



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.*
AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA”**

Realizado por:

Katherine Johanna Camacho Mediavilla

Director del proyecto:

PhD. José Rubén Ramírez Iglesias

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito 16 de Abril 2021

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, KATHERINE JOHANNA CAMACHO MEDIAVILLA, con cédula de identidad 1723066310, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Katherine Johanna Camacho Mediavilla

C.I. 1723066310

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE
LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.*
AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA”**

Realizado por:

KATHERINE JOHANNA CAMACHO MEDIAVILLA

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



PhD. José Rubén Ramírez

DIRECTOR

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE
LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los profesores informantes:

SUSANA CHAMORRO

ALBERTO AGUIRRE

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador

PhD(c). Susana Chamorro

REVISOR



PhD. Alberto Aguirre

REVISOR

Quito, 16 de Abril 2021

AGRADECIMIENTO

Mi proyecto de tesis lo dedico con mucho amor y cariño a mis padres Rita y Diego por su sacrificio y esfuerzo, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

Agradezco a Dios y a la vida por permitirme vivir y disfrutar de cada día.

A mi familia por apoyarme en cada momento.

A mi Tutor de tesis José Rubén Ramírez por brindarme todos sus conocimientos, pero sobre todo por ser un amigo incondicional durante todo este proceso.

A mis amigos Paige, Daniela, Jorge y Alvaro por ser indispensables, por alegrar mi vida y enseñarme a ser mejor cada día.

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE
LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación

**BIODIVERSIDAD Y RECURSOS NATURALES, APLICADOS A LA
GESTIÓN AMBIENTAL Y A LA BIOTECNOLOGÍA**

Y con el financiamiento de

Índice Biótico de Calidad de Aguas para el Ecuador

Proyecto de Investigación de la Dirección de Investigación e Innovación

DII-UISEK-P041516_3

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE
LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

25/03/2021

Para someter a:

To be submitted:

**Identificación morfológica y molecular de *Cosmarium sp* aislado de los lagos de la
Reserva Ecológica Antisana**

Katherine Camacho¹, Susana Chamorro¹, Jennifer Moyón¹,

Alberto Aguirre¹, José Rubén Ramírez-Iglesias¹

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Quito,
Ecuador. 25/03/2021

*AUTOR DE CORRESPONDECIA: José Rubén Ramírez Iglesias, PhD. Universidad
Internacional SEK, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-0986391273; email: jose.ramirez@uisek.edu.ec

Título corto o Running title: Identificación morfológica y molecular de *Cosmarium*

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Resumen

Uno de los microorganismos que se han adaptado a condiciones extremas durante millones de años han sido las microalgas especialmente el género de microalga *Cosmarium*, que pertenece a la familia *Desmidiaceae* y cuenta con más de 1500 especies. Dicho género ha creado interrogantes en el ámbito científico, puesto que las pocas investigaciones que existen han aportado resultados significativos en el campo biotecnológico. Es por ello que la investigación del género *Cosmarium sp* ofrece una oportunidad para generar datos taxonómicos clásicos y moleculares por lo que este proyecto cuenta el objetivo de aislar e identificar la taxonomía morfológica y molecular de una especie de microalga del género *Cosmarium sp* proveniente de la Reserva Ecológica Antisana. Luego del desarrollo de la investigación se obtuvo que AGBBM-141119 aislada es *Cosmarium subcrenatum*. De la misma forma se obtuvo referencias de su crecimiento celular y densidad óptica obteniendo una concentración final de $3,76 \times 10^5$ células/mL y una absorbancia de 1,942. La presente investigación aportará información importante a la biodiversidad en los ecosistemas del Ecuador y a los posibles usos biotecnológicos que dicha especie puede generar.

Palabras clave: *Cosmarium subcrenatum*, árboles filogenéticos, cebadores, taxonomía clásica, taxonomía molecular

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Abstract

One of the microorganisms that have adapted to extreme conditions for millions of years have been microalgae, especially the microalgae genus *Cosmarium*, which belongs to the *Desmidiaceae* family and has more than 1500 species. This genre has created questions in the scientific field, since the few investigations that exist have provided significant results in the biotechnological field. That is why the investigation of the genus *Cosmarium sp* offers an opportunity to generate classical and molecular taxonomic data, so this project has the objective of isolating and identifying the morphological and molecular taxonomy of a species of microalgae of the genus *Cosmarium sp* from the Reserve Ecological Antisana. After the development of the research, it was obtained that the isolated AGBBM-141119 is *Cosmarium subcrenatum*. In the same way, references of its cell growth and optical density were obtained, obtaining a final concentration of 3.76×10^5 cells / mL and an absorbance of 1.942. This research provides important information on the biodiversity in the ecosystems of Ecuador and the possible biotechnological uses that this species can generate.

