muestras frescas y congeladas. Se escogió esta prueba debido a que los datos no presentaban normalidad ni varianza constante. En los Cuadros 10 y 11 se presentan los resultados obtenidos en la prueba estadística.

Cuadro 10. Prueba estadística Kruskal-Wallis para muestras frescas y congeladas.

Kruskal-Wallis	Valor p
Muestras frescas y congeladas	6.467e-06

Hipótesis:

- Ho: Todas las muestras provienen de la misma población (distribución).
- Ha: Al menos una muestra proviene de una población con una distribución distinta.

Debido a que el valor p es menor a alfa (0.05) se rechaza Ho, por lo que se puede concluir que al menos una muestra proviene de una población con una distribución distinta.

Cuadro 11. Prueba Post-Hoc

Métodos	Valor p
1 y 4*	0.0040
2 y 3*	0.0043
3 y 4*	0.0004

\*1= Muestras frescas cuantificadas por espectrofotometría, 2= Muestras frescas cuantificadas por fluorometría, 3= Muestras congeladas cuantificadas por espectrofotometría, 4= Muestras congeladas cuantificadas por fluorometría.

Hipótesis:

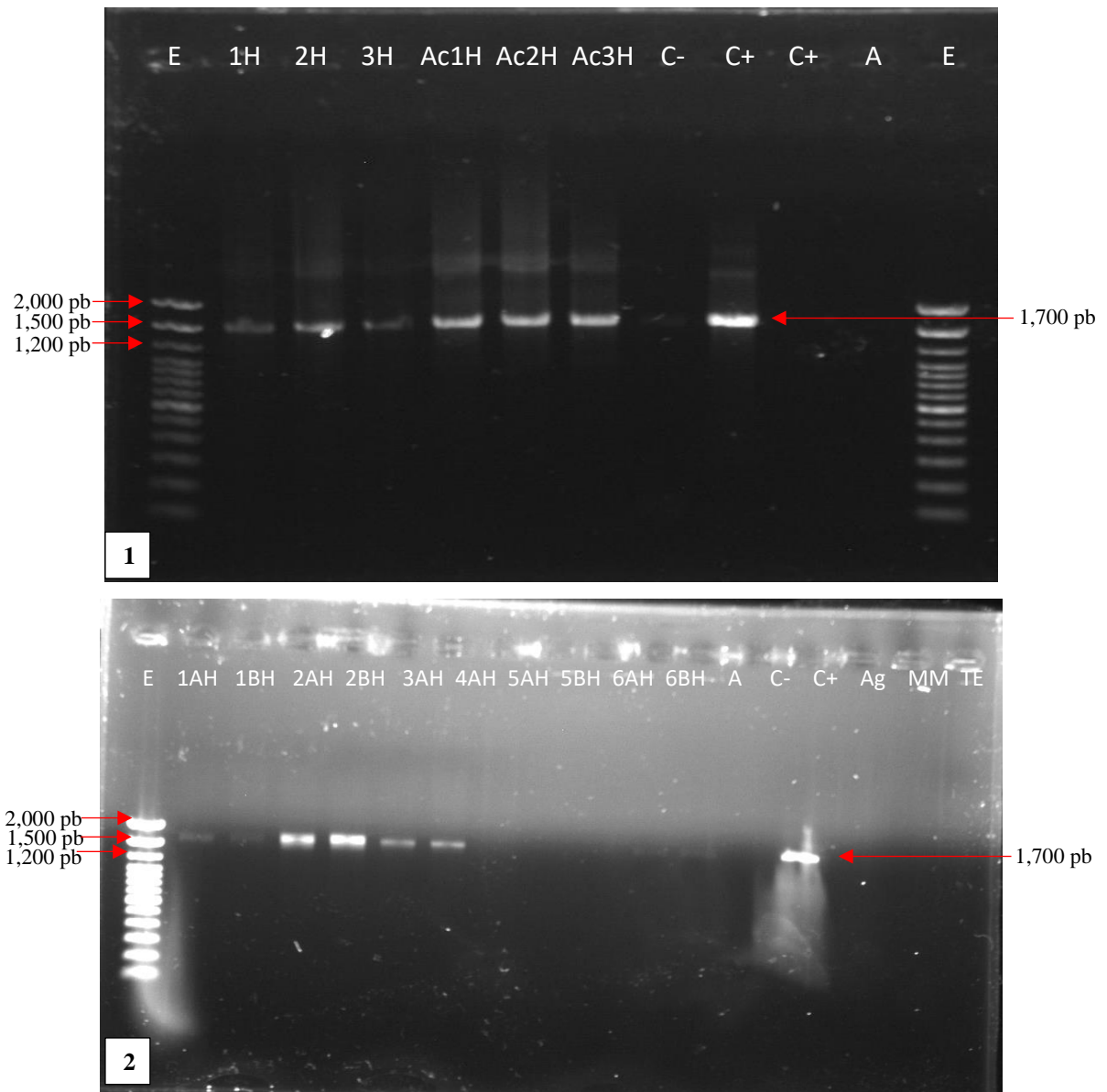
- Ho: No existe diferencia significativa entre las muestras congeladas y muestras frescas.
- Ha: Existe diferencia significativa entre las muestras congeladas y muestras frescas.

Entre las muestras frescas y congeladas se observa que son significativamente diferentes debido a que el valor p es menor a alfa (0.05).

**C. Estandarizar la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para el marcador universal de procariotas 16S ADNr. (procariotas) y 18S ADNr (eucariotas)**

Se estableció una metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que brindara un rendimiento satisfactorio. Se utilizó el kit Platinum™ II Hot-Start PCR Master Mix (2x) (Invitrogen) con el ADN extraído de las muestras anteriores. Esta metodología permitió la amplificación de los marcadores universales 16S (procariotas) y 18S ADNr (eucariotas). Se utilizaron los cebadores para 18S ADNr EK82\_F y Proto5\_R y V4\_R y V4\_F, para la PCR 16S se utilizaron cebadores universales (27\_F y 1492\_R) con una concentración de 0.4uM y se utilizó una escalera de peso molecular de 100pb (100-2,000pb) (Invitrogen). Se obtuvo amplificación de los dos marcadores universales en las muestras analizadas, sugiriendo presencia de microalgas en ambos orígenes. En las Figuras 17 y 20, se observa presencia de bandas de 1,700pb que corresponden microalgas eucariotas y en las Figuras 18 y 19, se observa presencia de bandas de 1,400pb que corresponden a procariotas. En la Figura 21, se observa presencia de una banda de 450pb y una banda inespecífica.

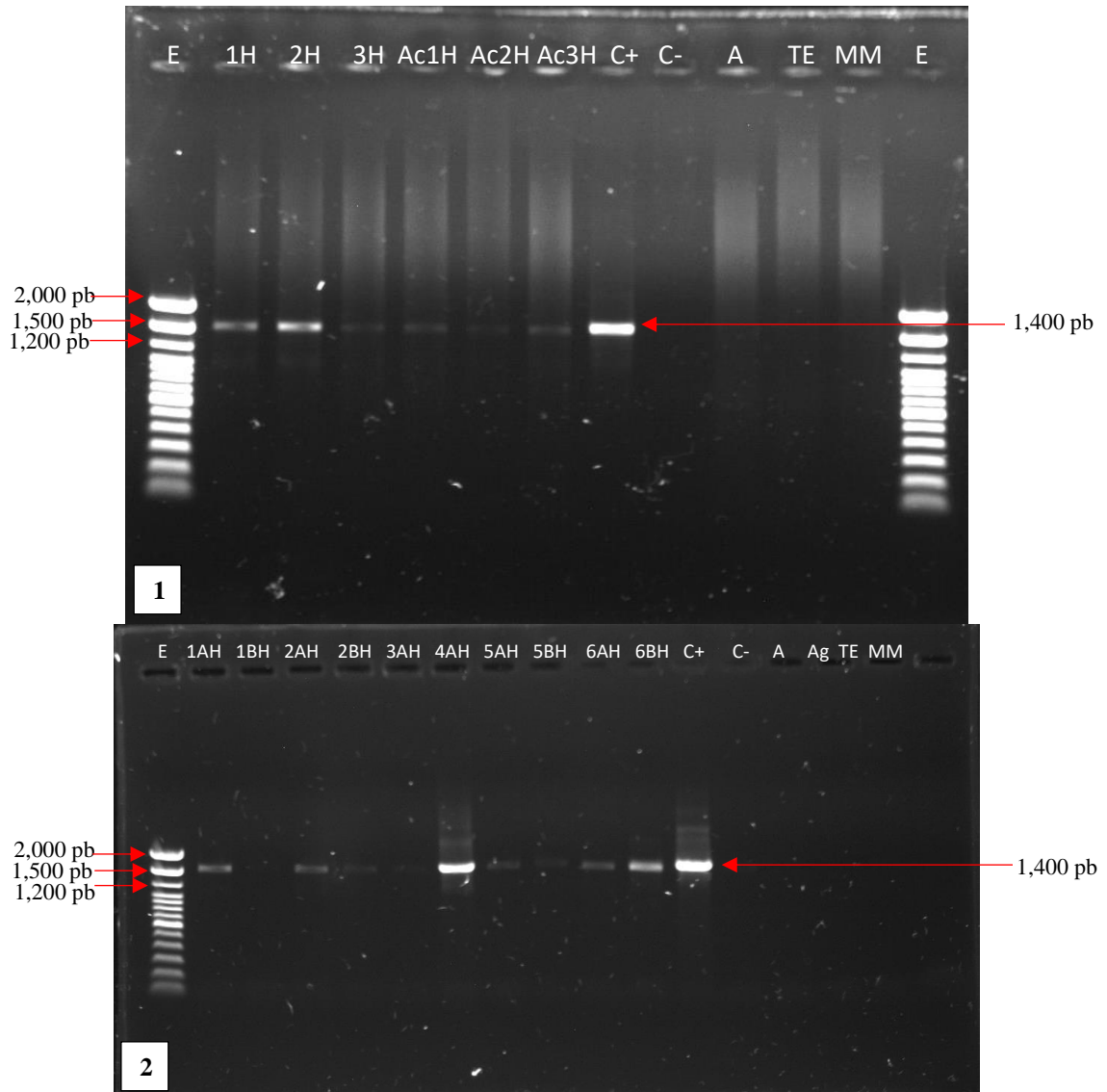
Figura 17. Productos de amplificación de PCR 18S (Ek82\_F y Proto5\_R) de muestras frescas y congeladas del humedal artificial en gel de agarosa 0.8%.



Gel 1: Muestras frescas. En donde 1H, 2H, 3H corresponden a los puntos de muestreo en el humedal artificial (ver Figura 12) en el humedal artificial. Ac1H, Ac2H, Ac3H son las muestras de la fase acuosa. E: Escalera, C+: Hongo, C-: *Bacillus*, C-: Colonia 1, A: Agua.

Gel 2: Muestras congeladas. En donde 1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H corresponden a los puntos de muestreo en el humedal artificial (ver Figura 12). A y B corresponden a la primera y segunda extracción y a cada punto de muestreo en el humedal artificial (1-6), E: Escalera, C-: *Bacillus*, C+: Hongo, A: Control extracción, Ag: Agua, TE: Buffer resuspensión ADN, MM: Master mix.

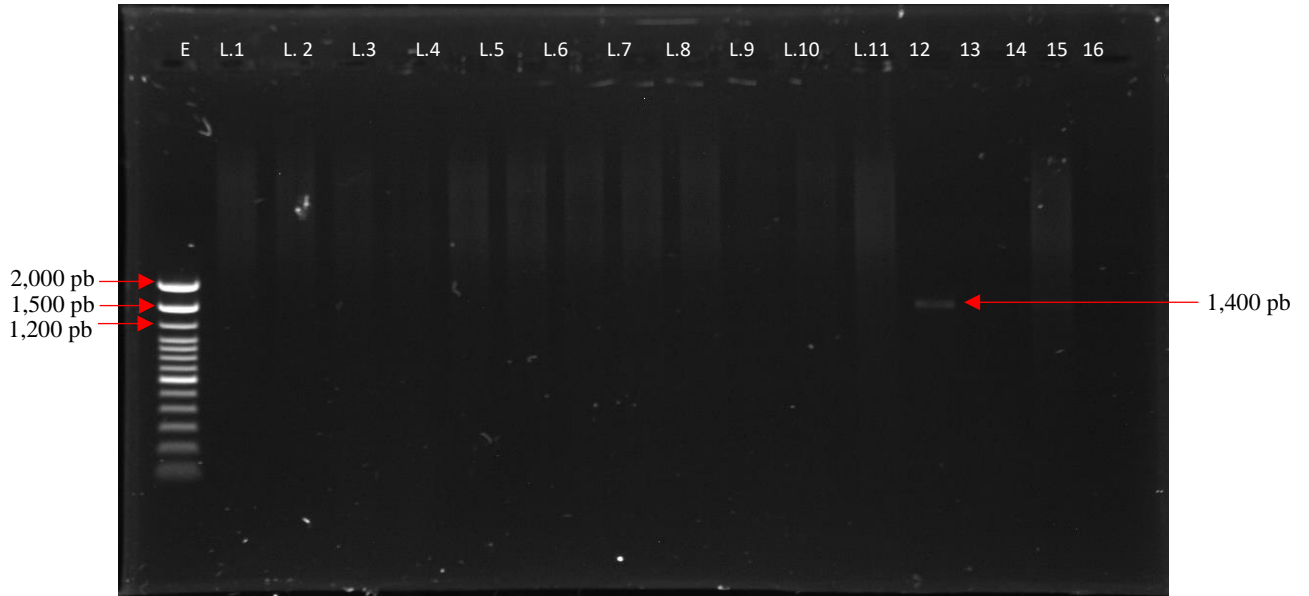
Figura 18. Productos de amplificación de PCR 16S (27\_F y 1492\_R) de muestras frescas y congeladas humedal artificial en gel de agarosa 0.8%.



Gel 1: Muestras frescas. En donde 1H, 2H, 3H corresponden a los puntos de muestreo en el humedal artificial (ver Figura 12) en el humedal artificial. Ac1H, Ac2H, Ac3H son las muestras de la fase acuosa. E: Escalera, C+: Hongo, C-: *Bacillus*, C-: Colonia 1, A: Agua

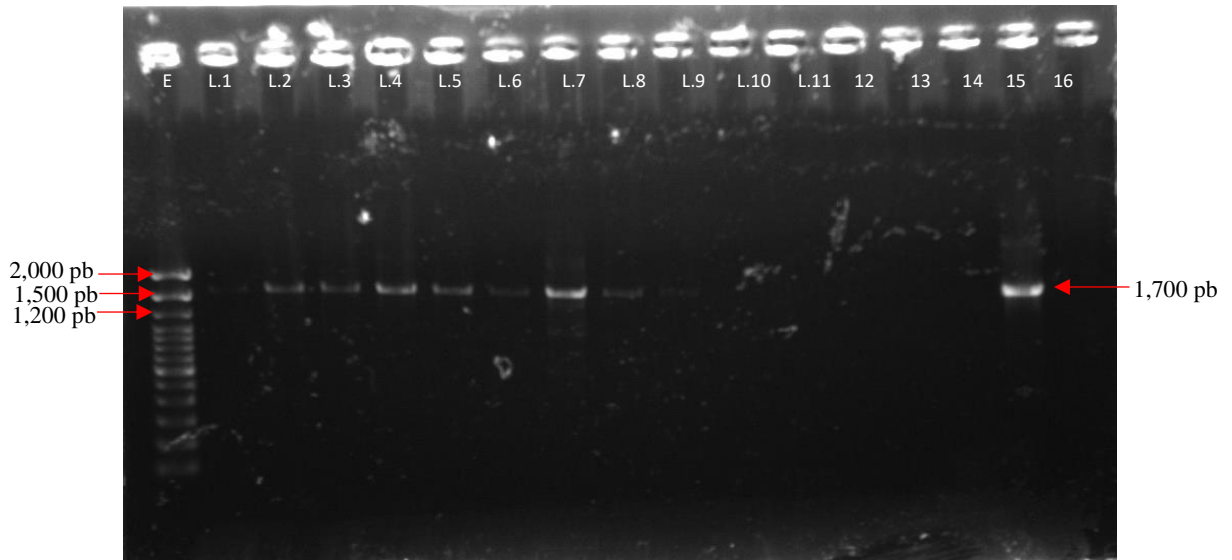
Gel 2: Muestras congeladas. A y B corresponden a la primera y segunda extracción y a cada punto de muestreo en el humedal artificial (1-6), E: Escalera, C-: *Bacillus*, C+: Hongo, A: Control extracción, Ag: Agua, TE: Buffer resuspensión ADN, MM: Master mix.

Figura 19. Productos de amplificación de PCR 16S (27\_F y 1492\_R) de muestras frescas del centro del Lago de Atitlán y muestras preservadas con RNAlater del humedal artificial en gel de agarosa 0.8%.



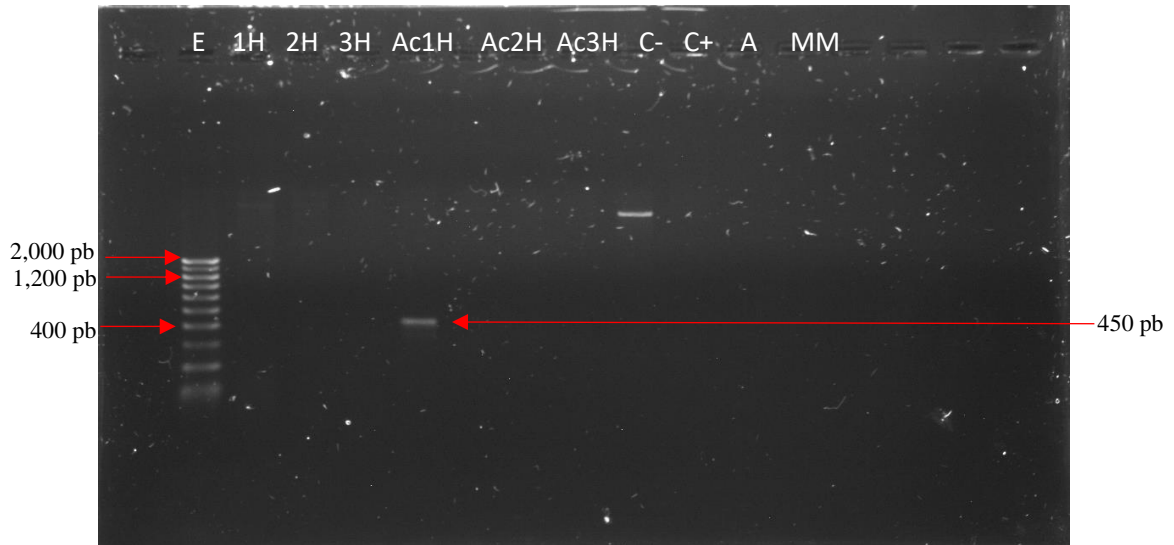
E: Escalera, L.1: 0m, L.2: 10m, L.3: 20m, L.4: 30m, L.5: 40m, L.6: 50m, L.7: 60m, L.8: 80m, L.9: 100m, L.10: 200m y L.11: 300m, 12: P1 (Humedal), 13: P2 (Humedal), 14: Control –(extracción), 15: Control + (Hongo), 16: Agua DEPC.

Figura 20. Productos de amplificación de PCR 18S (Ek82\_F y Proto5\_R) de muestras frescas del centro Lago Atitlán a distintas profundidades y muestras preservadas con RNAlater del humedal artificial en gel de agarosa 0.8%.



E: Escalera, L.1: 0m, L.2: 10m, L.3: 20m, L.4: 30m, L.5: 40m, L.6: 50m, L.7: 60m, L.8: 80m, L.9: 100m, L.10: 200m y L.11: 300m, 12: P1 (Humedal), 13: P2 (Humedal), 14: Control –(extracción), 15: Control + (Hongo), 16: Agua DEPC.

Figura 21. Productos de amplificación de PCR 18S (V4\_F y V4\_R) de muestras frescas del humedal artificial en gel de agarosa 0.8%.

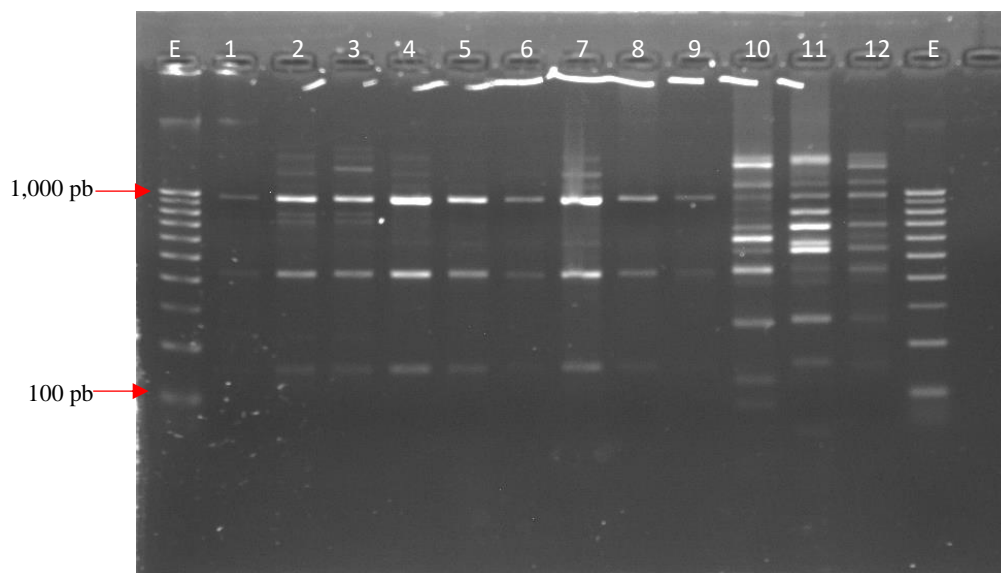


Muestras frescas. En donde 1H, 2H, 3H corresponden a los puntos de muestreo en el humedal artificial (ver Figura 12) en el humedal artificial. Ac1H, Ac2H, Ac3H son las muestras de la fase acuosa. E: Escalera, C+: Hongo, C-: *Bacillus*, A: Agua y MM: Master Mix.

**D. Determinar diferencia de patrones de restricción en productos de PCR de 16S y 18S en los diferentes puntos de muestreo.**

A los productos de PCR 16S y 18S se les realizó una digestión enzimática con *RsaI* para determinar diferencia de patrones en los diferentes puntos de muestreo. En las muestras del Lago de Atitlán, se observa el mismo patrón para las distintas profundidades. En cambio, las muestras del humedal artificial se presentan diferentes bandas por lo que no se tiene un patrón fijo. En la Figura 22, se observa los patrones de enzima de restricción *RsaI* de las muestras frescas de los productos de PCR 18S del Lago de Atitlán y del humedal artificial.

Figura 22. Patrones de restricción obtenidos de la digestión enzimática con *RsaI* en productos 18S (Ek82\_F y Proto5\_R) de muestras frescas del centro Lago Atitlán a distintas profundidades y muestras frescas del humedal artificial en gel de agarosa 2.0%.



E: Escalera, 1: 0m, 2: 10m, 3: 20m, 4: 30m, 5: 40m, 6: 50m, 7: 60m, 8: 80m, 9: 100m, 10: 1H (Humedal), 2H (Humedal), 3H (Humedal).

En el Cuadro 12, se muestran los resultados de los tamaños de bandas obtenidas de los patrones de la enzima de restricción *RsaI* para los productos de PCR 18S para muestras frescas del Lago de Atitlán y humedal artificial.

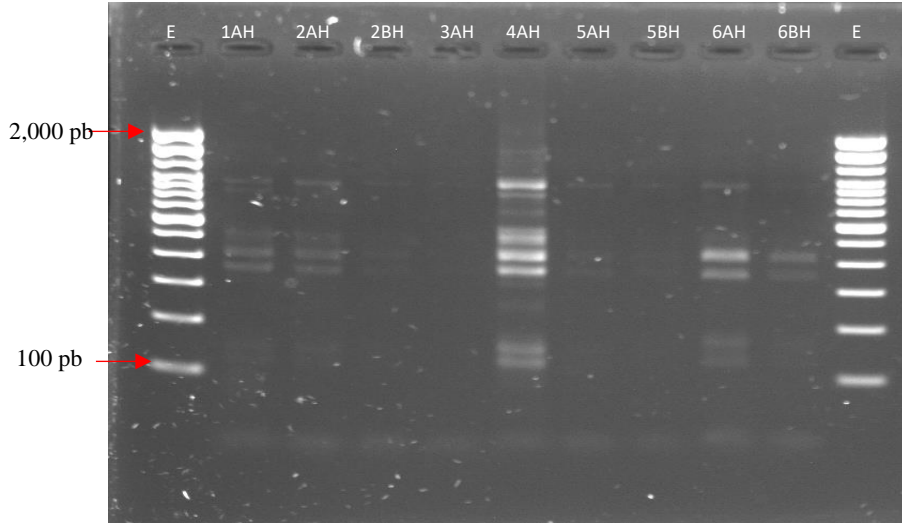
Cuadro 12. Tamaño de bandas obtenidas de la digestión enzimática con *RsaI* en productos de 18S (Ek82\_F y Proto5\_R) de muestras frescas del centro Lago Atitlán a distintas profundidades y muestras frescas del humedal artificial en gel de agarosa 2.0%.

Patrones de restricción con RSAI											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
909	1175	1106	846	855	865	999	874	868	1114	1163	1091
475	1037	883	450	458	458	822	471	460	968	978	975
105	849	744	135	141		436			883	893	883
	709	471				134			704	787	709
	438								641	701	590
	118								581	578	489
									494	489	302
									288	288	
									127	161	

\*1: 0m, 2: 10m, 3: 20m, 4: 30m, 5: 40m, 6: 50m, 7: 60m, 8: 80m, 9: 100m, 10: 1H (Humedal), 2H (Humedal), 3H (Humedal)

En la Figura 23, se muestran los resultados de los tamaños de bandas obtenidas de los patrones de la enzima de restricción RsaI para los productos de PCR 16S del humedal artificial.

Figura 23. Patrones de restricción obtenidos de la digestión enzimática con RsaI en productos de PCR 16S (27\_F y 1492\_R) de muestras congeladas del humedal artificial en gel de agarosa 2.0%.



\*A y B corresponden a la primera y segunda extracción de las muestras de extracción de ADN del humedal artificial, E: Escalera

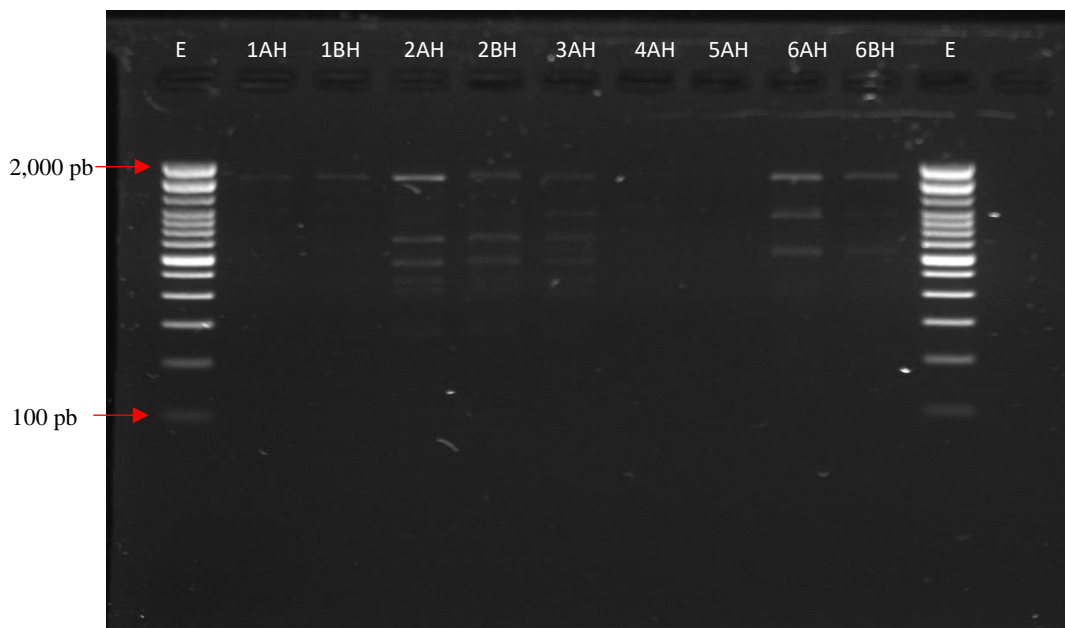
En el Cuadro 13, se muestran los resultados de las bandas obtenidas de los patrones de la enzima de restricción RsaI para los productos de PCR 16S en muestras congeladas del humedal artificial.

Cuadro 13. Tamaño de bandas obtenidas de la digestión enzimática con RsaI en productos de PCR 16S (27\_F y 1492\_R) de muestras congeladas del humedal artificial en gel de agarosa 2.0%.

Patrones de restricción con RSAI								
1	2	2	3	4	5	5	6	6
1317	1216	956		1141	1210	1509	1067	433
977	938	387		1002	360	385	457	355
536	506	328		787	321	320	374	
455	414	144		568			220	
393	173	143		453			203	
	148			387				
				208				
				195				

En la Figura 24, se observa los patrones de enzima de restricción RsaI de las muestras congeladas de los productos de PCR 18S del humedal artificial.

Figura 24. Patrones de restricción obtenidos de la digestión enzimática con RsaI en productos de PCR 18S (Ek82\_F y Proto5\_R) de muestras congeladas del humedal artificial en gel de agarosa 2.0%.



\*A y B corresponden a la primera y segunda extracción de las muestras de extracción de ADN del humedal artificial, E: Escalera

En el Cuadro 14, se muestran los resultados de las bandas obtenidas de los patrones de la enzima de restricción RsaI para los productos de PCR 18S en muestras congeladas del humedal artificial.

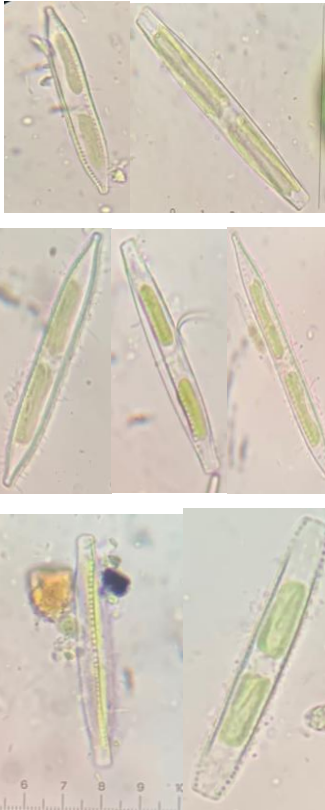


Cuadro 14. Tamaño de bandas obtenidas de la digestión enzimática con RsaI en productos de PCR 18S (Ek82\_F y Proto5\_R) de muestras congeladas del humedal artificial en gel de agarosa 2.0%.

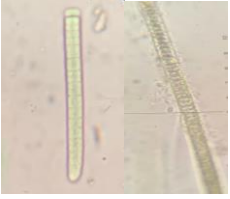

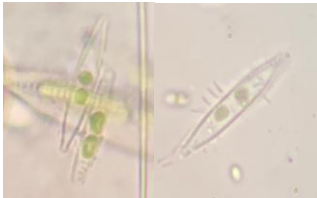

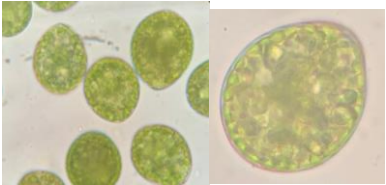
Patrones de restricción con RSAI								
1	1	2	2	3	4	5	6	6
1769	1790	1679	1689	1679			1853	1864
		683	650	941			1033	643
		507	478	666			627	204
		413		491				
		375						




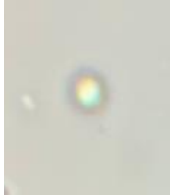


Cuadro 17, se muestran las imágenes de las microalgas identificadas con las aplicaciones que se ha visto que tienen potencial.

Cuadro 15. Identificación de microalgas y su posible aplicación

Género	Imagen	Aplicaciones
<i>Nitzschia</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indicadores de mala calidad de agua</li> </ul>
<i>Caloneis</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indicadores de calidad de agua</li> </ul>
<i>Oscillatoria</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biofertilizantes</li> </ul>

Género	Imagen	Aplicaciones
<i>Phormidium</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• No aplica</li> </ul>
<i>Spirogyra</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bioenergía</li> <li>• Biocombustible</li> <li>• Alimentos</li> <li>• Anti-inflamatorios</li> <li>• Anti-oxidante</li> </ul>
<i>Navicula</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indicadores de calidad de agua</li> </ul>
<i>Arthrospira</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos</li> </ul>
<i>Euglena</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biocombustible</li> <li>• Alimentos</li> </ul>

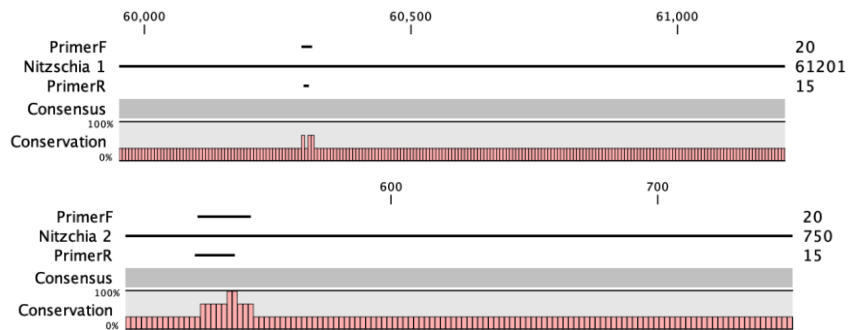
Género	Imagen	Aplicaciones
<i>Chlorococcum</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tratamiento de aguas residuales</li> </ul>
<i>Closterium</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biosaneamiento: Capacidad de eliminar estroncio</li> </ul>
<i>Wilmottia</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• No aplica</li> </ul>
<i>Chlorella</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• No aplica</li> </ul>

\*No aplica significa que no hay literatura sobre esta microalga.

## F. Evaluación *in silico* de cebadores 18S para región V4

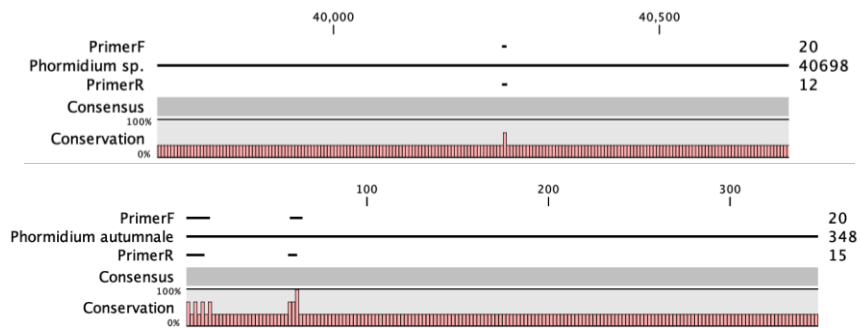
En las siguientes Figuras (Figuras 26-35) se presentan los alineamientos de las secuencias de los géneros de microalgas identificadas microscópicamente con los cebadores 18S (V4\_F y V4\_R) obtenidas mediante NCBI y se analizaron en el programa CLC Sequence Viewer 7 debido a que no se obtuvieron resultados experimentalmente, por lo mismo se buscaba tener una razón por la cual los cebadores V4\_F y V\_R no funcionaron. Se encontró que los cebadores no son adecuados para la identificación de estos microorganismos debido a que se unen en las mismas regiones de la secuencia o se cortan en los primeros nucleótidos.

Figura 26. Alineamiento de cebadores universales 18S V4\_F y V4\_R con las secuencias para el género *Nitzschia sp.*



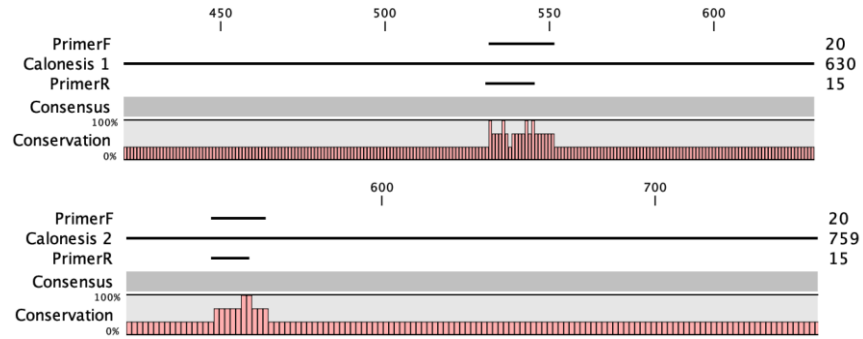
Se obtuvo por el programa CLC que en *Nitzschia 1* los cebadores (V4\_F y V4\_R) dan como resultado un producto de tamaño de 26pb y para *Nitzschia 2* de 20pb. Además, se observa que los cebadores se unen en las mismas regiones de la secuencia. F: Forward (Directo) y R: Reverse (Reverso).

Figura 27. Alineamiento de cebadores universales 18S V4\_F y V4\_R con secuencias para el género *Phormidium sp.* y *Phormidium autumnale*.



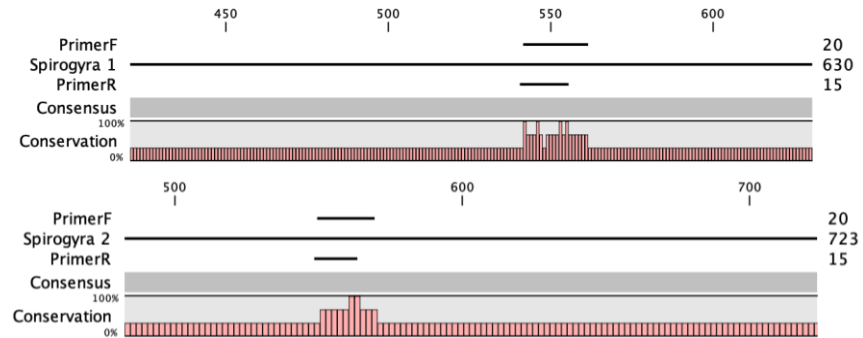
Se obtuvo por el programa CLC que en *Phormidium sp.* los cebadores (V4\_F y V4\_R) dan como resultado un producto de tamaño de 6pb y para *Phormidium autumnale* de 61pb. Además, se observa que los cebadores se unen en las mismas regiones de la secuencia y para *Phormidium autumnale* son cortados por la mitad. F: Forward (Directo) y R: Reverse (Reverso).

Figura 28. Alineamiento de cebadores universales 18S V4\_F y V4\_R con secuencias para el género *Calonesis sp.*



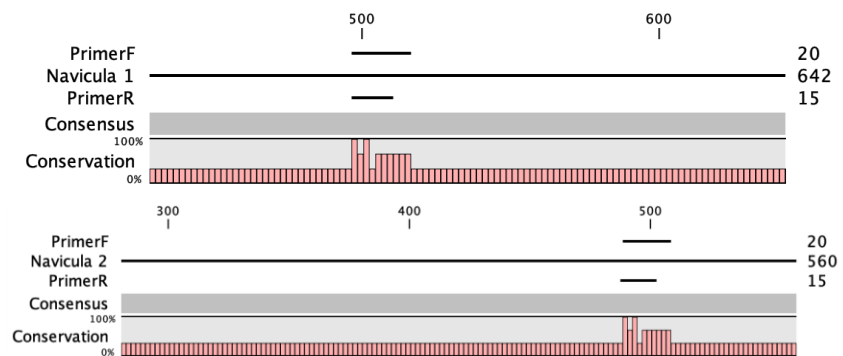
Se obtuvo por el programa CLC que en *Calonesis 1* los cebadores (V4\_F y V4\_R) dan como resultado un producto de tamaño de 21pb y para *Calonesis 2* de 13pb. Además, se observa que los cebadores se unen en las mismas regiones de la secuencia. F: Forward (Directo) y R: Reverse (Reverso).

Figura 29. Alineamiento de cebadores universales 18S V4\_F y V4\_R con secuencias para el género *Spirogyra sp.*



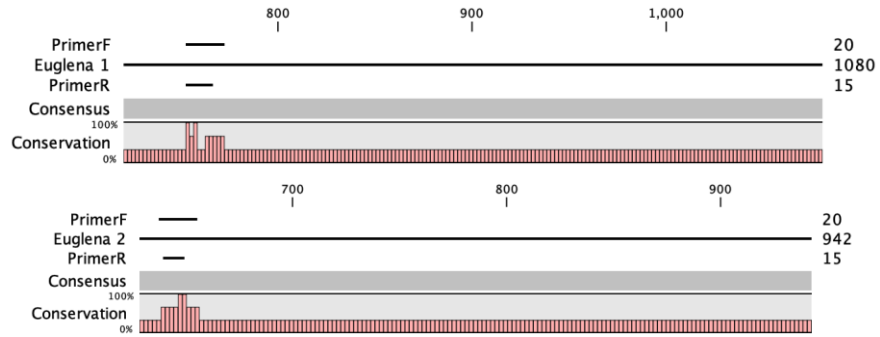
Se obtuvo por el programa CLC que en *Spirogyra 1* y *Spirogyra 2* los cebadores (V4\_F y V4\_R) dan como resultado un producto de tamaño de 20pb. Además, se observa que los cebadores se unen en las mismas regiones de la secuencia. F: Forward (Directo) y R: Reverse (Reverso).

Figura 30. Alineamiento de cebadores universales 18S V4\_F y V4\_R con secuencias para el género *Navicula sp.*



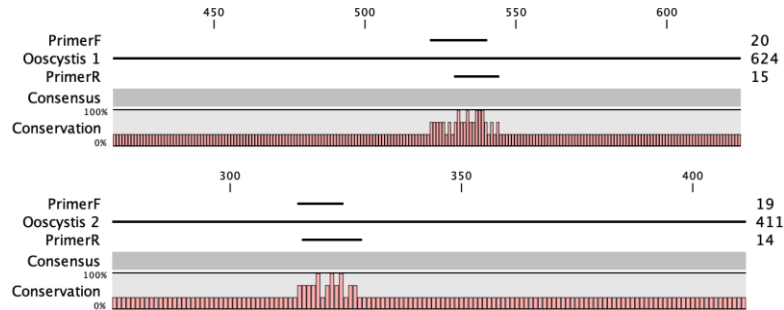
Se obtuvo por el programa CLC que en *Navicula 1* y *Navicula 2* los cebadores (V4\_F y V4\_R) dan como resultado un producto de tamaño de 20pb. Además, se observa que los cebadores se unen en las mismas regiones de la secuencia. F: Forward (Directo) y R: Reverse (Reverso).

Figura 31. Alineamiento de cebadores universales 18S V4\_F y V4\_R con secuencias para el género *Euglena sp.*



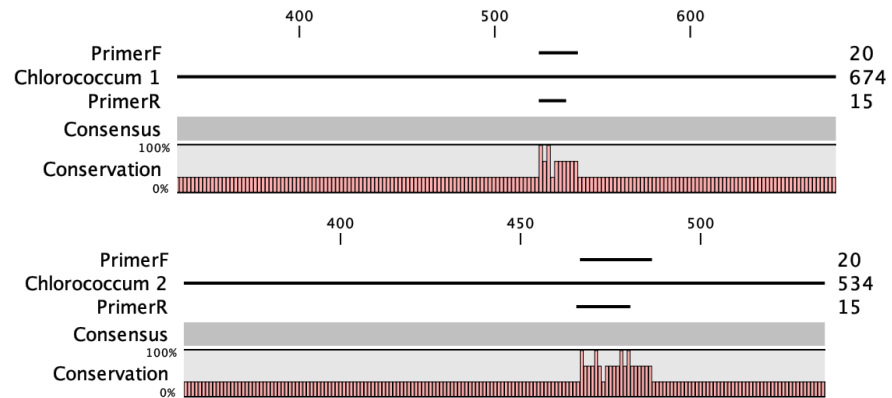
Se obtuvo por el programa CLC que en *Euglena 1* y *Euglena 2* los cebadores (V4\_F y V4\_R) dan como resultado un producto de tamaño de 20pb. Además, se observa que los cebadores se unen en las mismas regiones de la secuencia. F: Forward (Directo) y R: Reverse (Reverso).

Figura 32. Alineamiento de cebadores universales 18S V4\_F y V4\_R con secuencias para el género *Ooscytis sp.*



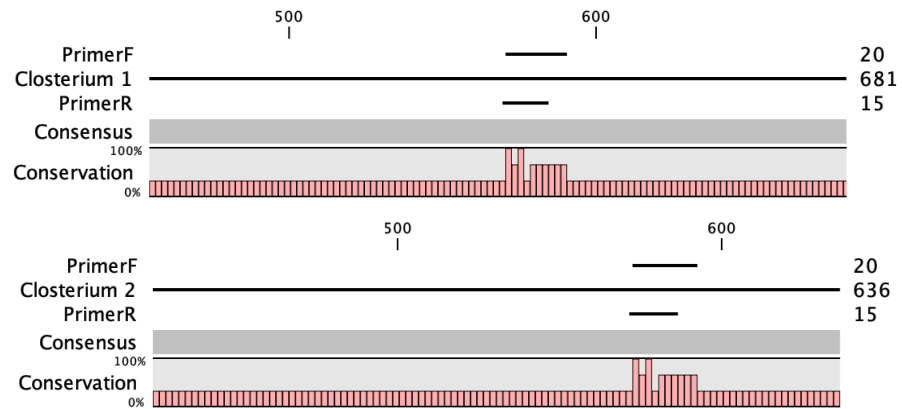
Se obtuvo por el programa CLC que en *Ooscytis 1* los cebadores (V4\_F y V4\_R) dan como resultado un producto de tamaño de 23pb y para *Ooscytis 2* de 14pb. Además, se observa que los cebadores se unen en las mismas regiones de la secuencia. F: Forward (Directo) y R: Reverse (Reverso).