Keywords: *Cosmarium subcrenatum*, phylogenetic trees, primers, classical taxonomy, molecular taxonomy

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium* sp. AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Introducción

El Ecuador es considerado un país megadiverso en términos de ecosistemas y especies, teniendo ambientes extremos poco estudiados como lo es la Reserva Ecológica Antisana. La reserva está ubicada en la vertiente oriental de la Cordillera de los Andes, a 50 Km del sureste de Quito (Nieto et al., 2017). Conviene enfatizar que la comunidad científica ha puesto un mayor interés en el estudio de los ambientes extremos, debido a que poseen diversas características fisicoquímicas fuera de los parámetros en donde normalmente existe la vida (Urbieta, 2013). Los microorganismos que poseen la capacidad de desarrollarse en este tipo de ambientes se denominan extremófilos (Solomon et al., 2013). A estos microorganismos se los suele encontrar en ecosistemas con alta alcalinidad (pH superior a 8) o alta acidez (pH menor a 4), en temperaturas muy altas (55 a 121°C) o muy bajas (-2 a -20°C), con alta salinidad (NaCl 2-5M) e incluso en presencia de radiación (Ramírez D. et al., 2006).

Un grupo de microorganismos que ha logrado sobrevivir durante millones de años en condiciones extremas son las microalgas (Conrad, 2003). Específicamente, *Cosmarium* es uno de los géneros más antiguos de la familia Desmidiaceae, constituido por microalgas unicelulares generalmente solitarias, que presentan varios tamaños y características morfológicas, contando con más de 1500 especies (Daneshvar et al., 2007). Dichas especies se han llegado a encontrar en diversos lugares alrededor del mundo, las cuales han demostrado tener un gran potencial de aclimatación fisiológica, siendo capaces de adaptarse a regiones polares, lugares con sequía, aguas con altos niveles de potasio, magnesio, sodio y ambientes oligotróficos, alcalinos y ricos en compuestos orgánicos (Osório et al., 2018) (Araújo, 2006) (Mundt et al., 2019). Para su identificación taxonómica clásica es necesario observar la forma de la semicélulas, que pueden ser lisas, onduladas o dentadas, la cantidad de cloroplastos y pirenoides, la forma de la pared celular, la presencia o ausencia de gránulos y si posee un seno abierto o cerrado (Rafika et al., 2012).

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Aunque el género *Cosmarium* es fácil de reconocer, existen especies como *C. punctulatum*, *C. crenatum* y *C. subcrenatum*, que requieren herramientas moleculares, como códigos de barras de ADN, para diferenciar qué especie se está estudiando (Paz et al., 2011). Hoy en día los marcadores moleculares han permitido distinguir entre individuos y explicar patrones y procesos evolutivos en un entorno ecológico. Dichos marcadores se los obtiene mediante las técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) y han permitido determinar con precisión la diversidad genética, distribución, selección natural, funcionamiento y relaciones filogenéticas entre especies (Ramírez-Salcedo et al., 2014). El estudio de la filogenia ha permitido analizar la distribución de linajes de genes entre especies, gracias a secuencias de ADN, con el fin de reconstruir una historia evolutiva, entender su distribución y el mantenimiento de la biodiversidad (Brown et al., 2013).

El estudio de las microalgas del género *Cosmarium sp* ofrece una oportunidad para generar datos taxonómicos clásicos y moleculares que aporten información sobre las características de este conjunto de microorganismos y evaluar su aplicabilidad biotecnológica en un futuro. En este contexto, se han presentado pocas investigaciones, sobre este género, a nivel mundial y los escasos estudios biotecnológicos publicados están asociados a diversas aplicaciones. Una de estas aplicaciones es la decoloración del tinte textil con verde de malaquita (Daneshvar et al., 2007), la producción de materia prima de biodiesel (Manoj et al., 2018), junto con la descripción de actividades antibacterianas, antioxidantes y citotóxicas determinadas a partir de sus extractos (Rafika et al., 2012).