Figura 33. Alineamiento de cebadores universales 18S V4\_F y V4\_R para secuencias para el género *Chlorococcum* sp.



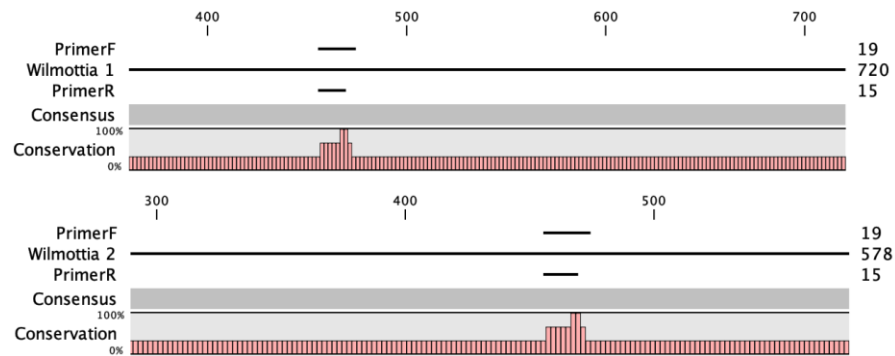
Se obtuvo por el programa CLC que en *Chlorococcum* 1 los cebadores (V4\_F y V4\_R) dan como resultado un producto de tamaño de 19pb y para *Chlorococcum* 2 de 21pb. Además, se observa que los cebadores se unen en las mismas regiones de la secuencia. F: Forward (Directo) y R: Reverse (Reverso).

Figura 34. Alineamiento de cebadores universales 18S V4\_F y V4\_R para secuencias para el género *Closterium* sp.



Se obtuvo por el programa CLC que en *Closterium* 1 y *Closterium* 2 los cebadores (V4\_F y V4\_R) dan como resultado un producto de tamaño de 20pb. Además, se observa que los cebadores se unen en las mismas regiones de la secuencia. F: Forward (Directo) y R: Reverse (Reverso).

Figura 35. Alineamiento de cebadores universales 18S V4\_F y V4\_R para secuencias para el género *Wilmottia sp.*



Se obtuvo por el programa CLC que en *Wilmottia 1* los cebadores (V4\_F y V4\_R) dan como resultado un producto de tamaño de 19pb y para *Wilmottia 2* de 20pb. Además, se observa que los cebadores se unen en las mismas regiones de la secuencia. F: Forward (Directo) y R: Reverse (Reverso).

#### A. Diseño de cebadores universales 18S

En los Cuadros 15 y 16, se presentan los cebadores recomendados para la región V4 según las secuencias obtenidas de la base de datos NCBI y SILVA. A partir de secuencias consenso de 21 secuencias alineadas obtenidas de NCBI y secuencias consenso de 11 secuencias alineadas obtenidas de SILVA. Estos fueron seleccionados con los parámetros obtenidos del programa Primer-BLAST en donde se cambió la base de datos a nr y en la opción de ignorar los objetivos o los desajustes con el cebador se modificó a 3.

Cuadro 16. Diseño de cebador V643 para eucariotas para la región V4

Cebadores	Tamaño de producto	Secuencia (5'→3')	Largo	Comienzo	Final	Tm	GC%	Auto-Complementariedad	Auto-complementariedad 3'
Directo	643	TCGCACGGCCTTGTGCT	17	136	152	62.40	62.40	6.00	2.00
Inverso		AAACGCTTTCGCAGCAGTTC	20	778	759	60.32	50.00	4.00	2.00

Donde: Tm es la temperatura de fusión el ADN, en donde las dos hebras se separan y se convierten en independientes. GC es el porcentaje que el cebador tiene bases Guaniana (G) y Citosina (C).

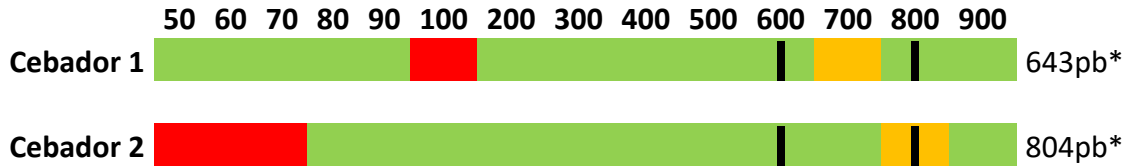
Cuadro 17. Diseño de cebador V804 para eucariotas para la región V4

Cebadores	Tamaño de producto	Secuencia (5'→3')	Largo	Comienzo	Final	Tm	GC%	Auto-Complementariedad	Auto-complementariedad 3'
Directo	804	TTGAAACTGCGAATGGCTCA	20	56	76	58.40	45.00	3.00	2.00
Inverso		TACGAATGCCCCCAACTGTC	20	859	840	60.04	55.00	3.00	1.00

Donde: Tm es la temperatura de fusión el ADN, en donde las dos hebras se separan y se convierten en independientes. GC es el porcentaje que el cebador tiene bases Guaniana (G) y Citosina (C).

En la Figura 36, se presenta un diagrama de los tamaños del producto de los cebadores V643 y V804 para la región V4, y en diferentes colores se observa en donde estos cortan.

Figura 36. Diagrama de los cebadores V643 y V804 para la región V4



Donde: color verde es la secuencia, color rojo es el cebador directo y color naranja es el cebador inverso. Los números que se encuentran del lado derecho con asteriscos es el tamaño del producto de los cebadores. Las líneas de color negro indican el fragmento que los cebadores abarcan de la región V4.

En las Figuras 37 y 38, se presentan PCR *in silico* por medio del programa Primer-BLAST para los dos cebadores recomendados para la región V4.

Figura 37. Identificación de microorganismos por PCR *in silico* del cebador V643 para la región V4

>[MF100794.1](#) Oocystis marina isolate LXD-34 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 680
Forward primer 1 TCGCACGGCCTTGTGCT 17
Template 213 .....C 229

Reverse primer 1 AAACGCTTTCGCAGCAGTTC 20
Template 892 ..... 873
```

>[MF100786.1](#) Densicystis glomerata isolate LXD-56 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 1096
Forward primer 1 TCGCACGGCCTTGTGCT 17
Template 679 .....C 695

Reverse primer 1 AAACGCTTTCGCAGCAGTTC 20
Template 1774 ..... 1755
```

>[MF100784.1](#) Oocystis marina isolate LXD-18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 680
Forward primer 1 TCGCACGGCCTTGTGCT 17
Template 214 .....C 230

Reverse primer 1 AAACGCTTTCGCAGCAGTTC 20
Template 893 ..... 874
```

>[KM229562.1](#) Closterium ehrenbergii 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 680
Forward primer  1   TCGCACGGCCTTGTGCT  17
Template       167 ..... 183

Reverse primer  1   AAACGCTTTCGCAGCAGTTC  20
Template       846 ...T.....T..... 827
```

>[AJ428087.1](#) Closterium acerosum partial 18S rRNA gene, strain NIES 125

```
product length = 680
Forward primer  1   TCGCACGGCCTTGTGCT  17
Template       249 ..... 265

Reverse primer  1   AAACGCTTTCGCAGCAGTTC  20
Template       928 ...T.....T..... 909
```

>[AF352230.1](#) Closterium acerosum N-25-22 18S ribosomal RNA gene, complete sequence

```
product length = 680
Forward primer  1   TCGCACGGCCTTGTGCT  17
Template       275 ..... 291

Reverse primer  1   AAACGCTTTCGCAGCAGTTC  20
Template       954 ...T.....T..... 935
```

>[KM020186.1](#) Chlorella stigmatophora strain SAG 9.86 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 679
Forward primer  1   TCGCACGGCCTTGTGCT  17
Template       247 .....C 263

Reverse primer  1   AAACGCTTTCGCAGCAGTTC  20
Template       925 ..... 906
```

>[FN690734.1](#) Uncultured Chlorophyta partial 18S rRNA gene, clone 3b-C2

```
product length = 680
Forward primer 1   TCGCACGGCCTTGTGCT 17
Template       212 .....C 228

Reverse primer 1   AAACGCTTTCGCAGCAGTTC 20
Template       891 ..... 872
```

>[KP013379.1](#) Amphikrikos sp. J.C.Han 43 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 1093
Forward primer 1   TCGCACGGCCTTGTGCT 17
Template       265 .....C 281

Reverse primer 1   AAACGCTTTCGCAGCAGTTC 20
Template       1357 ..... 1338
```

>[KP013378.1](#) Amphikrikos sp. J.C.Han 32 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 1095
Forward primer 1   TCGCACGGCCTTGTGCT 17
Template       265 .....C 281

Reverse primer 1   AAACGCTTTCGCAGCAGTTC 20
Template       1359 ..... 1340
```

En la Figura 37, se observa la identificación por el cebador V643 de microalgas identificadas microscópicamente del humedal artificial y otros géneros.

Figura 38. Identificación de microorganismos por PCR *in silico* del cebadore V804 para la región V4

>[LC425389.1](#) Chlorella sorokiniana NIES-4216 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence

```
product length = 807
Forward primer 1   TTGAAACTGCGAATGGCTCA 20
Template       36 G..... 55

Reverse primer 1   TACGAATGCCCCCAACTGTC 20
Template       842 .....G..... 823
```

>[MH879793.1](#) Chlorella sorokiniana strain SKPI1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 807
Forward primer 1   TTGAAACTGCGAATGGCTCA 20
Template       13 G..... 32

Reverse primer 1   TACGAATGCCCCCAACTGTC 20
Template       819 .....G..... 800
```

>[MH703760.1](#) Chlorella vulgaris strain Us-7-10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 808
Forward primer 1   TTGAAACTGCGAATGGCTCA 20
Template       63 G..... 82

Reverse primer 1   TACGAATGCCCCCAACTGTC 20
Template       870 .....G..... 851
```

>[MH703749.1](#) Pseudostichococcus monallantoides strain Ru-s-4-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 807
Forward primer 1 TTGAAACTGCGAATGGCTCA 20
Template      63 G..... 82

Reverse primer 1 TACGAATGCCCAACTGTC 20
Template      869 .....G..... 850
```

>[MH703748.1](#) Diplosphaera sp. Ru-6-16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 806
Forward primer 1 TTGAAACTGCGAATGGCTCA 20
Template      63 G..... 82

Reverse primer 1 TACGAATGCCCAACTGTC 20
Template      868 .....G..... 849
```

>[MH703746.1](#) Myrmecia sp. Ru-s-3-3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

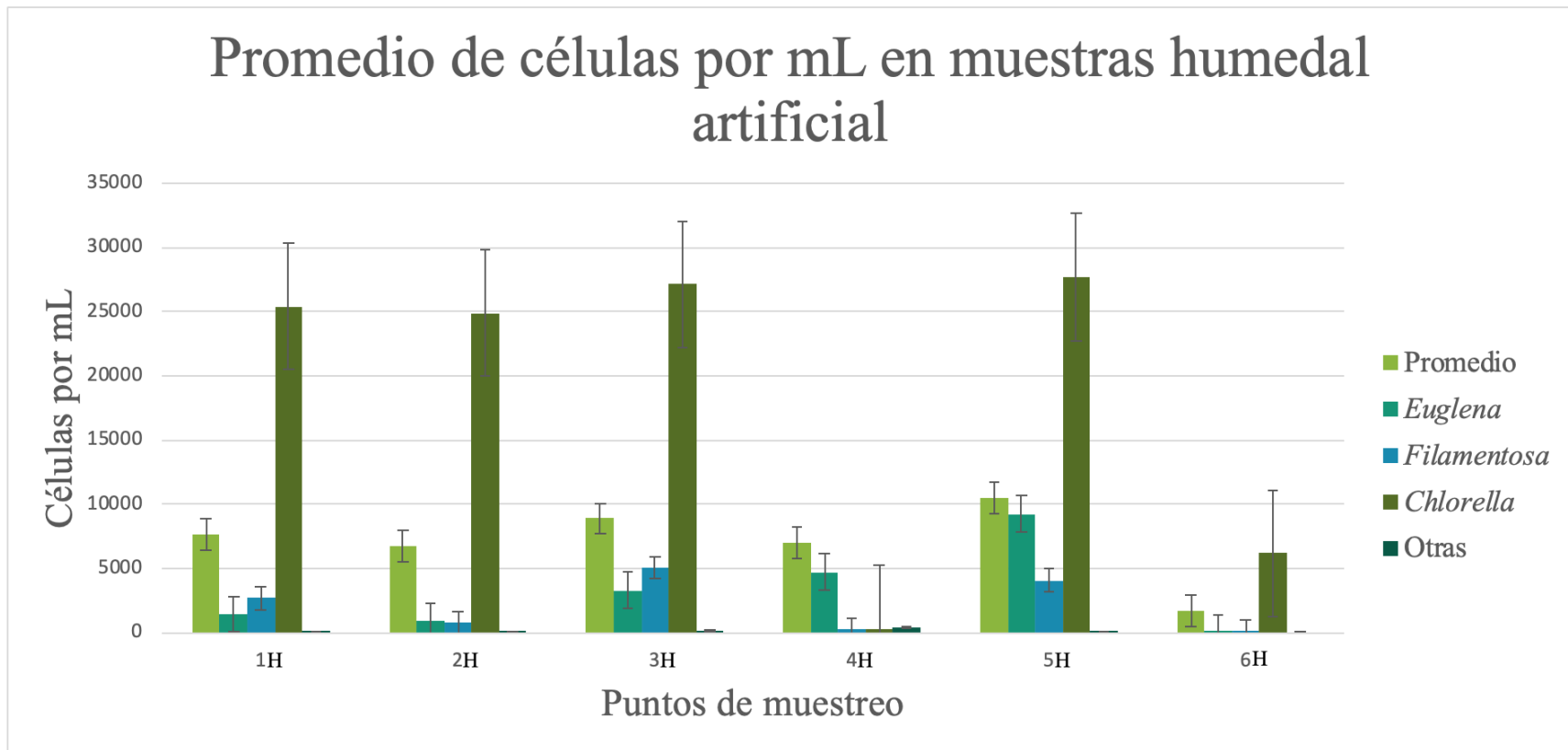
```
product length = 805
Forward primer 1 TTGAAACTGCGAATGGCTCA 20
Template      63 G..... 82

Reverse primer 1 TACGAATGCCCAACTGTC 20
Template      867 .....G..... 848
```

En la Figura 38, se observa la identificación por el cebador V804 de microalgas identificadas microscópicamente del humedal artificial y otros géneros.

En la Figura 39, se observa una gráfica de barras en donde se encuentran los promedios de células por cada punto del humedal artificial.

Figura 39. Promedio de conteo de células de los diferentes puntos de muestreo en el humedal artificial



Donde: 1H, 2H, 3H, 4H, 5H y 6H corresponden a los puntos de muestreo del humedal artificial.

Se decidió realizar la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis para determinar si existía una diferencia significativa entre los puntos de muestreo. Se escogió esta prueba debido a que los datos no presentaban normalidad ni varianza constante. En el Cuadro 18, se presentan los resultados obtenidos en la prueba estadística.

Cuadro 18. Prueba estadística Kruskal-Wallis para los diferentes puntos de muestreo.

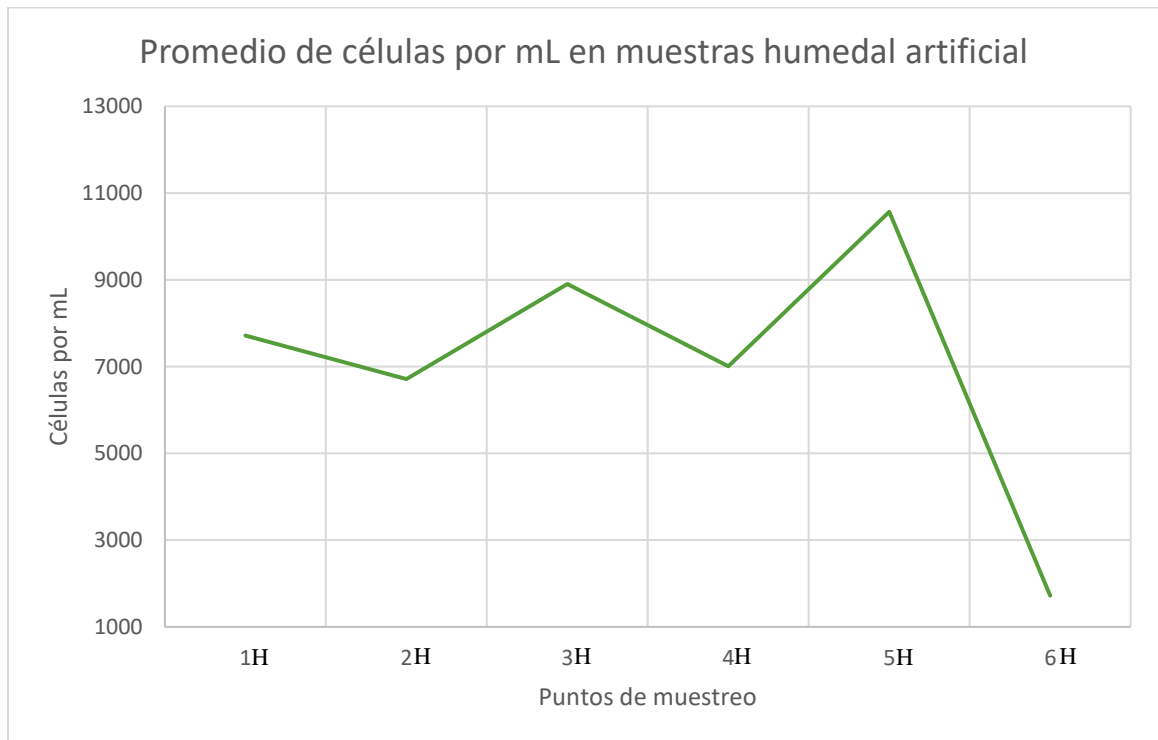
Kruskal-Wallis	Valor p
Puntos de muestreo humedal artificial	0.5084

Hipótesis:

- Ho: Todas las muestras provienen de la misma población (distribución).
- Ha: Al menos una muestra proviene de una población con una distribución distinta.

Debido a que el valor p es mayor a alfa (0.05) se acepta Ho, por lo que se puede concluir que todas las muestras provienen de la misma población.

Figura 40. Promedio de conteo de células de los diferentes puntos de muestreo en el humedal artificial



Donde: 1H, 2H, 3H, 4H, 5H y 6H corresponden a los puntos de muestreo del humedal artificial.

## IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las microalgas, procariota y eucariota tienen una amplia variedad de aplicaciones en biotecnología, alimentos, energía y agricultura por su capacidad de capturar dióxido de carbono, alto contenido de lípidos y carotenoides (Jamali, Akbari, Ghorakhlu, de la Guardia, & Yari Khosroushahi, 2012). A través de los años han surgido diferentes necesidades en el mundo como el incremento de gases de efecto invernadero, proteínas para alimentación, energía, reducción de concentración de nitrógeno y fósforo en la limpieza de aguas residuales tanto urbanas como industriales las cuales son las causantes de la eutrofización de cuerpos de agua (Khan, Shin, & Kim, 2018). Por lo tanto, el estudio tiene como objetivo desarrollar un método molecular para la identificación de microalgas presentes en un humedal artificial (Sanarate) y en el Lago de Atitlán (Sololá) para evaluar su potencial como materias primas sustitutas de bajo costo e impacto ambiental.

Por lo mencionado anteriormente se realizó la extracción de ADN de muestras de agua, frescas y congeladas por el método de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Esta metodología se ha utilizado frecuentemente en donde se ha evidenciado que es adecuado para la extracción de ADN de microalgas. Se varió la metodología original (Frazão & Silva, 2018) agregando proteinasa K, para lisar el tejido celular, al buffer de lisis CTAB se agregó 0.2%  $\beta$ -mercaptoetanol para ayudar en la desnaturalización de estructuras ricas de GC y para la estabilización de enzimas y como agente antioxidante. Se utilizó isopropanol para la precipitación del ADN. Las concentraciones obtenidas de las diferentes muestras se encuentran en la sección de resultados en la parte B, se observa la eficiencia de la extracción al lograr medir las concentraciones de ADN para todas las muestras, esto se demuestra por la cuantificación por espectrofotometría (NanoDrop™ One) y fluorometría (QuantiFluor® One dsDNA System). Al comparar las concentraciones fue evidente que se tuvo menor concentración de ADN por medio de fluorometría (QuantiFluor® One dsDNA System) esto se debe a que este equipo es 10 veces más sensible que otros equipos, ya que fue diseñado para proporcionar fluorescencia en la detección al cuantificar ADN de doble hebra. La técnica por fluorometría (QuantiFluor® One dsDNA System) se utilizó para verificar la concentración de ADN en las muestras.

En términos de pureza de ADN, para el rango de A260/280 (~1.8) se encontraron valores fuera de rango, esto probablemente fue causado por la contaminación de proteínas o fenol residual asociado con el método de extracción. En el rango de A260/230 (2.0-2.1) fueron valores menores al rango óptimo, esto se puede relacionar con presencia de residuos de fenol o carbohidrato el cual es problema comúnmente encontrado en el ADN aislado de plantas. El método utilizado para la extracción genera fragmentos de ADN de alto peso molecular los cuales son adecuados para tecnología de secuenciación de segunda generación (Illumina) o de tercera generación (Oxford Nanopore). Los fragmentos (~400-800pb) son cruciales para la preparación de bibliotecas de alta calidad y ensamblaje más eficiente del genoma (Protocol, 2017). En 1993, un estudio realizado por Taylor y colaboradores utilizaron la metodología de extracción de

fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1), y posteriormente secuenciaron tres veces y obtuvieron resultados similares, por lo mismo sugieren que este método es adecuado para secuenciar las muestras.

En la misma sección de resultados, se evidenció una mayor concentración de ADN en las muestras del humedal artificial en comparación con las muestras del Lago de Atitlán, esto se debe a la abundancia de microorganismos presentes en los dos cuerpos de agua. En lo que concierne al Lago las muestras se tomaron en el mes de septiembre y este es uno de los meses que no se tiene un florecimiento de microalgas importantes; se ha tenido evidencia que los meses de octubre a diciembre son los meses en donde ha habido florecimientos con excepción en el mes de mayo. Además, en el lago se realizan muestreos mensuales que se realizan por parte del Centro de Estudios Atitlán y AMSCLAE, en donde se ha observado que la transparencia oscila entre los 5 y 11m de profundidad donde se ha demostrado los valores más bajos de transparencia lo cual indica la alta productividad de algas en el lago, pero esto junto con la cantidad de oxígeno disuelto, pruebas fisicoquímicas y microbiológicas ha sido muy cambiante a lo largo de los años. Esto se ve relacionado con el ingreso de contaminantes y aguas residuales al lago. Se tienen datos en donde en los primeros 30 metros, se tiene una temperatura promedio de 20.8°C por lo que las algas verdes se encuentran asociadas a altas concentraciones de nutrientes y aguas más cálidas por esto mismo se pudo haber obtenido mayor concentración de ADN en estas profundidades. En cambio, en el humedal artificial desde la toma de muestra se evidenció que se encontraba gran cantidad de microorganismos debido a que los humedales son utilizados para el tratamiento de aguas residuales lo cual hace que haya mayor cantidad de nutrientes para el crecimiento de microalgas. Además, se observó una diferencia entre las muestras frescas y congeladas. Por dicha razón, se decidió realizar una prueba no paramétrica debido a que los datos no presentaban normalidad ni varianza constante (resultados no presentados). Se usó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de las muestras frescas y congeladas, medidas con los dos diferentes métodos de cuantificación mencionados anteriormente. Se obtuvo un valor p ( $6.467e-06$ ) menor a alfa (0.05) lo cual indicaba que alguna de las muestras era diferente, y se prosiguió a realizar una prueba post-hoc para saber cuál de ellas se tenía una diferencia. Se obtuvo una diferencia significativa entre las muestras frescas y congeladas cuantificadas por espectrofotometría y las muestras frescas y congeladas medidas por fluorometría, pero ambos métodos de cuantificación de ADN se obtuvo presencia de dicho material biológico. Se debe de tomar en cuenta los tamaños de los dos diferentes cuerpos de agua debido a que esto afecta la concentración de microorganismos.

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los productos de marcadores universales eucariotas (18S) y procariotas (16S). Muchas de las plantillas son difíciles de amplificar incluyendo aquellas con alto contenido de guanina-citosina (G/C) o alta en adenina-timina (A/T). Para esto se ha implementado ciertos aditivos orgánicos en la mezcla de reacción, como dimetil sulfóxido (DMSO), betaína, polietilenglicol, glicerol, albúmina de suero bovino (BSA), concentraciones mayores de MgCl<sub>2</sub> y formamida. Se ha determinado que el DMSO al 5% es la mejor condición para obtener

resultados con mayor proporción de productos (Sforza, Simionato, o Giacometti, & Bertucco, 2012). Estos ayudan a no formar estructuras secundarias, y a ajustar  $T_m$  variable entre AT y GC (Strien, Sanft, & Mall, 2013). En este estudio se utilizó un potenciador GC (kit Platinum II Hot-Start PCR Master Mix(2x)) el cual ayudó para la amplificación específicas de los productos debido a que los cebadores 18S EK82\_F (GAAACTGCGAATGGCTC) y Proto5\_R (GACGGGCGGTGTGTAC) tienen 52.9% y 68.8% de contenido GC, respectivamente. Se obtuvieron bandas de aproximadamente 1,400pb para 16S y para 18S se obtuvieron bandas de 1,700pb. Se observa en la sección C de los resultados que los geles de agarosa 0.8% se obtuvieron bandas, por lo que indica que en los dos cuerpos de agua se presentan microalgas (procariotas y eucariotas). Además, se observó que en los geles de agarosa tanto para las muestras frescas como congeladas se obtuvieron bandas, por lo que la PCR es óptima para cualquiera de las dos metodologías de extracción. Sin embargo, se obtuvieron bandas tenues en las muestras congeladas esto se pudo deber a daño o degradación del ADN, además pudo haber afectado la extracción de ADN debido a que la mezcla de fenol:cloroformo: alcohol isoamilico se encontraba oxidado.

Por otro lado, las muestras del Lago de Atilán en el gel de 16S se observan barridos que puede ser degradación del ADN y en el gel de 18S se observan bandas por lo que se puede decir que hay presencia de microalgas eucariotas en el Lago. En cuanto a los resultados de los cebadores V4\_R y V4\_F no se obtuvieron bandas al utilizar el programa establecido por Bradley y colaboradores (2016) por lo que se decidió realizar un PCR en dos partes, la primera parte fue de 25 ciclos y se empezó con una temperatura de hibridación elevada de 70°C y en cada ciclo se fue disminuyen 1°C hasta llegar a 45°C, esto para evitar la formación de dímeros en la primera fase. La segunda fase, se realizaron otros 20 ciclos a 50°C para formación de copias del ADN. Para este procedimiento, se obtuvo como resultado presencia de una banda del tamaño esperado (450pb) en la muestra fresca 1 de la parte acuosa del humedal artificial (Ac1H) y se observó una banda inespecífica en el control negativo, esto se puede deber a que los cebadores son complementarios entre ellos y se dé la formación de estructuras secundarias o dímeros. Por lo que se decidió realizar un gradiente para obtener la temperatura exacta de recocido, para este procedimiento no se obtuvieron resultados (datos no mostrados).

Por lo mencionado anteriormente, se decidió realizar un análisis bioinformático de las secuencias de los cebadores V4\_F y V4\_R con diferentes secuencias de NCBI y SILVA de las microalgas identificadas microscópicamente. Las secuencias fueron alineadas por el programa Cluster Muscle (resultados en anexos) del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI, siglas en inglés). Se observó que el cebador reverso tiene una parte en común con el cebador directo y esto es una de las razones por las que no amplificó de manera correcta. Además, se analizaron estas secuencias en el programa visor de secuencia de CLC (resultados se observan en las Figuras 26-35) en donde los productos de los cebadores son pequeños. Por lo tanto, éstos no amplifican de manera correcta. Debido a estos problemas se decidió diseñar y recomendar dos diferentes cebadores para la amplificación de ADN de microalgas mediante análisis bioinformáticos. Para

esto, se utilizaron las secuencias consenso obtenidas por la alineación de secuencias obtenidas de microalgas, por medio de la base de datos SILVA y NCBI, mediante el algoritmo de alineación del programa visor de secuencia de CLC y se utilizó Primer-BLAST (NCBI) para obtener los posibles cebadores adecuados. Los dos cebadores se escogieron por el porcentaje de GC, diferencia de Tm (temperatura de fusión del ADN), auto-complementariedad y el largo de la secuencia de los cebadores. Para la comprobación de estos se utilizó BLAST para realizar un PCR *in silico*, en donde se pudo notar que ambos cebadores son adecuados para la identificación de diferentes especies de microalgas (resultados se observan en las Figuras 37 y 38). El cebador V643, es apropiado para la amplificación de ADN de los géneros identificados en el humedal artificial a pesar de que el cebador directo tiene un porcentaje alto de GC. Por lo que se recomendaría utilizar un potenciador GC para ser más específico.

El programa SILVA, es una base de datos que contiene información taxonómica para los dominios de Bacteria, Archaea y Eukarya, esta se basa en filogenias para ARNr de las subunidades pequeñas (16S y 18S). Esta base de datos para taxonomía eucariota se basa en las opiniones consensuadas de la Sociedad Internacional de Protistólogos y la base de datos es corregida manualmente. La taxonomía de NCBI contiene los nombres de todos los organismos asociados con los envíos de secuencias y las clasificaciones. Estas se actualizan diariamente. Al igual que SILVA la base de datos es corregida manualmente, pero con la diferencia que esta se basa en la literatura sistemática actual y utiliza más de 150 fuentes como, por ejemplo, Catálogo de la vida, Enciclopedia de la vida, NameBank y WikiSpecies las cuales son específicas a grupos particulares de organismos (Balvoči & Huson, 2017). A pesar de estas diferencias se ha evidenciado que SILVA y NCBI comparten la mayoría de las unidades taxonómicas.

En cuanto al procedimiento de determinar la diferencia de patrones de restricción en productos de PCR de 16S y 18S en las diferentes muestras, se utilizó la enzima de restricción RsaI debido a que reconoce la secuencia de tetranucleótidos 5'-GTAC-3' e incide entre los T y A. Se ha observado que RsaI es útil en experimentos de secuenciación de ADN (Lynn, Cohen, Kaplan, & Gardner, 1980). Se observó un patrón para las muestras del Lago de Atitlán, se obtuvieron bandas entre 100-900pb en las 9 muestras. Esto sugiere la presencia de un mismo microorganismo dominante desde los 0m hasta los 100m de profundidad, en las profundidades de 200m y 300m no se sometieron a la digestión enzimática debido a que no se presentaron bandas en los productos de PCR. En las muestras del humedal artificial se observa una variedad de bandas (10 bandas) por lo que podría significar que hay diversidad de microalgas en este cuerpo de agua, tanto para 18S como para 16S. En la Figura 24, el cual es un mapa de calor para los productos de PCR 18S para las muestras frescas y congeladas del humedal y muestras frescas del Lago de Atitlán. En el eje X, se explica la relación entre cada una de las muestras y en el eje Y es la relación entre cada peso molecular de las bandas obtenidas. Se observa la división en dos grupos, entre muestras congeladas y frescas. En cuanto, a las muestras frescas se observa relación entre muestra L.1 y L.2 que corresponden a 0m y 10m de profundidad, respectivamente, las cuales presentan relación con las muestras del punto 1H, 2H y 3H del humedal artificial

lo cual podría significar la presencia del mismo microorganismo. En las muestras congeladas se observa relación entre ellas, esto se debe a la forma en que se preservaron, además al momento que se descongelaron se pudo provocar una degradación de ADN, por lo mencionado anteriormente, se afecta la diversidad de microorganismos presentes en las muestras. Los colores asignados se basan en la E (escalera utilizada como referencia) a cada peso molecular se le asigna un color y ese color es la guía para poder identificar ausencia o presencia de bandas en cada muestra. Por ejemplo: en las filas de los pesos moleculares 1,500pb y 600pb en la columna E se le asigna un color pálido para presencia de banda por lo que el color celeste es ausencia de banda y el color rosado es presencia de banda y se observa en el eje Y que estas tienen relación porque tienen la cantidad de presencia y ausencia de bandas muy parecidas. Otras filas que se encuentran relacionadas por el eje Y son la de los pesos moleculares 400pb y 800pb en donde se puede notar que en la columna E se les asigna un color celeste suave en donde indica presencia de banda y azul oscuro indica ausencia de bandas.

Por otro lado, se realizó una fijación con lugol 2% para la identificación microscópica en muestras del humedal artificial. Entre las microalgas identificadas se encuentran: *Oscillatoria sp.* es un alga verde-azul, filamentoso, capaz de fijar nitrógeno, por lo mismo se ha utilizado como fertilizante en la producción de arroz (Naz, Aktar, Golam, & Azam, 2015). *Spirogyra sp.* es un alga verde filamentosa la cual se ha utilizado para varias aplicaciones entre ellas energía, biocombustible, compuestos bioactivos para antibióticos, antioxidantes y antiinflamatorios (Ge, Madill, & Champagne, 2018). *Nitzschia* es una diatomea esta puede estar presente en ambientes hipersalinos y en presencia de altas concentraciones de diferentes sustancias químicas o de materia orgánica (Parsons, Okolodkov, & Aké-Castillo, 2012), *Navicula* es una diatomea de agua dulce y un organismo que es utilizado para la producción de aceites (Levkov & Williams, 2014). *Chlorococcum* es un alga unicelular que soporta grandes cantidades de concentración de dióxido de carbono (Yolotzin, 2016) y *Caloneis* es una diatomea solitaria que tolera altos índices de contaminación (Buendía-Flores, Tavera, & Novelo, 2015). Estas últimas han sido utilizadas como indicadores de calidad del agua en diferentes lugares del mundo. Por último, el género *Euglena* es un alga unicelular capaz de crecer utilizando luz solar, heterotrófico y mixotrófico. *Euglena* tiene una capacidad natural para tolerar una serie de tensiones externas, incluidas las condiciones de crecimiento ácido y la radiación ionizante, se ha demostrado que es capaz de secuestrar metales pesados (Gissibl, Sun, Care, Nevalainen, & Sunna, 2019). Se ha utilizado como suplemento en comidas y bebidas, productos de belleza y biocombustibles (Gissibl *et al.*, 2019).

Para obtener un aproximado de células en las muestras extraídas del humedal se realizó un conteo de células por medio de cámara de Neubauer. En estas muestras se encontró mayor cantidad de *Chorella* (18,613 células), *Euglena* (3,313 células) y filamentosas como *Spirogyra sp.* y *Wilmottia sp.* entre otras (2,175 células). En la Figura 12 de la sección de resultados parte E, se observa una gráfica de barras en donde se evidencia que los puntos con mayor promedio de células son el punto 5H (10,569 células), punto 4H (7,010 células) y punto 3H (8,905 células) en donde es la entrada de aguas negras y el punto 6 (1,721 células) con

menor cantidad de células debido a que es la salida de agua ya tratada. En los puntos 5H y 4H al tomar la muestra se observó mayor cantidad de sólidos que en los demás puntos. En el punto 1H, no se observó mayor cantidad de sólidos a pesar que este también es entrada de aguas negras, por lo mencionado anteriormente, podría ser por la forma en que corre el agua dentro del humedal y el medio ambiente. Por lo datos obtenidos, se observa que el humedal artificial está cumpliendo con su función de limpiar el agua para poder ser reutilizada, a pesar que estadísticamente no hay una diferencia significativa (Cuadro 18). Con relación a lo anterior se observa en la Figura 40, en donde los puntos 2H y 3H son los puntos en donde se encontraba el agua ya tratada por lo que se observa una disminución de microorganismos y en el punto 5H es donde se encontraba la mayor cantidad de sólidos por ende mayor cantidad de microalgas que es lo que refleja la gráfica, y con el punto 6H se observa una línea descendente en donde se evidencia menor cantidad de microalgas, por lo tanto esto ayuda a evidenciar que el humedal esta cumpliendo su función debido a que en los puntos de entrada de aguas negras se encontraban microalgas tales como *Nitzschia*, *Caloneis*, *Navicula*, *Chlorococcum* y *Closterium* que ayudan a limpiar las aguas. En el caso del punto 6H se observó una cantidad mínima de microalgas como *Euglena* que pueden ser utilizadas para la fabricación de biocombustibles. Este mismo procedimiento no se pudo realizar con las muestras del Lago de Atitlán debido a que no se observaron células en el microscopio, ya que en la toma de muestra no se evidenciaron microorganismos.

## X. CONCLUSIONES

1. Se optimizó el método de extracción de ADN de microorganismos presentes en diferentes muestras de agua por el método de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para su posterior uso.
2. Se determinó mejores resultados en la cuantificación utilizando el método de fluorimetría que por espectrofotometría.
3. Se estandarizó la técnica molecular PCR para el marcador universal de procariotas 16S ADN<sub>r</sub> a partir de muestras del humedal y lacustre.
4. Se estandarizó la técnica molecular PCR para el marcador universal de eucariotas 18S ADN<sub>r</sub> a partir de muestras del humedal y lacustre.
5. Se evidenció que los cebadores universales 18S Ek82\_F y Proto5\_R son mejores para la identificación de microorganismos eucariotas que los cebadores V4\_F y V4\_R.
6. Se determinó patrón similar en las muestras del Lago de Atitlán, por lo que se cree que predomina un mismo microorganismo.
7. Se determinó que en el humedal artificial se encuentran diversidad de microorganismos debido a que hay una diferencia de patrones de restricción en las muestras utilizadas.
8. Se caracterizó microscópicamente *Oscillatoria sp.* en muestras del humedal artificial, esta es utilizada para la producción de biofertilizantes.
9. Se caracterizó microscópicamente *Spirogyra sp.* y *Euglena sp.* en muestras del humedal artificial estas son utilizadas para la producción de biocombustibles.
10. Se caracterizó microscópicamente *Nitzschia sp.* *Chlorococcum sp.* y *Caloneis sp.* las cuales son utilizadas para determinar la calidad de agua.
11. Se cuantificó en mayor cantidad: *Chorella sp.* (18,613 células), *Euglena,sp.* (3,313 células) y filamentosas como *Spirogyra sp.* y *Wilmottia sp.* entre otras (2,175 células) en muestras del humedal artificial.
12. Se diseñó cebadores (V643 y V804) para la región V4 para la identificación de microalgas eucariotas analizados por medio de Primer-Blast.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda utilizar el método de extracción de ADN fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para su posterior análisis.
2. Se recomienda realizar variaciones en la metodología de extracción de ADN fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para obtener mejores concentraciones de ADN.
3. Se recomienda utilizar fluorometría para obtener concentraciones exactas de ADN de doble hebra.
4. Se recomienda utilizar los cebadores universales 18S Ek82\_F y Proto5\_R para obtener mejores resultados.
5. Se recomienda a la empresa Cementos Progreso utilizar *Spirogyra sp.* y *Euglena sp.* para la producción de biocombustibles.
6. Se recomiendo a la empresa Cemento Progreso utilizar *Oscillatoria sp.* para la producción de biofertilizantes.

## XII. REFERENCIAS

- Al Hattab M, Ghaly A, H. a. (2015). Microalgae Harvesting Methods for Industrial Production of Biodiesel. *J Fundam Renewable Energy*, 154(5). <https://doi.org/10.4172/20904541.1000154>
- AMSCLAE. (2017). Plan Operativo Anual AL 31 DE MAYO DE 2017, 1–92.
- Arena-Ortiz, M. L., & Chiappa-Carrera, X. (2017). Microbiología ambiental en México: Diagnóstico, tendencias en investigación y áreas de oportunidad., (Octubre), 22.
- Auinger, B. M., Pfandl, K., & Boenigk, J. (2008). Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in Lugol's iodine solution: Combining microscopic analysis with single-cell PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2505–2510. <https://doi.org/10.1128/AEM.01803-07>
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Balvoči, M., & Huson, D. H. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT - How do these taxonomies compare?, 18(2), 114. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3501-4>
- Benedetti, M., Vecchi, V., Barera, S., & Dall'osto, L. (2018). Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microbial Cell Factories*, 17, 173. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1019-3>
- Bradley, I. M., Pinto, A. J., & Guest, J. S. (2016). Gene-Specific Primers for Improved Characterization of Mixed Phototrophic Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(19), 5878–5891. <https://doi.org/10.1128/AEM.01630-16>.Editor
- Braida, V., Tartaglia, C., Campot, M. P., & Nervi, E. (2015). Aplicaciones Del Cultivo De Microalgas En Arquitectura Sustentable, 164.
- Brisset, Y., Matias, R., Por La, A., Telma, I., Morales, M. C., Mario, I., & Mére, J. M. (2018). *Evaluación del rendimiento y caracterización fisicoquímica a escala laboratorio de ácidos grasos de interés alimentario de la microalga (Chorella vulgaris) procedente de Amatitlán*. Guatemala. Retrieved from <http://www.repositorio.usac.edu.gt/10911/1/YoselinBrissetRaxónMatias.pdf>
- Bruns, D. E., Ashwood, E. R., & Burtis, C. A. (2007). *Fundamentals of molecular diagnostics*. Saunders Elsevier. Retrieved from [https://books.google.com.gt/books?hl=es&lr=&id=gselc81U5W8C&oi=fnd&pg=PA3&dq=polymerase+chain+reaction+fundamentals&ots=vXf8j6xuMH&sig=kmSSpLwGx84MIRJYm8H5ckTjEr8#v=onepage&q=polymerase chain reaction fundamentals&f=false](https://books.google.com.gt/books?hl=es&lr=&id=gselc81U5W8C&oi=fnd&pg=PA3&dq=polymerase+chain+reaction+fundamentals&ots=vXf8j6xuMH&sig=kmSSpLwGx84MIRJYm8H5ckTjEr8#v=onepage&q=polymerase%20chain%20reaction%20fundamentals&f=false)
- Buendía-Flores, M., Tavera, R., & Novelo, E. (2015). Florística y ecología de diatomeas bentónicas de la zona Lacustre de Xochimilco-Tláhuac, México. *Botanical Sciences*, 3(93), 531–558. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/bs/v93n3/v93n3a11.pdf>
- Castillo, G. De, & Edith, N. (2016). Caracterización y evaluación de la calidad del agua de los principales afluentes de la cuenca del lago de Atitlan, rio Quiscab y rio San Francisco. Retrieved from <http://biblioteca.galileo.edu/tesario/handle/123456789/448>

- Chen, Z., Wang, L., Qiu, S., & Ge, S. (2018). Determination of Microalgal Lipid Content and Fatty Acid for Biofuel Production. <https://doi.org/10.1155/2018/1503126>
- De Lillo, A., Ashley, F. P., Palmer, R. M., Munson, M. A., Kyriacou, L., Weightman, A. J., & Wade, W. G. (2006). Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiology and Immunology*, *21*(1), 61–68. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00255.x>
- Del Carmen, M., & García, C. (2013). PRODUCCIÓN DE MICROALGAS CON APLICACIONES NUTRICIONALES PARA HUMANOS Y ANIMALES. Retrieved from <http://www.publicacionescajamar.es/pdf/publicaciones-periodicas/cuadernos-de-estudios-agroalimentarios-cea/5/5-642.pdf>
- Díaz, J. (2011). Evaluación de pre-factibilidad técnicoeconómica de las potencialidades energéticas de las microalgas que contaminan el Lago Amatitlán, para la obtención de Biodiesel. Retrieved September 11, 2019, from <https://fondo.senacyt.gob.gt/portal/index.php/catalogo/15-codigo/514-49-2009-energia>
- Dineshkumar, R., Subramanian, J., Gopalsamy, J., Jayasingam, P., Arumugam, A., Kannadasan, S., & Sampathkumar, P. (2019). The Impact of Using Microalgae as Biofertilizer in Maize (*Zea mays* L.). *Waste and Biomass Valorization*, *10*(5), 1101–1110. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0123-7>
- Elkins, K. M. (2013). Chapter 4 – DNA Extraction. *Forensic DNA Biology*, (pH 8), 39–52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394585-3.00004-3>
- Frazão, B., & Silva, A. (2018). Molecular tools for phytoplankton monitoring samples, 1–17.
- Freiberg, A., Scharfe, J., Murta, V. C., & Seidler, A. (2018). The Use of Biomass for Electricity Generation: A Scoping Review of Health Effects on Humans in Residential and Occupational Settings. <https://doi.org/10.3390/ijerph15020354>
- Ganesan V, S. H. (2014). Biomass from Microalgae: An Overview. *Oceanography: Open Access*, *02*(01), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2332-2632.1000118>
- García, O. (2017). POE 2 Recolección y preservación de muestras: Análisis físicoquímicos y conteo de plancton.
- Garibay Hernández, A. et al. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*, *13*(3), 38–61. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Biodiesel+a+Partir+de+Microalgas#0%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Biodiesel+a+partir+de+microalgas#0>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol*, *3*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Ge, S., Madill, M., & Champagne, P. (2018). Use of freshwater macroalgae *Spirogyra* sp. for the treatment of municipal wastewaters and biomass production for biofuel applications. *Biomass and Bioenergy*, *111*, 213–223. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2017.03.014>
- Ghayal, M. S., & Pandya, M. T. (2013). Microalgae biomass: A renewable source of energy. *Energy*

- Procedia*, 32, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.05.031>
- Gissibl, A., Sun, A., Care, A., Nevalainen, H., & Sunna, A. (2019). Bioproducts From *Euglena gracilis*: Synthesis and Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 108. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00108>
- Guamán, C., Nory, B., & Romero, P. G. (2016). *Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador*. Retrieved from <http://energia.org.ec/cie/wp-content/uploads/2017/09/Catlogo-de-Microalgas-y-Cianobacterias-del-Ecuador.pdf>
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. M., & Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18s rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624>
- Hayashi, R. (2014). *Gene Expression and the Impact of Antioxidant Supplements in the Cataractous Lens. Handbook of Nutrition, Diet and the Eye*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-401717-7.00052-6>
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Hoffmann, H., Platzer, C., Winker, M., & Muench, E. (2011). Revisión Técnica de Humedales Artificiales de flujo subsuperficial para el tratamiento de aguas grises y aguas domésticas, 38. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Revisión+Técnica+de+Humedales+Artificiales+de+flujo+subsuperficial+para+el+tratamiento+de+aguas+grises#0>
- J, R. Benavente-Váldes, J.C. Montañez, C.N. Aguilar, A. M.-Z. y B. V. (2009). Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. Retrieved April 23, 2019, from <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.7/4.html>
- Jamali, A. A., Akbari, F., Ghorakhlu, M. M., de la Guardia, M., & Yari Khosroushahi, A. (2012). Applications of diatoms as potential microalgae in nanobiotechnology. *BioImpacts : BI*, 2(2), 83–89. <https://doi.org/10.5681/bi.2012.012>
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2008). *DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics*. Washington. Retrieved from [www.ctfs.si.edu/doc/index.php](http://www.ctfs.si.edu/doc/index.php)
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.*, (62), 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Levkov, Z., & Williams, D. M. (2014). Observations on *Caloneis Cleve* (Bacillariophyceae) species from the ancient lakes Ohrid and Prespa. *Nova Hedwigia*, (143), 141–158. <https://doi.org/10.1127/1438-9134/2014/008>
- Loftus, S. (2015). Iniciador o cebador | NHGRI. Retrieved October 3, 2019, from <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Iniciador-o-cebador>


- Lumen. (2018). Types of Microorganisms | Microbiology. Retrieved March 23, 2019, from <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/types-of-microorganisms/>
- Lynn, S. P., Cohen, L. K., Kaplan, S., & Gardner, J. F. (1980). *RsaI: a New Sequence-Specific Endonuclease Activity from Rhodospseudomonas sphaeroides*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 142). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC293981/pdf/jbacter00566-0010.pdf>
- Mateu Romero, C. B. (2015). Estudio Y Dimensionado Experimental De Humedales Artificiales Para La Mejora De La Calidad De Aguas De Cursos Fluviales Eutrofizados, 40.
- Mendoza-Guzmán, H. S., de la Jara-Valido, A., & Portillo-Hahnefeld, E. (2011). *Planta Piloto de Cultivo de Microalgas*.
- Molina-Grima, E., Antonio, J., & Pérez, S. (1993). Cuantificación de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal Water and wastewater treatment/disinfection by homogeneous advanced oxidation processes View project VALORISATION OF WASTEWATER USING MICROALGAE/BACTERIA CONSORTIA View project, 44, 348–353. <https://doi.org/10.3989/gya.1993.v44.i6.1069>