Actualmente, por la falta de investigación de este género de microalgas, se han creado interrogantes en el ámbito científico y esto ha atraído la atención del área de comercialización de estos microorganismos. Resumiendo lo planteado, el presente estudio tiene como objetivo aislar e identificar morfológica y molecularmente una especie de microalga del género *Cosmarium sp* proveniente de la Reserva Ecológica Antisana, con el fin de aportar información

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

a la diversidad de especies que habitan en este ecosistema y poder profundizar en un futuro sobre sus potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Materiales y métodos

Muestreo

El lugar de muestreo fue en la Reserva Ecológica de Antisana, ubicada a una latitud y longitud de (0°28'53" S, 78°8'27" W). Esta zona cuenta un rango de temperaturas de 4.7 a 8 °C. Las muestras se colectaron a partir de la superficie de la laguna 2, localizada cerca de los glaciares, usando tubos cónicos esterilizados de 50 mL y se almacenaron a una temperatura de 4°C para su transporte. Todas las muestras fueron colectadas bajo el permiso No. MAE-DNB-CM 2018-0028-0093 concedido por el “Fonag”, EPMAPS” y el “Ministerio del Ambiente”, Ecuador.

Cultivo y aislamiento

Las muestras se cultivaron en medios selectivos BG11 (Blue-Green Medium) y BBM (Bold's basal Médium) al 1.4% de agar (Anderson, 2005). Para ello, se sembraron 100 µl de la muestra de agua, mediante diseminación con un asa de Digralsky estéril, en cajas Petri. Posteriormente, las muestras se incubaron por 15 días a una temperatura de 25 ° C, con ciclos de foto período de luz/oscuridad 12:12 y con una intensidad luminosa de 3000 luxes. Después de los 15 días, se observaron colonias verdes individuales y bien definidas, las cuales se diluyeron con 30 µl de agua Mili-Q estéril y se repicaron bajo las mismas condiciones en medio de cultivo BBM. El proceso de repique de colonias se repitió hasta obtener cultivos puros, cuya condición axénica fue confirmada mediante observación directa, usando un microscopio óptico.

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Identificación morfológica

Para la identificación morfológica se utilizó un microscopio óptico compuesto conectado con una cámara para imágenes digitales (Manoj et al., 2018). Las características observadas fueron comparadas con la bibliografía de Carlos Eduardo de Mattos Bicudo (de Mattos Bicudo, 2006) y de Hantzsch (1868).

Identificación molecular y análisis filogenéticos

La identificación molecular se realizó por PCR de colonia, empleando los cebadores Gr (F) GTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTA; Gr (R) AAGGGCAGGGACGTAATCAACG descritos por Gross et al. (2001) y los cebadores ss5 (F) GGTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG; ss5 (R) GATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACC descritos por Khaw et al. (2020), para la amplificación de la región 18S de ADN ribosomal. Adicionalmente, se probaron los cebadores Chloro (18s) e ITS1 (espaciador interno transcrito 1) descritos por Moro et al. (2009) y Hadi et al. (2016). La mezcla de reacción constó de 0.5 μ M de cada cebador, 0.2 mM de dNTPs, 1X de Buffer Dream Taq (Thermo Fisher) y 0.25 U de Dream Taq (Thermo Fisher), para un volumen final de reacción de 25 μ l. Se utilizaron los programas de ciclado descritos para cada set de cebadores, según su autor correspondiente. En el caso de los cebadores ss5 se utilizó un programa de ciclado con diferentes temperaturas de hibridación (48 ° C, 55 ° C y 59 ° C). Los productos de amplificación por PCR se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con Safe view™ (2 μ l /mL). Finalmente se realizó una purificación de amplicones utilizando el Kit de la casa comercial Invitrogen (PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification). Una vez obtenidas las muestras éstas fueron secuenciadas por la empresa MacroGen®.

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarius sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Para la construcción del árbol filogenético se ensambló una secuencia consenso, a partir de los electroferogramas de las secuenciaciones, utilizando la herramienta Bioinformática GeneStudio Professional Edition. A partir de la secuencia obtenida se utilizó el software MEGA X para armar el árbol filogenético mediante el método de sustitución nucleotídica de Neighbor Joining. Finalmente, se calculó la divergencia genética según la metodología P-distance.

Crecimiento y obtención de biomasa

Para la obtención de biomasa se realizaron cultivos por triplicado en fotobiorreactores de 1 litro utilizando medio BBM, durante diez días bajo las mismas condiciones que el cultivo en placa. La concentración del inóculo inicial fue de $3,17 \times 10^4$ células/mL. Además, se colocó un compresor de aire del modelo JAD S-4000B para alimentar el reactor con un suministro de aire de $4,2 \text{ L}/\text{min}$. Para la curva de crecimiento de biomasa se realizó un conteo diario de las células en crecimiento, utilizando la cámara de Neubauer y la Ecuación 1. Asimismo, la densidad del cultivo fue medida en un espectrofotómetro Hatch 5000, a una longitud de onda de 680 nm.