- Moore, D. (1998). Purification and Concentration of DNA Contributed by David Moore, 1–7.
- Naz, S., Aktar, S., Golam, S. M., & Azam, G. (2015). Biofertilizer (*Oscillatoria* sp.) Increases Growth and Yield of Rice (BR-29). *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 5(4), 4199–4204. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/283462556\\_Biofertilizer\\_Oscillatoria\\_sp\\_Increases\\_Growth\\_and\\_Yield\\_of\\_Rice\\_BR-29](https://www.researchgate.net/publication/283462556_Biofertilizer_Oscillatoria_sp_Increases_Growth_and_Yield_of_Rice_BR-29)
- Ochaeta, G. (2014). “Análisis temporal y espacial de la comunidad de fitoplancton en los puntos Panajachel, Centro Weiss G y Santiago en el Lago Atitlán, Sololá, Guatemala, durante el año 2013.” Guatemala. Retrieved from [http://www.repositorio.usac.edu.gt/2134/1/06\\_3688.pdf](http://www.repositorio.usac.edu.gt/2134/1/06_3688.pdf)
- Pachchigar, K., Khunt, A., & Hetal, B. (2011). DNA quantification. *Quality Assurance*, (July 2016), 1–16.
- Parsons, M. L., Okolodkov, Y. B., & Aké-Castillo, J. A. (2012). Diversity and morphology of the species of *Pseudonitzschia* (Bacillariophyta) of the national park sistema arrecifal veracruzano, SW Gulf of Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 98(1), 51–72. <https://doi.org/10.21829/abm98.2012.1140>
- Piñeiro, G. L. (2015). Modelització 2-D d'un fotobiorreactor tubular.
- Promega Corporation. (2017). Quantus™ Fluorometer Operating Manual, 19. Retrieved from <https://www.promega.com/products/fluorometers-luminometers-multimode-readers/fluorometers/quantus-fluorometer/?catNum=E6150>
- Protocol, N. (2017). Overview Introduction to the PCR Barcoding Expansion Pack 1-96, (05386273), 1–58.
- Ramírez, L. G., Queiroz Zepka, L., & Jacob-Lopes, E. (2013). Fotobiorreactor: Herramienta para cultivo de cianobacterias. *Ciencia y Tecnología*, 6(2), 9–19. <https://doi.org/ISSN 1390-4043>
- Recinos, P. E. M., & Ruiz, S. P. (2012). Actividad Biocida y Estudios de toxicidad de extractos de Cianobacterias que se encuentran sobrepoblando el Lago de Atitlán. *Universidad San Carlos de Guatemala*, 1–85.

- Reich, M., & Labes, A. (2017). How to boost marine fungal research: A first step towards a multidisciplinary approach by combining molecular fungal ecology and natural products chemistry. *Marine Genomics*, 36(October), 57–75. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2017.09.007>
- Richardson, C. J. (1994). Ecological functions and human values in wetlands: A framework for assessing forestry impacts. *Wetlands*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/BF03160616>
- Richlen, M. L., & Barber, P. H. (2005). A technique for the rapid extraction of microalgal DNA from single live and preserved cells. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 688–691. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01032.x>
- Robert A. Andersen Ralph A. Lewin. (2019). Algae | Facts, Classification, & Examples | Britannica.com. Retrieved March 29, 2019, from <https://www.britannica.com/science/algae>
- Sajjadi, B., Chen, W. Y., Raman, A. A. A., & Ibrahim, S. (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97(June), 200–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>
- Salazar, J. L. (2015). Tratamiento de Aguas Residuales. Aplicación de Humedales Artificiales.
- Sforza, E., Simionato, D., Giacometti, G. M., Bertucco, A., & Morosinotto, T. (2012). Identification of Algal Strains By Pcr Amplification and Evaluation of Their Fatty Acid Profiles for Biodiesel Production. *PLoS One*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038975>
- Shi, Y., Zhang, G., Liu, J., Zhu, Y., & Xu, J. (2011). Performance of a constructed wetland in treating brackish wastewater from commercial recirculating and super-intensive shrimp growout systems. *Bioresource Technology*, 102(20), 9416–9424. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.058>
- Silhavy, T., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1–16. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857177/pdf/cshperspect-PRK-a000414.pdf>
- Strien, J., Sanft, J., & Mall, G. (2013). Enhancement of PCR amplification of moderate gc-containing and highly GC-rich DNA sequences. *Molecular Biotechnology*, 54(3), 1048–1054. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9660-x>
- Sudeep Chandra, Margaret Dix, Eliška Rejmánková, Virginia Mosquera, N. G. and A. H. (2013). El estado ecológico actual del Lago Atitlán y el impacto de la entrada de aguas residuales: Recomendación para exportación de las aguas residuales de la cuenca para restaurar el Lago, 1–17.
- Terpe, K. (2013). Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(24), 10243–10254. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5290-2>
- Valério, E., Chaves, S., & Tenreiro, R. (2010). Diversity and Impact of Prokaryotic Toxins on Aquatic Environments: A Review. *Toxins*, 2, 2359–2410. <https://doi.org/10.3390/toxins2102359>
- Vega Naranjo, M. de la, & la, M. de. (2014). Aislamiento, caracterización y manipulación genética de microalgas marinas para la producción de compuestos de alto valor añadido. Retrieved from

<http://rabida.uhu.es/dspace/handle/10272/8837>

- Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2009). Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS ONE*, 4(10), 7401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). *Perspective Prokaryotes: The unseen majority* (Vol. 95). Retrieved from [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
- Wilson, J.-J., Sing, K.-W., & Jaturas, N. (2019). DNA Barcoding: Bioinformatics Workflows for Beginners. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, (2012), 985–995. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20468-8>
- Win, T. T., Barone, G. D., Secundo, F., & Fu, P. (2018). Algal Biofertilizers and Plant Growth Stimulants for Sustainable Agriculture. *Industrial Biotechnology*, 14(4), 203–211. <https://doi.org/10.1089/ind.2018.0010>
- Yolotzin, I. (2016). Análisis de efectividad de *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp. en biorremediación de aguas residuales, 1–57. Retrieved from <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5733/1/IAD-2016-T024.pdf>

## XIII. ANEXOS

<b>Universidad del Valle de Guatemala</b> 	<b>Procedimiento Operacional Estándar</b>	<b>POE: 1.0</b> <b>Versión: 1.0</b> <b>Fecha: 24/04/19</b> <b>Páginas Totales: 1-4</b>
	<b>Recolección y preservación de muestras de agua</b>	<b>Autores: Adriana Carrillo</b> <b>Revisado por: Yunuen Soto</b> <b>Aprobado por: Pamela Pennington</b>

### 1. Propósito

- 1.1. Realizar el proceso de toma de muestra del humedal artificial y Lago de Atitlán para análisis posteriores.
- 1.2. Preservar la muestra de agua forma adecuada para su conservación.

### 2. Aplicación

Estos procedimientos son para el muestreo de agua superficial y profunda en lagos y humedales. Los métodos de preservación están diseñados para conservar la integridad de la muestra durante el tiempo necesario hasta su uso.

### 3. Referencias

- Hamilton, P. B., Lefebvre, K. E., & Bull, R. D. (2015). Single cell PCR amplification of diatoms using fresh and preserved samples. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01084>
- Manual, S., Junio, A., Soto, L., Tutor, F., Mart, M., Co-tutora, M., ... Cuscó, A. (2014). Background information on freshwater and marine microalgae and harmful algal blooms (HABs) 1 Purpose and scope. *PLoS ONE*, 7(2), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038975>
- Recolección y preservación de muestras: Análisis fisicoquímicos y conteo de plancton POE-2.
- Shin, H., Lee, E., Shin, J., Ko, S. R., Oh, H. S., Ahn, C. Y., ... Cho, S. (2018). Elucidation of the bacterial communities associated with the harmful microalgae *Alexandrium tamarense* and *Cochlodinium polykrikoides* using nanopore sequencing. *Scientific Reports*, 8(1), 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23634-6>.
- UVG. 2010. Métodos de Análisis, Laboratorio de Análisis y Monitoreo, Centros de Estudios Atitlán, Universidad del Valle de Guatemala Altiplano.

### 4. Terminología y abreviaciones

- 4.1 Metros (m)
- 4.2 Grados centígrados (°C)
- 4.3 Mililitros (mL)
- 4.4 Gramos (g)
- 4.5 Molar (M)
- 4.6 Minutos (min)
- 4.7 Micrometros (µm)
- 4.8 RNAlater: Solución de estabilización de ARN para su almacenamiento sin poner en peligro la calidad o cantidad de ARN obtenida.
- 4.9 Botella van Dorn: Es un dispositivo de plástico (usualmente PVC o PP) que sirve para extraer muestras de las profundidades de un cuerpo de agua. Las tapas son herméticas para evitar pérdidas o contaminaciones con otros estratos. Está equipada con un dispositivo cerrado que se dispara al enviar un “mensajero” por la cuerda. (García, 2017)

## 5. Principio

La recolección de muestras de agua y su preservación para su posterior análisis es fundamental en el estudio limnológico. Una incorrecta técnica de recolección de muestras puede alterar el resultado en análisis fisicoquímicos y biológicos. Por lo mismo, es recomendable que antes de la utilizar la muestra se debe de agitar vigorosamente. La solución de RNAlater es un reactivo de almacenamiento de tejido acuoso y no tóxico que impregna rápidamente los tejidos para estabilizar y proteger el ARN celular, además este minimiza la necesidad de procesar inmediatamente muestras de tejido para su posterior procesamiento.

## 6. Documentos asociados

Danielson, T. J. (2014) Protocols for Collecting Water Grab Samples in Rivers, Streams, and Freshwater Wetlands. Available at: [https://www.maine.gov/dep/water/monitoring/biomonitoring/materials/sop\\_watergrab.pdf](https://www.maine.gov/dep/water/monitoring/biomonitoring/materials/sop_watergrab.pdf) (Accessed: 2 September 2019).

## 7. Seguridad

Además de las consideraciones generales de seguridad en el campo y en el laboratorio, deben considerarse las siguientes normas como importantes y obligatorias:

- Siga las instrucciones de cada uno de los equipos utilizados en campo.
- No sumerja ningún equipo al agua mientras la embarcación está en movimiento.
- Mantener las áreas de trabajo del laboratorio despejadas y limpias para poder realizar un trabajo seguro y eficiente.
- Apagar todos los equipos.
- Evitar el contacto directo con productos químicos. Usar guantes y cambiarlos si se dañan.
- Usar bata de laboratorio de manga larga, abotonada y el uso de elementos adecuados que protejan los ojos, los cuales son obligatorios.
- No usar pañuelos, bufandas, joyas y demás accesorios que puedan engancharse en los equipos y elementos de trabajo.
- El cabello debe permanecer recogido.
- Usar zapatos cerrados.
- Dejar las cosas personales en un lugar apropiado, para no interrumpir áreas de trabajo.

## 8. Equipos materiales y reactivos

### 8.1 Reactivos

- 8.1.1 Agua desmineralizada
- 8.1.2 RNAlater
- 8.1.3 NaOH
- 8.1.4 EDTA
- 8.1.5 Etanol absoluto
- 8.1.6 Etanol 70%
- 8.1.7 Isopropanol
- 8.1.8 Lugol
- 8.1.9 Sulfato de amonio
- 8.1.10 Citrato de sodio dihidratado

### 8.2 Cristalería

- 8.2.1 40 botes plásticos de 300 mL autoclaveados

### 8.3 Materiales y equipo

- 8.3.1 Botella van Dorn y mensajero
- 8.3.2 Lazo o cuerda graduada
- 8.3.3 Manguera de hule (que se ajuste a la salida de la botella van Dorn)
- 8.3.4 Paquetes de hielo
- 8.3.5 Hielera

- 8.3.6 Guantes de nitrilo
- 8.3.7 Filtros Whatman

## 9. Procedimiento

Previo a salir a campo se debe preparar el material y equipo de campo que va a utilizar. Para asegurarse que todos los materiales y equipos se encuentran antes de salir se debe revisar la lista de cotejo (check list). Para análisis fisicoquímicos la muestra se mantiene inalterada y solamente se conserva en oscuridad a 4 °C (aprox.).

### 9.1 Etiquetado y rotulación de recipientes para muestras

- 9.1.1 Antes de salir a campo se recomienda etiquetar y rotular los recipientes que se utilizarán para coleccionar las muestras.
- 9.1.2 Es recomendable el uso de doble etiqueta: una etiqueta con cinta adhesiva y otra con marcador permanente en cada botella de muestreo.
- 9.1.3 La codificación e identificación de cada sitio muestreado queda a discreción de los interesados, sin embargo, existe información básica que cualquier etiqueta debería incluir: fecha de muestreo, profundidad de muestreo y tipo de preservante utilizado (si aplica).

### 9.2 Muestreo con la botella van Dorn para muestras de lagos

- 9.2.1 Abrir las tapas de la botella van Dorn como corresponda según sea el modelo del equipo.
- 9.2.2 Sumergir la botella a la profundidad que desea muestrear (la cuerda debe estar marcada al menos a las profundidades que desea muestrear). Antes de iniciar a sumergir la botella, asegurarse que las tapas no estén obstruidas por la cuerda, que el mensajero (peso que se envía, guiado por la cuerda, a la botella para activar el mecanismo de cerrado) permanezca en su poder y que la botella esté bien anudada a la cuerda.
- 9.2.3 Enviar el mensajero y esperar hasta que llegue a la botella y se active el dispositivo de seguridad y se cierren las tapas.
- 9.2.4 Regresar la botella a superficie y extraer muestra.
- 9.2.5 Lavar un par de veces la botella antes de tomar la muestra definitiva. Desechar el agua de enjuague aguas abajo (unos 2 o 3 m) del sitio que muestrea.
- 9.2.6 Para el estudio se recolectarán 300mL.
- 9.2.7 Para recolectar muestra de superficie llenar el bote sumergiéndolo lateralmente con la boca en dirección de la corriente.
- 9.2.8 Almacenar la muestra en una hielera y transportar a 4°C aproximadamente para su posterior análisis.

### 9.3 Muestreo con botellas para muestras de humedales

- 9.3.1 Sujetar la botella con una mano alrededor de la base y retirar la tapa con la otra mano.
- 9.3.2 Lavar un par de veces la botella antes de tomar la muestra definitiva. Desechar el agua de enjuague aguas abajo (unos 2 o 3 m) del sitio que muestrea.  
*Para el estudio se recolectarán 300mL.*
- 9.3.3 Invertir la botella completamente y sumergirlo a una profundidad de 0.2m por debajo de la superficie.
- 9.3.4 Girar la boca de la botella hacia arriba y hacia la corriente.
- 9.3.5 Al estar llena la botella, retirarla del agua rápidamente y volver a colocar la tapa.  
*Tener cuidado de no tocar el cuello de la botella. Usar guantes.*
- 9.3.6 Almacenar la muestra en una hielera y transportar a 4°C aproximadamente para su posterior análisis.

### 9.4 Preservación de muestras

- 9.4.1 Colocar 50 mL de muestra en tubos falcon.
- 9.4.2 Realizar filtración con Whatman
  - 9.4.2.A Lavar embudo con etanol 70%
  - 9.4.2.B Lavar con cloro
  - 9.4.2.C Lavar con agua estéril*En cada muestra lavar de la misma manera para esterizarlo.*
- 9.4.3 Centrifugar a 15,000rpm por 15 min. Eliminar sobrenadante.
- 9.4.4 Agregar RNAlater según el peso.  
*Agergar 2.5mL por cada 0.5g de muestra.*
- 9.4.5 Agitar para mezclar.
- 9.4.6 Mantener a temperatura ambiente durante 24h.
- 9.4.7 Almacenar a 4°C.

#### **9.5 Preparación de botes y frascos para conservación de plancton**

- 9.5.1 Agregar 46 mL de muestra a un falcon de 50 mL.
- 9.5.2 Agregar 4 mL de Lugol.
- 9.5.3 Colocar en frío.


#### **10. Cálculos N/A**

#### **11. Control de calidad**

- 11.1. Tener guantes todo el tiempo.
- 11.2. Autoclavear materiales

#### **12. Reporte de datos y documentos utilizados**

#### **13. Reporte N/A**

<p style="text-align: center;"><b>Universidad del Valle de Guatemala</b></p> 	<b>Procedimiento Operacional Estándar</b>	<b>POE: 2.0</b> <b>Versión: 1.0</b> <b>Fecha: 15/04/19</b> <b>Páginas Totales: 1-5</b>
	<b>Extracción de ADN por medio de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico</b>	<b>Autores: Adriana Carrillo</b> <b>Revisado por: Yunuen Soto</b> <b>Aprobado por: Pamela Pennington</b>

### 1. Propósito

- 1.1. Extraer ADN de distintas muestras de agua natural y artificial mediante Kit y métodos convencionales.
- 1.2. Verificar calidad por medio de NanoDrop.
- 1.3. Verificar la integridad de ADN por medio de un gel de agarosa 0.8%.

### 2. Aplicación

- 2.1. El ADN extraído se puede utilizar para determinar si la concentración e integridad de este es la adecuada para el uso para secuenciación de tercera generación.

### 3. Referencias

Band-Schmidt, C. J., Lilly, E. L., & Anderson, D. M. (2003). Identification of *Alexandrium affine* and *A. margalefii* (Dinophyceae) using DNA sequencing and LSU rDNA-based RFLP-PCR assays. *Phycologia*, 42(3), 261–268. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-42-3-261.1>

Jagielski, T., Gawor, J., Bakula, Z., Zuchniewicz, K., Zak, I., & Gromadka, R. (2017). An optimized method for high quality DNA extraction from microalga *Prototheca wickerhamii* for genome sequencing. *Plant Methods*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0228-9>

Price, G. D., Stultemeyer, D., Klughammer, B., Ludwig, M., & Badger, M. R. (1998). The functioning of the CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: A review of general physiological characteristics, genes, proteins, and recent advances. *Canadian Journal of Botany*, 76(6), 973–1002.

Promega. (2015). *QuantiFluor® dsDNA System QuantiFluor® dsDNA System'*, Technical Manual.

Richlen, M. L., & Barber, P. H. (2005). A technique for the rapid extraction of microalgal DNA from single live and preserved cells. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 688–691. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01032.x>

Sigma Aldrich. (1989). Phenol:chloroform: isoamyl alcohol, 3, 3803.

### 4. Terminología y abreviaciones

- 4.1. NA: Nuclei acid (ácidos nucleicos).
- 4.2. PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).
- 4.3. RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction (Transcriptasa reversa de la Reacción en cadena de la polimerasa).

## 5. Principio

El método de extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico se basa en la solubilidad del ADN, proteínas y lípidos en solventes orgánicos.

## 6. Documentos asociados

Thermo Scientific. (2004). NanoDrop Spectrophotometers: 260/280 and 260/230 Ratios. *NanoDrop Prod.* Delaware: Thermo Fisher Scientific Inc. <https://doi.org/10.1002/jobm.19770170116>.

Promega. (2015). QuantiFluor® dsDNA System QuantiFluor® dsDNA System. Technical Manual.

Stockinger. (2001). Phenol Preparation (Buffering) Procedure: (1) Remove the crystalline phenol from the -20, (1), 1-2.

Winnepenninckx, B., & Harvesting, C. (2009). CTAB extraction buffer. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10), pdb.rec11984-pdb.rec11984. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec11984>

## 7. Seguridad

7.1. Utilizar siempre guantes, bata y zapatos cerrados.

7.2. Es importante que al momento de realizar este procedimiento no se esté hablando ya que la inhalación de los reactivos puede causar irritación de las fosas nasales.

## 8. Equipos materiales y reactivos

### 8.1. Equipos

8.1.1. Vortex

8.1.2. Soporte magnético

8.1.3. Nano-Drop

8.1.4. Shaker

8.1.5. Balanza analítica

### 8.2. Materiales

8.2.1. Micropipetas de 1000 uL, 100/200 uL, 10 uL con sus respectivas puntas.

8.2.2. Descarte de desechos biológicos.

8.2.3. Tubos eppendorf libres de nucleasas/estériles de 2.0mL

8.2.4. Gradilla de tubos falcon y gradilla de tubos eppendorf de 2.0mL

8.2.5. Guantes

### 8.3. Reactivos

8.3.1. Fenol

8.3.2. Cloroformo

8.3.3. Alcohol isoamílico

8.3.4. CTAB

8.3.5. Proteinasa K

8.3.6.  $\beta$ -mercaptoetanol

8.3.7. Etanol 70%

8.3.8. Isopropanol

## 9. Procedimiento

### 9.1. Extracción de ADN fenol:cloroformo:alcohol isoamílico

9.1.1. Incubar a 60°C el buffer de lisis CTAB con 0.2% de  $\beta$ -mercaptoetanol y proteinasa K

9.1.2. Centrifugar las muestras a 5,500rpm por 15 minutos.

9.1.3. Quitar sobrenadante.

9.1.4. Agregar 1mL buffer de lisis CTAB con 0.2% de  $\beta$ -mercaptoetanol y proteinasa K a la muestra.

9.1.5. Dejar digerir por 1 hora a 60°C.

- 9.1.6. Macerar muestras con pistilos estériles
- 9.1.7. Añadir 1mL fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar
- 9.1.8. Centrifugar velocidad máxima a 4°C por 10 minutos.
- 9.1.9. Pasar la parte acuosa a un tubo de 2mL.
- 9.1.10. Añadir 1mL de isopropanol frío.
- 9.1.11. Incubar por 1 hora a -20°C.
- 9.1.12. Centrifugar por 15 minutos a 4,000xg.
- 9.1.13. Descartar sobrenadante.
- 9.1.14. Realizar lavados con etanol 70% (2 veces).
- 9.1.15. Realizar una centrifugación a máxima velocidad a 4°C por 5 min.
- 9.1.16. Resuspender pellet en 50uL de TE.  
*La cantidad de buffer TE depende del tamaño del pellet.*

## 9.2. Cuantificación de ADN por NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific)

- 9.2.1. Encender el NanoDrop™ y colocar dsDNA para medir.
- 9.2.2. Colocar 2uL de blanco y seleccionar “Blank”.  
*Limpiar con kimwipe.*
- 9.2.3. Colocar 2uL de muestra y seleccionar “Measure”.  
*Limpiar con kimwipe en cada medición.*

## 9.3. Cuantificación de ADN por QuantiFluor® One dsDNA System

- 9.3.1. Colocar los reactivos a temperatura ambiente antes de usar
- 9.3.2. Preparación de blanco
  - 9.3.2.1. Agregar 200uL de tinte dsDNA QuantiFluor ONE a un tubo de PCR.  
*Proteger de luz.*
- 9.3.3. Preparación de estándar de 400ng
  - 9.3.3.1. Agregar 1uL del estándar de ADN QuantiFluor ONE Lambda (400ug/mL) a 200uL de tinte dsDNA QuantiFluor ONE en un tubo de PCR.  
*Vortexear y proteger de la luz. Para minimizar el error de pipeteo agregar 2uL del estándar de ADN a 400uL de tinte dsDNA QuantiFluor ONE.*
- 9.3.4. Preparación de muestra desconocida
  - 9.3.4.1. Agregar 1-20uL de muestra a 200uL de tinte dsDNA QuantiFluor ONE en tubos de PCR.  
*Si se agregarn 2 uL de muestra agregar 200uL de dsDNA. Vortexear y proteger de luz.*
  - 9.3.4.2. Incubar las muestras durante 5 minutos, protegidas de la luz.
  - 9.3.4.3. Seleccionar el protocolo ONE DNA en el fluorómetro Quantus™  
*Calibrar el fluorómetro si es necesario con el blanco y estándar (preparado en el paso 9.2.2. y 9.2.3.) en la pantalla calibración y seleccionar guardar.*
  - 9.3.4.4. Ingresar el volumen de la muestra desconocida previamente preparada y las unidades de concentración deseadas.
  - 9.3.4.5. Medir la fluorescencia de la muestra desconocida.

## 10. Cálculos

- 10.1. **Determinación de la concentración de muestras**  
 $ug\ RNA\ mL = A_{260} * factor\ de\ dilución * 40$


## 11. Control de calidad

- 11.1. Usar guantes en todo momento y cambiarlos con frecuencia.
- 11.2. Usar puntas libres de Rnasas para manejar las soluciones.

## 12. Reporte de datos y documentos utilizados

Para presentar los resultados se utilizará un cuadro donde se indique el nombre de la muestra, fecha de extracción, número de réplicas, valor de concentración obtenido por el Nano-Drop (ng/uL), absorbancia a 260/280 y 260/230.

## 13. Reporte N/A

<p style="text-align: center;"><b>Universidad del Valle de Guatemala</b></p> 	<b>Procedimiento Operacional Estándar</b>	<b>POE: 3.0</b> <b>Versión: 1.0</b> <b>Fecha: 15/04/19</b> <b>Páginas Totales: 1-6</b>
	<b>PCR de marcadores universales de eucariotas (18S ADNr) y procariotas (16S ADNr) por medio del kit Platinum II Hot-Start PCR Master Mix(2x)</b>	<b>Autores: Adriana Carrillo</b> <b>Revisado por: Yunuen Soto</b> <b>Aprobado por: Pamela Pennington</b>

## 1. Propósito

- 1.1. Confirmar la presencia microorganismos eucariotas y procariotas.
- 1.2. Verificar la integridad de ADN por medio de un gel de agarosa 0.8%.
- 1.3. Utilizar productos de la PCR para la secuenciación de tercera generación.

## 2. Aplicación

La PCR es un ensayo enzimático que permite la amplificación de un fragmento de ADN específico. Es un proceso simple y ampliamente utilizado en el que se acumulan cantidades diminutas de ADN, este demuestra cuantitativamente la cantidad de una secuencia en particular está presente. El futuro de la PCR es prometedor, ya que combina varios ensayos y enfoques para producir una mejor comprensión de varias combinaciones de genes (Garibyan & Avashia, 2013).

## 3. Referencias

- Auinger, B. M., Pfandl, K., & Boenigk, J. (2008). Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in Lugol's iodine solution: Combining microscopic analysis with single-cell PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2505–2510. <https://doi.org/10.1128/AEM.01803-07>
- Bradley, I. M., Pinto, A. J., & Guest, J. S. (2016). Gene-Specific Primers for Improved Characterization of Mixed Phototrophic Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(19), 5878–5891. <https://doi.org/10.1128/AEM.01630-16>.Editor

Sigma Aldrich. (1989). Phenol:chloroform: isoamyl alcohol, 3, 3803.

## 4. Terminología y abreviaciones

- 4.1. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

## 5. Principio

La PCR es un ensayo enzimático que permite la amplificación de un fragmento de ADN específico. Cada ensayo de PCR requiere la presencia de plantilla de ADN, cebadores, nucleótidos y ADN. La clave para el buen funcionamiento de la amplificación es la ADN polimerasa esta es una enzima que une nucleótidos individuales para formar el producto final, además son importantes los cebadores los cuales son fragmentos cortos de ADN objetivo que es detectado y amplificado estos sirven como punto de extensión para que la ADN polimerasa construya el fragmento. Esto se puede realizar en tubo de ensayo o en placas para luego colocarlos en una máquina llamada termociclador que permite que se produzcan ciclos repetidos de amplificación de ADN en tres pasos: Desnaturalización, alineamiento y extensión. El primer paso se calienta la solución por encima del punto de fusión de las dos cadenas complementarias del ADN objetivo, que permite que las cadenas se separen, el segundo paso se baja la temperatura para permitir que los cebadores específicos se unen a los segmentos de ADN objetivo y por último la temperatura se eleva de nuevo, en donde la

ADN polimerasa es capaz de extender los cebadores agregando nucleótidos a la cadena de ADN en desarrollo. Cada repetición de estos tres pasos, el número de moléculas de ADN copiadas se duplica (Garibyan & Avashia, 2013).

## 6. Documentos asociados

Metfies, K., Berzano, M., Mayer, C., Roosken, P., Gualerzi, C., Medlin, L., & Muyzer, G. (2007). An optimized protocol for the identification of diatoms, flagellated algae and pathogenic protozoa with phylochips. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 925–936. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01799.x>

Potvin, M., & Lovejoy, C. (2009). PCR-based diversity estimates of artificial and environmental 18S rRNA gene libraries. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(2), 174–181. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00386.x>

Rasoul-Amini, S., Ghasemi, Y., Morowvat, M. H., & Mohagheghzadeh, A. (2009). PCR amplification of 18S rRNA, single cell protein production and fatty acid evaluation of some naturally isolated microalgae. *Food Chemistry*, 116(1), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.025>

## 7. Seguridad

Usar doble guantes y bata de laboratorio especial para trabajar con bromuro de etidio.

## 8. Equipos materiales y reactivos

### 8.1. Equipo y materiales

- 8.1.1. Micropipetas de 10, 100, 1000  $\mu$ l
- 8.1.2. Puntas para micropipetas estériles de 10, 100, 1000  $\mu$ l
- 8.1.3. Tubos eppendorf para PCR
- 8.1.4. Microcentrífuga
- 8.1.5. Termociclador
- 8.1.6. Gradilla para microtubos
- 8.1.7. Hielo o gradillas frías
- 8.1.8. Cámara de electroforesis
- 8.1.9. Transiluminador UV
- 8.1.10. Microondas

### 8.2. Reactivos

- 8.2.1. ADN extraído por medio de diferentes métodos
- 8.2.2. Cebador retrasado y adelantado 16S
- 8.2.3. Cebador retrasado y adelantado 18S
- 8.2.4. Loading buffer
- 8.2.5. Escalera 100pb TrackIt
- 8.2.6. Buffer TBE 1X
- 8.2.7. Agarosa
- 8.2.8. Bromuro de etidio

## 9. Procedimiento

### 9.1. Reacción de PCR

- 9.1.1. Estimar el volumen para realizar la reacción.
- 9.1.2. Recordar incluir un blanco y una reacción extra por error de pipeteo. Excluir el volumen de ADN cuando se haga cálculos para la reacción.
- 9.1.3. Utilizando las concentraciones de la extracción de ADN, realizar los cálculos correspondientes para preparar 25 $\mu$ L.

- 9.1.4. Realizar la mezcla de reacción dentro de campana que se debe de desinfectar previamente con etanol 70%. Una vez desinfectada la campana, desinfectar también micropipetas de cada volumen y parte externa de una caja de puntas estériles de cada tamaño e introducir las a la campana. Irradiar con luz UV por 15-20 min.
- 9.1.5. Descongelar 5 minutos antes de utilizar los reactivos de la reacción.  
*Usar guantes para manipulación de reactivos.*
- 9.1.6. Agregar los reactivos de la reacción en un tubo, comenzando con agua, Platinum II Hot-Start PCR Master Mix(2x), Platinum GC Enhancer y cebadores.
- 9.1.7. Mezclar bien la reacción con pipeta y agregar 24uL en cada tubo de 0.2mL previamente rotulados con el número de muestra.
- 9.1.8. Al terminar de repartir la reacción, retirar todos los reactivos y tubos de la campana. Colocar dentro de campana el ADN y agregar a cada tubo 1uL de ADN. Mezclar bien y centrifugar (spin down) antes de llevar al termociclador para que la mezcla de reacción no se quede en las paredes del tubo.
- 9.1.9. Dejar un tubo con 24µl de la reacción sin ADN, como control negativo del PCR.
- 9.1.10. Correr en termociclador.

Cuadro 1. Reacción de PCR mediante Platinum™ II Hot-Start PCR Master Mix (2X) (Invitrogen)

Reactivo	Concentración	1x	11x
Agua	-	4.5	49.5
Platinum II	1	12.5	137.5
Enhancer	1	5	55
F	0.4	1	11
R	0.4	1	11
ADN	-	1	11
Total	-	25uL	-

Cuadro 2. Condiciones termociclador PCR 16S

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2min	1
Desnaturalización	94°C	15s	30
Alineamiento	45-68°C	15-60s	
Extensión	68°C	1min	
Extensión final	72°C	5min	1
Hold	4°C	∞	-

Cuadro 3. Reacción de PCR 18 S

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	8 reacciones
Agua	-	-	-
Buffer PCR	10 $\mu$ M	1	8
Cloruro de Magnesio	25mM	-	
dNTP's	10 $\mu$ M	0.2mM	1.6
Primer Fwd	10 $\mu$ M	0.5mM	
Primer Rev	10 $\mu$ M	0.5mM	
Taq polimerasa	5U/ $\mu$ L	1.25U	10
ADN	ng/ $\mu$ L	5.00 $\mu$ L	-
Volumen total	-	50 $\mu$ L	-

Cuadro 4. Condiciones termociclador PCR 18S cebadores Ek82\_F y Proto5\_R

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	1min	10
Alineamiento	52°C	1min	
Extensión	72°C	2min	
Extensión final	72°C	5min	1
Hold	4°C	$\infty$	-

Cuadro 5. Condiciones termociclador PCR 18S cebadores V4\_F y V4\_R

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	30s	23
Alineamiento*	70°C	45s	
Extensión	72°C	10min	
Desnaturalización	94°C	30s	20
Alineamiento	50°C	45s	

Extensión	72°C	1min	
Extensión final	72°C	5min	1
Hold	4°C	∞	-

\*Alineamiento: Se bajo un 1°C en cada ciclo para cumplir los 23 ciclos.

## 9.2. Electroforesis en gel de agarosa

- 9.2.1. Preparar gel de agarosa 0.8% en buffer TAE 1X. Se necesita un volumen total de 30mL.
- 9.2.2. Pesar la cantidad calculada de agarosa directamente en el erlenmeyer de 125mL. Agregar 30mL de TAE 1X. Agitar suavemente.  
*Repetir el procedimiento para preparar una segunda mezcla para gel.*
- 9.2.3. Calentar la mezcla en microondas durante aproximadamente 1min, en intervalos de 15s. Después de cada intervalo debe agitar cuidadosamente la mezcla, manipularlo con precaución ya que la mezcla y el vapor están calientes.
- 9.2.4. Esperar a que la temperatura disminuya y agregar 2 µl de bromuro de etidio y colocar gel sobre la canasta con el peine.
- 9.2.5. Verter la mezcla en la cama de polimerización y colocar el peine. Dejar polimerizar a temperatura ambiente por aproximadamente 20-30min.
- 9.2.6. Realizar mapa de carga de las muestras. Recordar incluir un pozo para escalera.
- 9.2.7. Una vez polimerizado el gel, remover el peine y agregar buffer TAE 1X hasta cubrirlo.  
*Asegurarse que esté colocado en dirección de negativo a positivo.*
- 9.2.8. Cargar 7µl de escalera en el primer pozo.
- 9.2.9. En los demás pozos cargar 6µl de los productos de PCR y de los controles.
- 9.2.10. Correr a 100V por 30 minutos.  
*Estar atento para que la corrida no se salga del gel, de ser necesario apagar la cámara antes de que transcurran los 30 minutos.*

## 10. Cálculos

Gel de agarosa 0.8% en buffer TAE

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100\%V_1 = 0.8\%(30 \text{ TAE})$$

$$V_1 = 0.36g \text{ de agarosa}$$

## 11. Control de calidad

Se esperan bandas para 16S 1,400pb y para 18s 1,600pb.

## 12. Reporte de datos y documentos utilizados

Anotar el mapa de carga del gel y anotar los tamaños obtenidos de los fragmentos.

## 13. Reporte

N/A

Figura 41. Diagrama de dispersión de dos métodos de cuantificación en muestras frescas del humedal artificial.

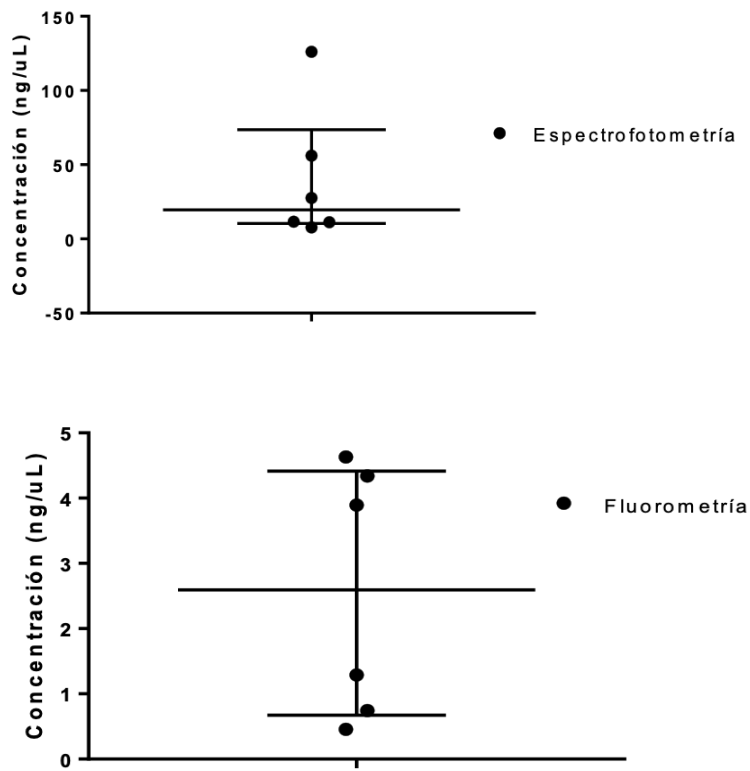


Figura 42. Diagrama de dispersión de dos métodos de cuantificación en muestras congeladas del humedal artificial.

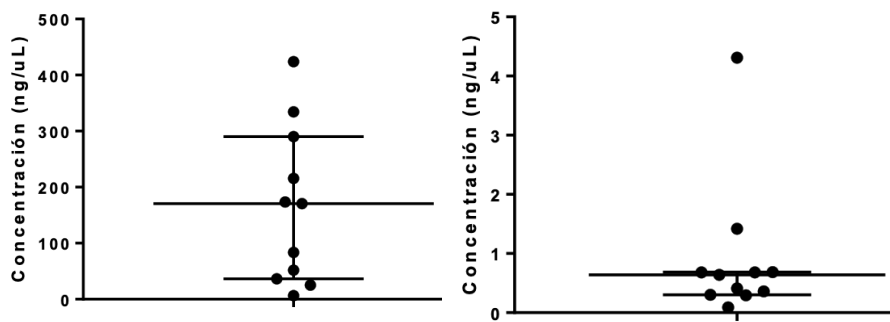


Figura 43. Diagrama de dispersión de dos métodos de cuantificación en muestras frescas del centro del Lago Atitlán.

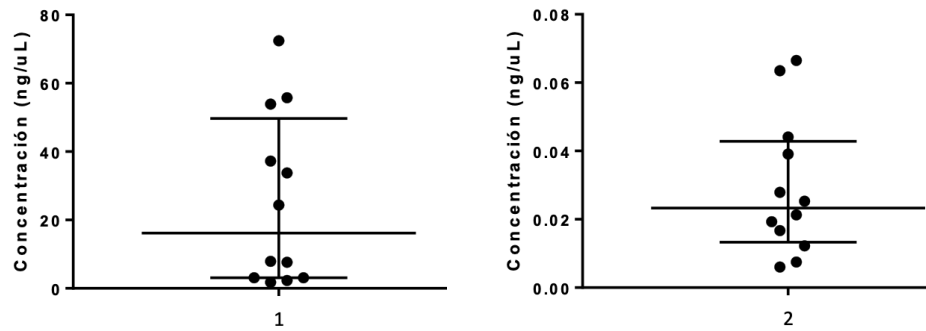


Figura 44. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Nitzschia sp.* por el programa Cluster Muscle