Ecuación 1. Concentración celular por mililitro

$$\text{concentracion} = \frac{\text{Total de células} \times 10.000}{\text{Número de cuadros} \times \text{dilución}}$$

Productividad celular global y velocidad específica de crecimiento máxima

Para analizar la productividad de la biomasa, se realizó el cálculo mediante la Ecuación 2 de productividad celular global, que permite conocer el incremento diario de biomasa en el cultivo. Mientras que la velocidad específica de crecimiento máximo se calculó mediante la Ecuación 3, la cual indica la velocidad de crecimiento de las células.

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Ecuación 2. Productividad celular global

$$p. celular = \frac{\text{concentración de biomasa final} - \text{concentración de biomasa inicial}}{\text{tiempo}}$$

Ecuación 3. Velocidad específica de crecimiento máxima

$$\text{velocidad celular} = \frac{\ln(\text{concentración celular})}{\text{tiempo}}$$

Análisis Estadístico

Los parámetros asociados al crecimiento celular y la densidad óptica fueron representados como el valor \pm desviación estándar y se calcularon mediante el programa Statgraphics versión 18. A través de la prueba de Kruskal Wallis, se realizó una comparación de medias y las diferencias obtenidas fueron estadísticamente significativas con un $p < 0,05$.

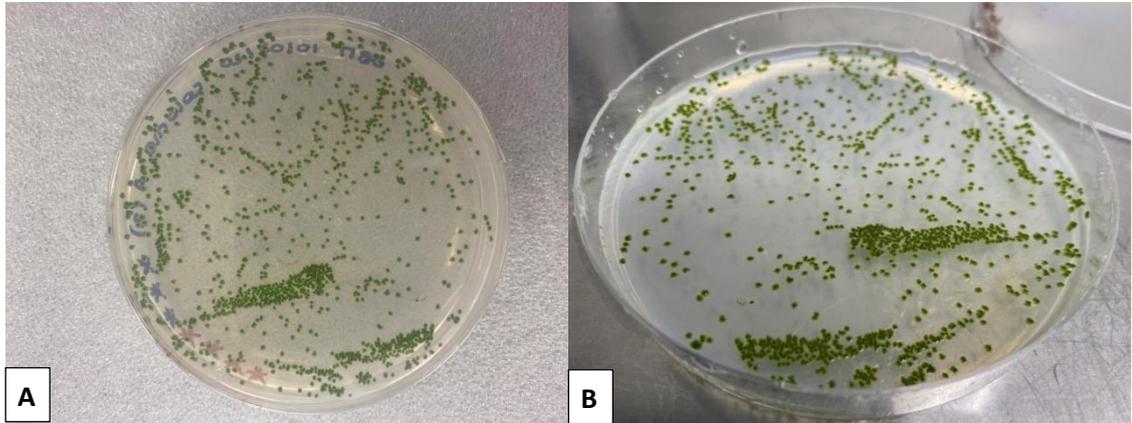
Resultados

Aislamiento e identificación taxonómica morfológica

En el presente estudio, luego de realizar repiques consecutivos a partir de las muestras obtenidas de la Reserva Ecológica Antisana en medio de cultivo BBM, se logró obtener un cultivo de colonias axénicas en placa, visualizadas en la Figura 1. Se observaron colonias de color verde, individuales y bien definidas. A esta especie se le asignó el identificador institucional AGBBM-141119, para su registro y almacenamiento en la institución. De igual forma, se utilizó el medio de cultivo BG11, con la diferencia de que con este medio las colonias crecieron de color marrón, agrupadas y poco definidas (data no mostrada).