```
PrimerF -----CCAGCASCYGC GG
PrimerR -----
Secuencia ACAATTTAAACCCCTTATCGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGG
```

```
PrimerF TAATTCC-----
PrimerR -ACTTTCG-----
Secuencia TAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGAT
          *  * * *
```

```
PrimerF -----
PrimerR -----
Secuencia TTGTGGCTGTGCGGTGCGGCCTGACACTTGTGTTAGTGTGTTGCTTGCGTCGCCATCCTT
```

```
PrimerF -----
PrimerR -----
Secuencia GGGTGGAACTGTGTGGCATTAGGTTGTCGTGCAGGGGATGCCCATCGTTTACTGTGAAA
```

```
PrimerF -----
PrimerR -----
Secuencia AAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTATGCCGTTGAATATATTAGCATGGAATAATGAGAT
```

```
PrimerF -----
PrimerR -----
Secuencia AGGACCTTGGTACTATTTTGTGTTGTTGCGCACCATGGTAATGATTAATAGGGACAGTTG
```

```
PrimerF -----
PrimerR -----
Secuencia GGGGTATTCGTATTCCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTTTGGAAGACGAACTACT
```

```
PrimerF -----
PrimerR -----
```

```

Secuencia GCGAAAGCATTACCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGA

PrimerF -----
PrimerR -----
Secuencia TGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACAAGGGATTGGCGGAGTCT

PrimerF -----
PrimerR -----
Secuencia CGTTTTGTCTCCGTCAGCACCTTATGAGAAATCACAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAGTA

PrimerF -----
PrimerR -----
Secuencia TGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTG

PrimerF -----
PrimerR -----
Secuencia CGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACA

PrimerF -----
PrimerR -----TTCTTGAT-----
Secuencia GATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGA

```

Figura 45. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Nitzschia sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF -----CCAGCASCYCGG
PrimerR -----
secuencia AACAATTTAAACCCCTTATCGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCG

PrimerF GTAATTCC-----
PrimerR --ACTTTC-----
secuencia GTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGA
      * * * *

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TTTGTGGCGTTCGCGTGCGCCCTGCATTCGTGCCGGTGCTTGTAGCGACGCCATCCTT

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GGGTGGAATCTGTGTGGCATTAAAGTTGTCGTGCAGGGGATGCCATCGTTTACTGTGAAA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia AAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCGTTGAATATATTAGCATGGAATAATAAGAT

PrimerF -----
PrimerR -----GTTCTTGAT
secuencia AGGACCTTGGTACTATTTTGTGGTTTGGCGACCAACGGTAATGATTAAT

```

Figura 46. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Euglena sp.* por el programa Cluster Muscle

PrimerR -----ACTTTTCG-----  
 PrimerF -----CCAGCASCYGCGGTAATTCC-----  
 Secuencia TTATGAGTAGCCACTGGAGAGCAAGTCTGGTGCCAGCAGTTGCGGTAATTCCAGCTCCGA  
\* \* \* \*

PrimerR -----  
 PrimerF -----  
 Secuencia GTGCGTATGCTGTCATTGCTGCTGTTAAAGCGCTCGTAGTCAGACAATGGGTTGCAGGGA

PrimerR -----  
 PrimerF -----  
 Secuencia CCGTGTAGCCACGCAGGCCAGTGGGCTCCCAGATGCCCTGTGCGGATGGTCCCATCGGA

PrimerR -----  
 PrimerF -----  
 Secuencia CAACCCAGCAGCTGCACGTGACCCACGTCCCTCGGCAACGAGGACGTCTCTCTGCTTCCC

PrimerR -----  
 PrimerF -----  
 Secuencia ACAGCTCAGTCTGCTGCATCGGCTCACCCGTGGGCTCGGTGCACGCAGTCTGGATGGCAT

PrimerR -----  
 PrimerF -----  
 Secuencia GATGTGCTCTTGCTGCAAGCGCCCTTTACTGGACCCTGAGGCGGTGATGCTCACAACGCT

PrimerR -----  
 PrimerF -----  
 Secuencia AGTCATTGGCAACAGTCCGTGTGGAACCACGACCCCGTGTCTGGAAGCCCAGATCCACAC

PrimerR -----  
 PrimerF -----  
 Secuencia CAGCCAGCCCTCAGAGCCTGCCATCTTTGTCACTCTGGTGAAAGCAGTGTGCTCCAAGCG

PrimerR -----  
 PrimerF -----  
 Secuencia TCCCAACCGAAGTCCCCCGCTCGAAGGCCGGGGACCCTCAGTCAAGGCCGAATGTGCAA

PrimerR -----  
 PrimerF -----  
 Secuencia CCAGTGAATGCCAACACACGACCGCGTGAGGCAATGCTTGTGCCGGTCTTGAGACCCGC

PrimerR -----  
 PrimerF -----

```

Secuencia GACTTGGGTAGTGTGGCTGGGGGAACCGGGACTGGTTCGCTCCTCGCAGAGGACGAGC

PrimerR -----
PrimerF -----
Secuencia CTGACGCGTGCTTCCCTGTCCCAGCCACTCGATCCCGGATGGGATGCAGCCTCACGGGGT

PrimerR -----
PrimerF -----
Secuencia GAAGGGAACCTTTGTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCAATGAGACCACCTGAGGCGA

PrimerR -----
PrimerF -----
Secuencia AGGCTCTTCGACCAACTAGCCTGTCTCTCTCGATCAAGAATGGCAGTTTGGGGAGCCAAG

PrimerR -----
PrimerF -----
Secuencia ATGATCAGACACCGTCGTAGTCCAGCGCCGTAACCGTACCATCCGAGTCCTGCAGCTAT

PrimerR -----
PrimerF -----
Secuencia GCGTGCTTCCCATTGCCCCAGGACTCACACCCCTGACCGAGAGAATCCCAAGCGGGTCCA

PrimerR -----
PrimerF -----
Secuencia GGGGGGAGTACAGTCGCAAGGCAGAAACTTAAAGGAATTGACGGAGTGGCACCACAAGGC

PrimerR -----
PrimerF -----
Secuencia GTGAAGTATGCGGCTTAATTTGACTCAACGCGGGGAATGTTACTAGGCCAGCACATGGCA

PrimerR -----TTCTTGAT-----
PrimerF -----
Secuencia AGGATGGACAGACTGAGAGCTCTTTTTTGATCCCGTGGACGGTGGTGCATGGCCGCTACT

```

Figura 47. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Euglena sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF -----CCAGCASCYGCGGTAATTCC-----
PrimerR -----ACTTTTCG-----
secuencia CCGTGATGAGTATCAACTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCTGCGGTAATTCCAGCTC
                                                    * * * *
PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CAAGGGCGTATACTGACATTGCTGCTGTTAAAGCGCTTGTAGTCTGCCACTGGGATTTCAG

```

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia GTCTGACAGGTGGCTGGTGGGCCTGTGGGCCCCCGGTGGTCTGGGCACTGCCCCCGCGC

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia AGGGCCCTGCCGCCTGGGTGGTCTGCAGAGTCCGCTGGAACACAACCCCTGGCAGTATGC

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia TCCTGATCCCGTTCCAAGGATGGTGGAGACCTGCTCCCGCATGAAGTCTCCTTCAGTGGAG

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia ATCAAGGCAAGTGATGCACCCTACCCTTGCTAGTGGACGATCCGGGGGTGCGGGCCCCGT

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia GCCCGCACAGCACAACCCCTGTCCCACTACAGGAGCCCACCATCGGAGACACCGTGGAAA

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia ACTCAGTGTGCTCAAAGCAACCAGTCCTGGCTGAATGCCTATCCATGGGATGTCAAAGCA

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia TCGACCAAATGTGGCCTGTGAGAGTTGTGCCGGGCCTTGGAGCCCATTGCAATGGAGAAC

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia CTGGTGTGTTGTACCCCGGCTCGTTCCCTGAGGGCTTCCCTGTGATGTCCCGACGGGGCC

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia TGTCGGTGGTGGCACGCATCGACCGGAGACGAGGGGACCCTTCGGGGTGACAGATACTGC

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia AACGCCAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCTGCCTGATCAACTGCAGCGAAGGCGTTCTGCA

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia AGCCTGTGTCCGTCGATCAAGAACGAGAGTTTGGGGAGCGAAGATGATCAGACACCGTCCG

PrimerF -----  
PrimerR -----

```

secuencia TAGTCCAACACTGTAAACCATGCCAGCTAGGCCCCGGTGGAGCAAGTAACCGGACTCCAC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CGGAGCCACCCCCGCAACGAGAAATCCCAAGCCTTTGGGTTTCAGGGGGGAGTACTGTCTG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAATGGCACCACAAGGCGTGGAGTATGCGGCTT

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia AATTTGACTCAACACGGGGAATGTTACCAGGTCAGGACGTTGCTTGGATGGACAGATTGA

PrimerF -----
PrimerR -----TTCTTGAT-----
secuencia GAGCTCTTTCTTGATCCCTCGGATGGTGGTGCATGGCCGCTCCTGATTGGTGGAGTGATC

```

Figura 48. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Caloneis sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF -----CCAGCASCY
PrimerR -----
secuencia GTATGTAATTCAAGTCTCTTAATTAGTACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC

PrimerF GCGGTAATTCC-----
PrimerR -----ACTTTCG-----
secuencia GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCATATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT
          * * * *

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TGATTACTGTTGTTATTTCAAATGCCAGTTACTCTAGTATATTCTTGTAACAACACTGTCAA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia AAGAGAACCTATTGAAGCATTAGCTTGTTTTCATGTGTGAATCTGTCTTTTACTGTGAGTA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia AATTAGTGTGTTTAAAGTAGGTGATTGCTATTGAATATAGTAGCATGGAATAAACACATA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TAATGCTGGTGCAAATGTGTTGGTTATTGTGCCAGTGTGATGGTCAACAGGAACGGAAGA

```

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia GGATATTTGTATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATCTTTGTAAGACAACCAACTG

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia CGAAGGCTTCTACCATTGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCAAAGAT

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia GATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCGTAAACTATGCCAGCTGGGGATTATCAGCGCAA

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia CATTAGTCATTGTTAGCACCTCTTGAGAAATCATTAAAGCATTGGGGTCCGGGGGAGTA

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia TGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCTTG

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia CGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGATCCAGACATAATGACGATTGACA

PrimerF -----  
 PrimerR -----TTCTTGAT-----  
 secuencia GATTAAGAGCTTTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGG

Figura 49. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Caloneis sp.* por el programa Cluster Muscle

PrimerF -----CCAG  
 PrimerR -----  
 secuencia TGAATGAGAACAATGTAAACCCCTTATTGAGGATCAATTGGAGGCAAGTCTGGTGCCAG

PrimerF CASCYGCGGTAATTCC-----  
 PrimerR -----ACTTTCG-----  
 secuencia CAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCG  
 \* \* \* \*

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia TAGTTGGATTTGTGCTGGTTCCTGTAGATCAAAATGTTTTGATACTATATGGGGCAAGCA

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia TCCTTGGGCGGAACCTGTAGAGCATTAGTTTGTGGTGGTGCAGAGGATGTCCATCTTTTACTG

```

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCATATGCCATTGAATATATTAGCATGGAATAAT

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia AAGATAGGACGTTGGTGCTATTTTGTGGTTTGTGTACCAAAGTAATGATTAATAGGGAC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia AGTTGGGGTATTTGTATTCCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTTGGGAAGACGGA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CGATTGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCACTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAGTTAGGGATTGACAG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GGTATCGTTACGTCTTTGTCAGCACCTTATGAGAAATCATTAAACTTTTGGGTTCCGGGG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia AGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGA

PrimerF -----
PrimerR -----TTCTTGAT-----
secuencia TTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTT

```

Figura 50. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Spirogyra sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF -CCAGCASCYCGGTAATTCC-----
PrimerR -----ACTTTC-----
secuencia GCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAATTGTTGCAGTTAAAAA
          *  * *  *
PrimerF -----

```

PrimerR -----  
secuencia GCTCGTAGTTGGATCTCGGAGAGGAGTAGTCGGTCTTCCCATGTGGTCGCTTATCGTCTC

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia TCCTCCCTCTCTGCCGAGAGCTCGTCCTGGCCTTAATTGGCTGGGCGAAGGTCACGGCGA

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia TGTTACTTTGAATAAATTATAGTGTTCAAAGCAGGCTCTCGCTCTGCATACACTAGCATG

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia GAATAACAGTATAGGACTTCGGTCCCATTCTGTTGGTCTCCTTGACCGGAGTAATGATTA

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia ATAGGGACTGTCGGGGGCATTTCGTATTTTCATTGTTAGAGGTGAAATTCTTGGATCAATGA

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia AAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTT

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia GGGGGCGCGAAGACGATTAGATACCGTCCTAGTCCCAACCGTAAACGTTGCCGACCCCGA

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia ATTGGCGAAACATCTGACTTGACGTCGCCAGAGCCCAGAGAAATCAGAGTCTTTGGGT

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia TCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCA

PrimerF -----  
PrimerR -----  
secuencia GGTGTGGAGCGTGCGGCTTAATTTGACTCAACGCGGGGAATCTTACCAGGTCCAGACATA

PrimerF -----  
PrimerR -----GTTCTTGAT-----  
secuencia TCAACGATTGACAGACTGATAGCTCTTTCTTGATCATATGGGTAGTGGTGCATGGCCGTT

Figura 51. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Spirogyra sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF -----CCAGCASCYGCGGTAATTCC-----
PrimerR -----ACTTTC-----
secuencia AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCA
                * * * *

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GTTAAAAGCTCGTAGTTGGATTCCGGGAGTGAGCCGCCGGTCGCCGCCCGGGTTCGATA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TCGGCGCTCTTCCTTACCAGCCTCGGCCCGCCTGTGCTTCGCTGCTCGGGCGCGCGCC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GCGGCGATGTTACCTTGAATAAATTATGGTGTTCAAAGCAGGCGTTGGCTGTGAGTACAT

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TAGCATGGAATAACGGAATAGGACTCCGGTCCCGTTCTCGTTGGTCTCCGCACCGGAGTA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia ATGATTAACAGGGATAGTCGGGGACATTCGTA TCCGGCGTTAGAGGTGAAATTCTTGGA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TCACCGGAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTTATTAAATCAAGAAC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GAAAGTTGGGGGCGCGAAGACGATTAGATACCGTCTTAGTCCCAACCGTAAACGATGCCA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia ACCCCGAATTGGCGCGCGTATGACTTGACGCCGCCAGCGCACGAGGAGAAATCAGAGTCT

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CCACCAGGTGTGGAGCGTGCGGCTTAATTTGACTCAACGCGGGGAATCTTACCAGGTCCG

```

PrimerF -----  
 PrimerR -----GTTCTTGAT-----  
 secuencia GACATAGCGACGATTGACAGACTGATAGCTCTTTCTTGATCATATGGGTAGTGGTGCATG

Figura 52. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Navicula sp.* por el programa Cluster Muscle

PrimerF -----CCAGCASCYCGGTAATTCC-----  
 PrimerR -----ACTTTCG-----  
 secuencia GAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGT  
 \* \* \* \*

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTGTGGCGTACGGTGTGTTCCGGGCACTTGT

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia TGTCTGAGTAATCTGCCGTTGCCATCCTTGGGTGGAACCTGTGTGGCATTAGGTTGTCGT

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia GCAGGGGATGCCCATCATTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTATGCCG

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia TTGAATATATTAGCATGGAATAATAAGATAGGACTTGTTTGCTATTTTGTGGTTTGC

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia AAATAGGTAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGTATTTCGTATTCCATTGTCAGAGGTGAA

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia ATTCTTGGATTTTTGGAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTA

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia ATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCATAA

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia ACTATGCCGACAAGGGATTGGTGGAGTCTCGTTATGTCTCCATCAGCACCTTATGAGAAA

PrimerF -----  
 PrimerR -----

```

secuencia TCACAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTT

PrimerF -----
PrimerR -----TTCTTGAT-----
secuencia ACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTG

```

Figura 53. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Navicula sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF -----CCAGCASCYGCGGTAATTCC-----
PrimerR -----ACTTTCG-----
secuencia GTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAG
                *  * *  *

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTGTGGCGTACGGTGGGTCCGGGCACTTGTGTCTGAG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TAACTTGCTGTTGCCATCCTTGGGTGGAACCTGTGTGGCATTAGGTTGTCGTGCAGGGGA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TGCCCATCATTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTATGCCGTTGAATAT

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia ATTAGCATGGAATAATGAGATAGGACTTTTTTGCTATTTTGTGGTTTGCACAAAGAGGT

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia AATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCGTATTCCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GATTTTTGGAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia ACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCATAAACTATGC

```

```

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CGACAAGGGAATTGGTGGAGTCTCGTTATGTCTCCATCAGCACCTTATGAGAAATCACAA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GTCTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGG

PrimerF -----
PrimerR -----TTCTTGAT-----
secuencia TCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTG

```

Figura 54. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Oocystis sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF -----CCAGCASCYCGGTAATTCC
PrimerR -----ACTTTCGTTCT
secuencia AAACCCCTTATCGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCC
* * ***

PrimerF -----
PrimerR TGAT-----
secuencia AGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTCGGTTTTTCGGGC

```

Figura 55. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Oocystis sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF -----
PrimerR -----ACTTTCG-----
secuencia AAGGATGCTTTCGTCGATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTCTTTTCGATGACTCCG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CCGGCACCTCATGAGAAATCAAAGTGTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTG

PrimerF -----CCAGCASCYCGG-----
PrimerR -----
secuencia AAACCTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCGTGTGGCTTAATTTGAC

```

PrimerF -----  
 PrimerR -----T  
 secuencia TCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGTCAGATTGAGAGCTCTT

PrimerF ---TAATTCC-----  
 PrimerR TCTTGAT-----  
 secuencia TCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTTCAGGT  
 \* \*\*

Figura 56. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Chlorococcum sp.* por el programa Cluster Muscle

PrimerF -----CCAGCASCYGCGGTAATT  
 PrimerR -----ACTT  
 secuencia GTAAATATCTTAACGAGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATT  
 \* \*\*

PrimerF CC-----  
 PrimerR TC-----  
 secuencia CCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGG  
 \*

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia GTGGGTCGACGCGGTCTGCCTCTGGTATGTACTGCGCTCGGTTACCTTCTGCTGGGGA

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia CGGGCTCCTGGGCTTAACTGCTTGGGACCTGGAATCAGCGAAGTGACCTTGAGCAAACAA

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia GAGTGTCAAAGCAAGCCGACGCTCTGAATTTTTTAGCACGGAATCACACGATAGGACTC

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia TGGCCTATCTTGTGGTCTGTAGGACCGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCAT

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia TCGTATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTTATGAAAGACGAACTTCTGCGAAAG

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia CATTGCCAAGGATGCTTTCATTGATCAAGAACGAAAGTTGGGGCTCGAAGACGATTAG

PrimerF -----  
 PrimerR -----  
 secuencia ATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCAGGTGCTCCATTGA

PrimerF -----  
 PrimerR -----

```

secuencia      TGACCCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCG

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      CAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTT

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      AATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCCAGACACGGGGAGGATTGACAGATTGA

PrimerF      -----
PrimerR      -----GTTCTTGAT-----
secuencia      GAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTGCCT

```

Figura 57. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Chlorococcum sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF      -----CCAGCASCYGCGGT
PrimerR      -----
secuencia      CAATGTAAATATCTTAACGAGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGT

PrimerF      AATTCC-----
PrimerR      ACTTTC-----
secuencia      AATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATT
* * * *

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      TCGGATGTGTTGACGCGGTCTGCCTCTGGTATGTACTGCGTTCGATGCATCTTTCTGCTG

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      GGGACGAGCTCCTGGGCTTAACTGTCTGGGACTCGGAATCAGCGAAGTGACCTTGAGCAA

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      ACAAGAGTGTTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGAATTTTTTAGCATGGAATCACACGATAGG

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      ACTCTGGCCTATCTTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGG

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      GCATTTCGTATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTATGAAAGACGAACTTCTGCG

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      AAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTGATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGA

PrimerF      -----

```

```

PrimerR -----
secuencia TTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCAGGTGTTCCA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TTGATGACCCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCGGGGGAGTATG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTTACCAGGTCCAGACACGGGGAGGATTGACAGA

PrimerF -----
PrimerR -----GTTCTTGAT-----
secuencia TTGAGAGCTCTTTCTTGATCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTT

```

Figura 58. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Closterium sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF -----CCAGCASCYGCGGTAATTCC-----
PrimerR -----ACTTTC-----
secuencia ACCAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATA
          * * * *

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGACCTTCGGGCGGAGGTCTC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GGTCTGCCGTTTCGGTTGATACTGTCTCCTCCGTCCTTCTGTCCGGAAACGCGCCCTGGC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CTTCACTGGCTGGGGCGCGGGCGCAGCAGCTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CAGGCCACGTTCTGAATACATTAGCATGGAATAACAGCATAGGACTCTGGTCCATTGCG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TTGGTCTCCAGGACCGGAGTAATGGTTAATAGGGACTGTTGGGGGCATTTCGATTTTCATT

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATGAAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTGCCAAGG

```

```

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia ATGTCTTCGTAAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCCTAG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGTGGATGTTACATCCAACGACGCCACCG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GCACCTTGAGAGAAATCAAAGTTTCTGGGTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGTGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia ACACGGGAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCT

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TGAT-----
TGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTGTCTGGTTAA

```

Figura 59. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Closterium sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF -----CCAGCASCYGCGGTAATTCC-----
PrimerR -----ACTTTC-----
secuencia TAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAA
* * *

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATATCCGGGCGGAGGTC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TCGGTCTGCCGTTTCGGTTGATACTGTCTCTCCGCTCTACCTGTGGGAACACGTCCTG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GCCTTCACTGGTCGGGGCGTGGGCACGGCGATGTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia AGCAGGCCACGTTCTGAATACATTAGCATGGAATAACCGCATAGGACTCTGGTCTCTATTG

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia CGTTGGTCTCCAGGACCGGAGTAATGATTAAGGGACAGTTGGGGGCATTCGTATTTCA

```

```

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATGAAAGACGAACCACTGCGAAAGCATTGCCAA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GGATGTCTTCGTTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCCT

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia AGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGTGGATGTTACATCCACGACGCCACC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia GGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTCTGGGTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAA

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia ACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGTGTGGAGCTGCGGCTAATTTGACTC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia AACACGGGGAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTC

PrimerF -----
PrimerR -----
secuencia TTGAT-----
TTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTA

```

Figura 60. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Wilmottia sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF -----CCAGCASCYCGGTAAT-----
secuencia CGGTACCTAAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGA
PrimerR -----

PrimerF -----
secuencia TGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCACTTCAAGTCTGC
PrimerR -----

PrimerF -----
secuencia TGTTAAAGATTGGGGCTTAACTCCAAGCAGGCAGTGGAACTGAAGAGCTAGAGTGTCTGT
PrimerR -----

PrimerF -----
secuencia AGGGGTAGAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACATCGG
PrimerR -----

PrimerF -----
secuencia TGGCGAAAGCGCTCTACTGGACGACAACCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAA
PrimerR -----

```

PrimerF -----  
secuencia TGGGATTAGATACCCCAGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTGGCTTGTAT  
PrimerR -----

PrimerF -----  
secuencia CGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCGCGCAA  
PrimerR -----

PrimerF -----  
secuencia GCGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATT  
PrimerR -----

PrimerF -----  
secuencia CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTCTGGAATCTCCTTGAAAGGGGA  
PrimerR -----

PrimerF -----  
secuencia GAGTGCCTTCGGGAGCCAGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAG  
PrimerR -----

PrimerF -----  
secuencia ATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTG  
PrimerR -----ACTTTCGTTCTTGAT-----

PrimerF -----  
secuencia GGC ACTCTAGAGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAG  
PrimerR -----

PrimerF -----  
secuencia CATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTAATAACAATGCGACGGACAAAGGGCAGCCAA  
PrimerR -----

PrimerF -----  
secuencia CCAGCAATGGAGAGCTAATCCAGAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTC  
PrimerR -----

PrimerF -----  
secuencia GCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATCCGTTT  
PrimerR -----

PrimerF -----  
secuencia CCGGGCCTTGTACACACCCCGTACACCATGGAAGCTGGCCACGCCCGAAGTCGTTAC  
PrimerR -----

PrimerF -----  
secuencia CCTAACCCTTGTGGAGGGGACGCCGAGGCAGGGCTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAA  
PrimerR -----

PrimerF -----

```

secuencia      CAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTAGGGAGACCAACTCGCAC
PrimerR      -----

PrimerF      -----
secuencia      AGCAAGACCAAAGTCAGAAATTGGTGAAGCTGGTGGAGACATCCAAGGTCGGAAGAAGT
PrimerR      -----

PrimerF      -----
secuencia      CTTGCCAAAATCAAAGCTTTCAAACATTAACCTCGGTCGGCATGAGGGCTATTAGCTC
PrimerR      -----

PrimerF      -----
secuencia      AGGTGGCTAGAGCGCGCCCCTGATAAGGGCGAGGTCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCC
PrimerR      -----

PrimerF      -----
secuencia      ACCTTAAATCAGAGGATTGAGCAAAAAGCCGAAAAAACTTCAGCACCTCAACTTGTGAG
PrimerR      -----

PrimerF      -----
secuencia      AAAAACAAGAGAGAATGCTGGACGTAGATGTTTCAGCCAGAACCTTGAAAACGCATAGCC
PrimerR      -----

PrimerF      -----
secuencia      AAAAAGAAGAAAACAGCAAAGCAACTGCGAAAAGTTGAAAGACTAATAGCAGAGGCATTC
PrimerR      -----

PrimerF      TCC-----
secuencia      TCCAAGAAACAAGT
PrimerR      -----

```

Figura 61. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Wilmottia* sp. por el programa Cluster Muscle

```

PrimerR      -----
PrimerF      -----CCAGCASCYCGGGTAAT-----
secuencia      CGGTACCCAAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGA

PrimerR      -----
PrimerF      -----
secuencia      TGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCACTTCAAGTCTGC

PrimerR      -----
PrimerF      -----
secuencia      TGTCAAAGACCGGGGCTTAAACCCTGGAGAGGCAGTGGAAACTGAAGCGCTAGAGTGTCTGT

PrimerR      -----
PrimerF      -----
secuencia      AGGGGTAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACATCGG

```

PrimerR	-----
PrimerF	-----
secuencia	TGGCGAAAGCGCTCTACTGGACGACAACCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAA
PrimerR	-----
PrimerF	-----
secuencia	TGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTGGCTTGTAT
PrimerR	-----
PrimerF	-----
secuencia	CGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCGCGCAA
PrimerR	-----
PrimerF	-----
secuencia	GCGTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATT
PrimerR	-----
PrimerF	-----
secuencia	CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCTGGAATCTCTTTGAAAGAAGA
PrimerR	-----
PrimerF	-----
secuencia	GAGTGCCCTTCGGGAACCAGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAG
PrimerR	-----ACTTTCGTTCTTGAT-----
PrimerF	-----
secuencia	ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTG
PrimerR	-----
PrimerF	-----
secuencia	GGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAG
PrimerR	-----
PrimerF	-----
secuencia	CATGCCCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTAATAAATGCGACGGACAAAGGGCAGCCAA
PrimerR	-----
PrimerF	-----
secuencia	CCAGCAATGGTGCCTAATCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTC
PrimerR	-----
PrimerF	-----
secuencia	GCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATCCGTTT
PrimerR	-----
PrimerF	-----
secuencia	CCGGGCCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGCCACGCCCGAAGTCGTTAC
PrimerR	-----
PrimerF	-----
secuencia	CCTAACCTGTATTGGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAA

```

PrimerR -----
PrimerF -----
secuencia CAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTAGGGAGACCTGTTTGACA

PrimerR -----
PrimerF -----
secuencia ATCGGTAATTAAGATGAAAGTCTTAGTTGCGTTTGTCAAAGCATCCCAAGGTCGTACGAG

PrimerR -----
PrimerF -----
secuencia GCAGTACGTTTAAACTTTTAAACTATTAACCGGTCGGTGCATGGGCTATTAGCTCAGGT

PrimerR -----
PrimerF -----
secuencia GGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCCATCC

PrimerR -----
PrimerF -----
secuencia TCTGCACTGTGAGTGATAAGTAATTAGGAACTCAACCCTCAGCACCTTATTTTGGTAACA

PrimerR -----
PrimerF -----
secuencia ATCAAACTTGATTGGTCTCAAAGAGAATGCTGGGCGTAAAGTCCAGTCATGTACCTTG
-----TCC-----

```

Figura 62. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Phormidium sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerR -----
secuencia GACCATATTATTATTTTTTTTACTCACCGCAGGAATCGTTCGACCGTAGTAAAGAAATAA
PrimerF -----CCAGCASCYCGGTAAT-----

PrimerR -----ACTTTCGTT
secuencia ACGTTTCGAGATTTATATAACTCATATCAACTTTTAACAAGGTCTCTCTGGCTCTCGTC
PrimerF -----TC
*

PrimerR C-----
secuencia CAGGCGTCGTCCCCGGGCAATAGTATGTGAAAATACCAATTCATACCTCGAGAAATTCT
PrimerF C-----
*

PrimerR -----
secuencia TCGATCTTTGTA CTCAATCTGGACTCTTATATTTCTAAACCCAGACCGGTCTGCATGGG
PrimerF -----

PrimerR -----TTGAT-----
secuencia CATCCTTGTCTCTTTTTACGTTGATGTATGTTTCGTATTTCGGGAAGTGATGGGTATGAC
PrimerF -----

```

Figura 63. Alineamiento de cebadores V4\_F y V4\_R con secuencia del género *Phormidium sp.* por el programa Cluster Muscle

```

PrimerF -----CCAGCASCY
PrimerR -----

```

```

secuencia      GAATCCTCAAATCAACGTTTCATCACATCTTACAAACTGGCGAGTTAGAATCCCAGCATCA

PrimerF      G-----
PrimerR      -----
secuencia      GTTAGAAGAACGACTCCTGATTAAACAGGGATTTAGGGCGGTGACGAGTCAGGCCAATCC

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      TGCGGTTCAATTGTCTCTTTTGGCCAGTCCCGAGGAGACGCTCCCCAGTCGAGAGGACTG

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      TTTAAAACAAGCTTATGAACGTCAAGGAGATGAAATTGCCTATGTTGAAAAATAAACCCG

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      GAAAACATGGATCTTTAGGTTTTAGGGTTATCAGAAAAATCATAGCAGATTAACCCCTT

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      TGCCGTCGGGGCGAAAAATCCAAAAATCCCCTCCTGGGAGGGGCTAGGGGTGGGTACC

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      CGACAGGTTGGTATCCAAGGCAACAAATTATTGGTCCAAATTACAGCCGATTTCTGAAG

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      ACTCGCCAACTCTCGTTTCAGTCCATTTGTAAACCCGTCAACTTCATCGCGACATCAA

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      CATGAACGATTCATTAACTCTTCACCATTTGGTTTTACCAAAAAGGGCGAAAAACCTT

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      CTTTGAATCCTTGCAAAATGCCGGTGTAACGACTCTTAGATATCCGGCTAAACAACGT

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      TTCTCAACTGGCGGGATTTGCCAAAAAGCCGATTTAGAATACTTCTCAACACCATTG

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      CGATATTGACTATGCCCATCTCCTAGACCTCGCTCCCACCAAAGAAATTGTGGACGAATA

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      CAAGAAAAATAAGGAGATTGGCAACACTACGAAGTGCAGTTTTTAGAGTTAATTCGCCA

```

PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	ACGGAAGATTGAAGACAAAGTTTCCCCGATCTCATTGATGGTGCCTGTTTCTCTGTAG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TGAAGCCAGCCCCAATCATGTGCATCGACGGTTAGTGGCTGAATATCTCAATCAACAGTG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GGGAAATGTTGACATTCAGCATCTTTGAAGACGTAAAACCTCGGCTTAGATGGCTATGACA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	AACTCATTGCCTTGCGAATCTTGGAAACATCAGGGACGATGTCTAGCGGGGATACAT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CCCGAGACGGGGCAATGGATTTCGACCGGTTTCTGACCTAGAGGATGGTCGCATTCCCCAG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CGAGTCGGCTCGATTTCGGTCAAAGAGATTAACTCCTAGAGGTTTGGGAGATTCCCTTA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GCGGAAACGGGGCCGGATTTTGGTTTCGCGTCGGAGAACCACGGATTTTGCCGGAACC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TGGCGGAAGTTGGGAACGGTGACTGTAGAGGCAATGTTGCCCTATTGTGAGACGGAGACT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GAGATTTGCATAATACACGAGCCTACGTGACGATTCTCAGCTTCAAGCGTTACCGTTT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CAGCAACGACGCACCTTGCAGTTAGTGGAGACGCAACAGTTTACGACAACTGTGGCTCGG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GTTTCGCCAACAAGGGGGTCAATGGAAGGGTGACTTAGTGACGACGGGAGGACGGCGA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TTGCAGGGACGAATTACGGACCCGGAGTTGGTGAAACGGCTCGATTGGGCTATGAACCG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	AGTCATCATTTGTTTGGTGACGGTGAGTTTGGGGATGCCCTGGGTTCCCCGAATTGGCAG

PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GGAGATGCCCTTGTTGGAAGTTGATTGCTGGGGTGATGGATGGGGATAGGGATGTTGG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CGTGGAACAATCGGCAGTTGACGGTCTCCAAAAACCCGAACCTGTGAATGGAGAATAG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GGGATTGGAACCCCTGACCTCTGCGGTGCGATCGCAGCGCTCTACCAGCTGAGCTAATTC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CCCCAATTGTAGTTATCGACCGTAGCACGATATGGGTGAATGTCAAGACCTCAGAGACT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CACCGCTGGCGTGGGGTTAAACGCCGCCTGAACCCGGTCTAACTCCAACCCCCAACGC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	ATCCACCACCCAGTCCGCTCGTCGCTGCAACATATGCACCGGATAGGTATTGGCCACCCC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CACCACCTGCATTCCGGCTCGTCTGGCCGCCTCAATCCCGCGGGACTGTCTTCAATGGC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TAAACACTCCTGGGGGTTAACGCTAACTCAGGATGTTGCTCATTAACTGGTGTACCGC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CAACAAATAGCCCTCAGGGTCCGGTTTACTCGAAGCCGTATCATCCCCGTCACCCGGAC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CGGAAACTGAGATAAGAGTTCAATCTGACGTAACACGGGTTGACTTCTTGCCGCAACGC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CCCACTCACCAGGGCTAAATGTAAATTTTTCAGCCGTAGTTTTTAAAATAAAATCCACTAA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	ACCAGTATAAATTGGCAACTCATCTAATGCCTCAATTTCTTGGCGGTATCCCTGAGATTT
PrimerF	-----

PrimerR	-----
secuencia	CTTCTCCATTAACCCCTGCAACGATTCCGGCGTTAACACCCGTCCCTGACGCTCCCATAA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CGCCTGCAACCCGGCGGATCGCTGCGTCCTAAACAACCTCTTGAATCTCACTTTTATC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CGGTCGTAAATTCTCCGACAACAGCAACTGAGCAATCAACTCCAGATGAATTGCCTCATC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	ATTAATAATGATGCCATTAAAATCAAAAATAACCGCTTTTAAACATCGTCACGTTTACTCC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	ATCACAGAACCCCGAGGGGCAAAACCCAGAGGTGTACCCCGCACATATCACACCCGCAT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CACACCTAAGCAAAAGCCATCTCCCCTTACCGAGAGACTCATCTGTGACCCATTCTGG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CCCGGTAGCGGCTTACGCTCGGGTGACTTGATGAATCCACCAATGCGTTCGTGTTTCT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	ACGTTAGCGAATCCCCTTGCTGCATCCAGGCCGCCACATCTCCCTGGGCATACTCAGCA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	ATATAAGGTTCCCTCAAACACCTCCATCAACCAGGGAGTTTGCCGTAAACTCTCTTGATTC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CCATCGAGAACAATCACCTCGCCGCAACTCGCAACAGGCGGAAACATTCCCGTAGAATT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GCCTGACTCACCGCTGGCGGCGTTTCATGGAACAGCAACGACAGAGAAATCACATCAAAG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CTATTCTCCTCAAATCCCCTCTCCTCCGCCTTGCCATGTGCGCAGTCCAGCTTCAGACCC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TCAGCCGTGGCCTTATACTGGGCCATCACGAGCATATAGGGCGATAAATCTAACCCACC

PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	ACCGTCGCTTCGGGGAACGTTTCGTTTCAACACTAACGTCGTTGACCCGGTTCACAGCCT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	AAATCGAGAATACGCCGGGGTTGCGATCGCAGCGACTGAATCACCCCTCCCGTACCCAG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TCCTCATTGGGGGCAACACATAGCGAGTAATCGGATCATAAGACACCGCCGCCCGGA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CTGAGATAACCGCCCTCAACCCATGAAAATGCCAGAGCGATAATACTCAGGATAGACC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	AGTCCCGCGTGGCGAGGCGATCGCCCTCCATCTGCCAATCAATCCGTTCAAACCTGGCGT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TTCATGGCCTCGCGGTCCAACAGCGGGTCTAACGCCGAAGCCAAAAGCGGTCCCAAAGC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GTCGTTGCTTCGTTGTCTGTTTCAGACGTCGTTTCAGAAGCCATAGCCAAAATCCCCGA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CCATCAACATCTCCTAAGATAGTCCAACCTCAGCGATTCCGGGGCAACCGATAGGCGATCG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CCCACCCCGGCCCTTCCCCGACTATGGCAAATGAACCCAGGGTTTACCGATCGCACCAT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TTCCATGACCAAATTTATCTTCATCACCGGCGGCGTCGTCTCCAGCATTGGCAAAGGTAT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CGTCGCCCGCAGTTTAGGGGTTTACTCAAGTCCCGAACTACTCCGCTCCATCCTCAA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GCTCGACCCTTATATTAACGTCGATCCGGGAACCATGAGTCCCTTCCAACATGGGGAAGT
PrimerF	-----
PrimerR	-----

```

secuencia      TTTTCGTACCCCAAGACGGGGCCGAAACCGACCTCGACCTGGGCCATTACGAACGCTTCAC

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      CGACACCTCCATGTCTCGCCTCAACAGCGTTACGACCGGGTTCGATTTACCAATCCGTTCAT

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      CAACAAGGAACGACGGGGCGACTACGAAGGGGAACCGTCCAAGTCATCCCCACATTAC

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      CGGCGAAATTCGTTCTCGCATCCGTCGCGTCGCCCGCAACACCAACCCCGATATCGTCAT

PrimerF      -----CG
PrimerR      -----
secuencia      CGCTGAAATCGGCGGAACCGTGGGCGACATCGAATCCCTGCCCTTCCTCGAAGCCATCCG

PrimerF      GTAATTCC-----
PrimerR      --ACTTTCGT-----
secuencia      GCAATTTTCGTAAAGACGTCGGCCGAGAGAACATCATGTATGTCCATGTCACCCTGATGCC
                * * *

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      TTGGCTGCGGGCCGCCGGGAAATGAAAACCAAACCGACTCAGCATTCCGTCAAAGAACT

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      GCGATCGATTGGGATTCAACCGGATATGTTAGTCTGTGCTGCGAACGTCCCCTCAGCGA

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      AGGTCTCAAAGAAAACCTCTCCGAGTTTTGTGACGTTCCCATGACGCGGGTCATCACCGC

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      CCCTGATGCCGGCAGCATCTACGAAGTGCCTCTCGTCCTCGAACAAGAAGGCTCGCCCA

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      GTCCGTCCTTGACTGTCTCCATCTCGAACAGCGAGATCCCGACCTCGAGGGCTGGCGAAC

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      CCTGATCGATCGCATGAAGAACCAGAACGGGAACCTCGAAATCGCCATCGTCGGCAAATA

PrimerF      -----
PrimerR      -----
secuencia      TATCCAACCTCTCCGACGCTATCTCTCCGTCGTCGAAGCCCTCACCCAGCCACCGTTCA

```

PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	ATGTGGCAGTCAACTCAAAGGAGTGGCGTGGGTGAACTCCGAAGACTTAGAACAATTCCCCGA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CGGCGACCAACTCAAAGGAGTGGCCGGAATCGTTGTCCCCGGAGGCTTTGGCAGTCGCGG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CGTTGACGGCAAAATCAACGCCATTTCGTATGCCCGAGAACAGCAAATTCCTTCCTCGG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CCTCTGTCTGGGAATGCAATGTGCCGTCATTGAATGGGCGCGTCATGTGCCCATCTCGA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CGATGCCAACAGTTCTGAATTTGACCGCAACACCTCTAACGCCGTTATTAGCCTACTTCC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CGAACAAGAAGATGTGGTGGATTTAGGGGAACCATGCGTCTGGGCCTCTATCCCTGCCG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CCTAACCGAAGGAACCCGCACCTTTGCTAGTTACAACCAGGAAGTCGTCTACGAACGCCA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TCGCCACCGTTACGAGTTCAACAACGCCATCGCAGTTTGTTCCTCGAAACCGGCTATGC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CATCAGTGGAACTCCCCGATGGCCGCCTCGTCGAAATCATCGAAATGCCAATCATCC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CTTCTTCGTGCCACCCAGTTCACCCCGAGTTTGAATCTCGTCCCAACCATCCCCATCC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TCTGATGGAAGGATTTGTGCGGGCGGCCCTGGGACTCTCGGCGGCGGTGACACCAATGGA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GTCGTCTGAGGGCAACCCCAAGGACGAAAGCCTAGAGTCAGCGGCACACGTGTTATAACC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TCAAAGGAGATCGGGGAGACCTGGTGACGGGAGGCGTTGCGCGTGGCGTACTGGATCAA

PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	AATTCACGAACAAGGGGAAAACACATTCATGTTCTTGACCTCGACCGAGTCAGTAGCTT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CTCGCTTTACAAACGGACTCGGTAAACGGTCTATTGGCATCCGAGTGAACAGCCGTTGGT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CCTAACGGCCCAAAGCGACCTGTGCGCTATCGGCAAGTTCTCGACTATGTTGAGAAAAC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CACGGTTATTCCCTAGAGACGCCGCTAGATGGTTAAATCATGACCCCCACTGCCGTCTT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GTGTCTCTTTTGCCGCTGTCTTAGATAAAATTCCTCTAATCGCAATCAGAAGGATATGCTA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GAGGTCGAGTTGATGTGAGGAGTTGAACTGATGAACTGGCAACATGATGCGTTAGAGGTG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CTCAAACAGACTAGCCGCACCTTTTATATCCCGATTGTCCAGCTTCCCGAAACCTTCAG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GAAGCGGTGACCTCGGCTTATCTCTGTATGCGGGCTATTGACGAGATTGAAGATCACCTT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CATCTCGATAATGAACGCAAGGCCCGCTTGCTGCGATCGCTGTCCCTGCAACTGCAAACC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GGAACCGGCGACAATGACCAATTCACCCCCGACTGGGGCGACAGTTACGACCAACTGCCG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GAAGTGACGTTACGAGTCAGTGATTGGGCTAAACTGGCCCCAGATAGCATCGCCCCCGG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	ATTTGGGATGCGACCGCCCGCATGGCCGATCGCATGGCATTCTGGGCCGATCGCAACTGG
PrimerF	-----

PrimerR secuencia	----- ACGATTCACACCGTCGCCGACCTCGACAGCTATACCTTCAGTGTGGCCGAGCGGTAGGA
PrimerF PrimerR secuencia	----- ----- TTACTGTTATCAGACCTCTGGGCCTGGTATGACAATACCCAAACCAGTCGCATGGAGGCC
PrimerF PrimerR secuencia	----- ----- ATCGGCTTCGGACGCGGCCTACAAACCGTCAACATTCTTCGCAATCATCGCGAAGACAAG
PrimerF PrimerR secuencia	----- ----- GCTAGAGGTGTGGACTTTTTCCCCGAAGGCTGGACGGCGGCCCAAATGCAGGCCTATGCC
PrimerF PrimerR secuencia	----- ----- CGTCATAACCTGGAATTTGCTAAACGTTATACCCACGCCCTCCCCAAAGCCCCGCCTTA
PrimerF PrimerR secuencia	----- ----- GACTTCTGCCGATTCCCTTAGTTTTGGCCCAAGGAACCTGAAAACCTGGCCCTGGGC
PrimerF PrimerR secuencia	----- ----- AAACCGAAACTCAGCCGTGATGATGTCATGCAACTCATGGCCAGGTGGTTGACCATTAG
PrimerF PrimerR secuencia	----- ----- GACGTTTCCCTTGACGGCTTCTGGGGCATCCCCTGTCGGTTGCCCAATCCCAGAGAACA
PrimerF PrimerR secuencia	----- ----- AACAGTTGATAATAGACAGTTTTTATTTTGAAACTCCTACTATATATACATTACAAGAAT
PrimerF PrimerR secuencia	----- ----- TGTAACGTCCTAACCTATATGACTAATTCATAAATATCTCAACGCTTAACTAGACACA
PrimerF PrimerR secuencia	----- ----- ACGAACGGGTAACCATGACACTCCTGTATGACCTACAACAGTTTGCCGACCATCTCGTCA
PrimerF PrimerR secuencia	----- ----- GTGACCAACTGACCCATCTCAATCTCTTGACCGTGGTGGTGGTCCTCGTGGCGGGACTTC
PrimerF PrimerR secuencia	----- ----- TAACGAGTCTTACCCCTGTACCCTGTCGATGTTGCCCATACCTGGGCTACATTGGCG

PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GCTATGAATCCAAAAGTCCCGGACAGGGCGCCCGTCAATCCCTCTGGTTTTCCCTTGGCT
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TAGCGACGACTCTGGCCGCCTTAGGCTTGGGGCGGCCCTATTGGGACGAGTCTATGGCC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	AGGTGGGGCAAGGACTGCCGATTCTGGTGGCGGCGATCGCCATCTTGATGGGCCTCAATC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TCCTCAACGCCTTACCGCTACAACCTCCCCTCCATTGAGGGCATGAGTTGGATTTCCGAGA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	GTTGGCCTCACGGGCTGCGATCGTATCTCTTGGGCGTGACCTTTGGTTTAGTCGCCTCGC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CCTGTAGTACCCCCGCTCTGGCCACGCTGCTGGCTTGGGTCTCGGCGACGGGTAAGCCTC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TGCTGGGCAGCGGTCTCCTGTTAGCCTATACCATAGGTTATGTGGCCCCCTGATTCTGG
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	CCGGAACCTTTGCCGCCAGTCTCGACAAACTCTTGTCCCTGCGTCGTTGGTCCGGTTGGA
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TCACCCCCGCCAGTGGCGCGTTACTGGTGGGATTTGGTGTCTTTACCCTGGTCTTTCGCC
PrimerF	-----
PrimerR	-----
secuencia	TACTCCCCACGGTCTAGGCCGACAGGTTAACGGCTACACCAATTTCTGGCTAAGTCTTTG
PrimerF	-----
PrimerR	-----TCTTGAT-----
secuencia	GCCAAGCCTCGGGCCAAGCCTCGGGCCACCGTTCACTCTTCCTTGACTCTTGATTGTCCC

## **XIV. GLOSARIO**

1. ADN: Ácido desoxirribonucleico
2. ADNr: ADN ribosómico
3. ARN: Ácido ribonucleico
4. ARNr: ARN ribosómico
5. F: Forward (Directo)
6. m: Metros
7. PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa
8. R: Reverse (Inverso)