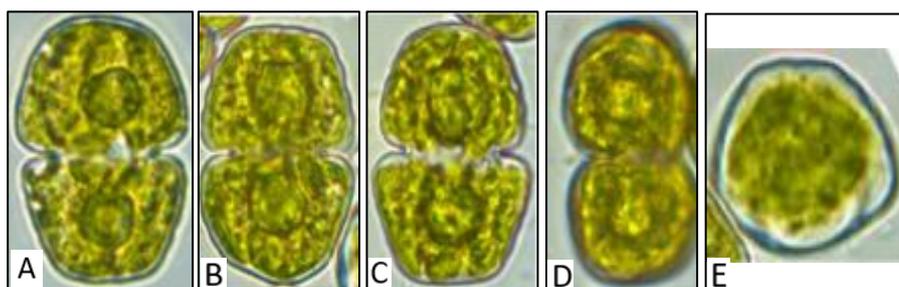
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Figura 1. Cultivo axénico de AGBBM-141119 en medio BBM. Alga recolectada de la Reserva Ecológica Antisana. Vista superior (A). Vista con inclinación lateral (B).



En la Figura 2 se logra observar la morfología de las células del cultivo axénico AGBBM-141119, la cual consta de semicélulas rugosas, ovaladas, truncadas, con 2 cloroplastos y con 2 pirenoides. Se determinaron rangos de 52.6 a 58.5 μm y de 17.8 a 23.8 μm de largo y ancho, respectivamente. Una vez observadas las características mencionadas, se identificó a la microalga de acuerdo a la referencia bibliográfica de Hantzsch (1868) como la especie *Cosmarium subcrenatum*, registrada por primera vez en 1868 por Hantzsch y descrita en la obra; *Flora europaea algarum aquae dulcis et submarinae. Sectio III. Algae chlorophyllophyceas, melanophyceas et rhodophyceas complectens. pp. i-xx, 1-461, 51 figs. Lipsiae [Leipzig]: Apud Eduardum Kummerum.*

Figura 2. Vista morfológica de las células del cultivo axénico AGBBM-141119 en microscopio óptico con aumento 100X. Vista frontal (A-C). Vista Lateral (D). Vista apical (E).

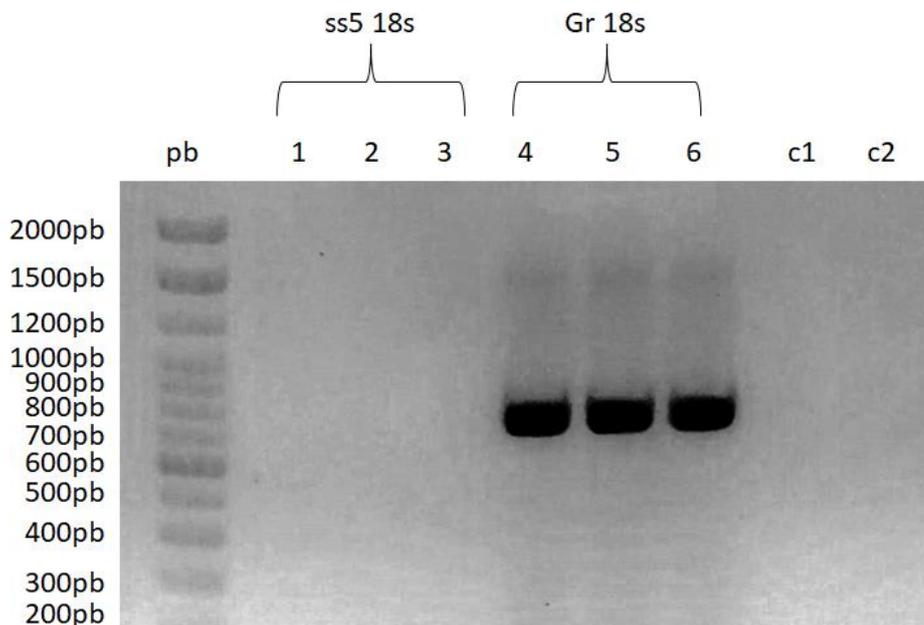


IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Identificación molecular

En la Figura 3 se observa, por triplicado, el producto de las amplificaciones por PCR de colonia de las muestras del cultivo axénico AGBBM-141119. No se observaron amplificaciones empleando el set de cebadores ss5, a pesar de haber utilizado un gradiente de temperatura. Contrariamente, los cebadores Gr si lograron generar amplicones, mostrados como bandas bien definidas, intensas y únicas por muestra, con un tamaño aproximado de 750 pb. Conviene enfatizar que los cebadores Chloro e ITS (Moro et al., 2009) (Hadi et al., 2016), no generaron amplicones para sus regiones diana respectivas (data no mostrada).

Figura 3. Análisis electroforético de la amplificación por PCR de colonia de la región 18S ribosomal de AGBBM-141119. Amplificación por los cebadores: ss5 (1-3), Gr (4- 6), control H2O sin templado (C1 y C2) y marcador molecular 100 pb.



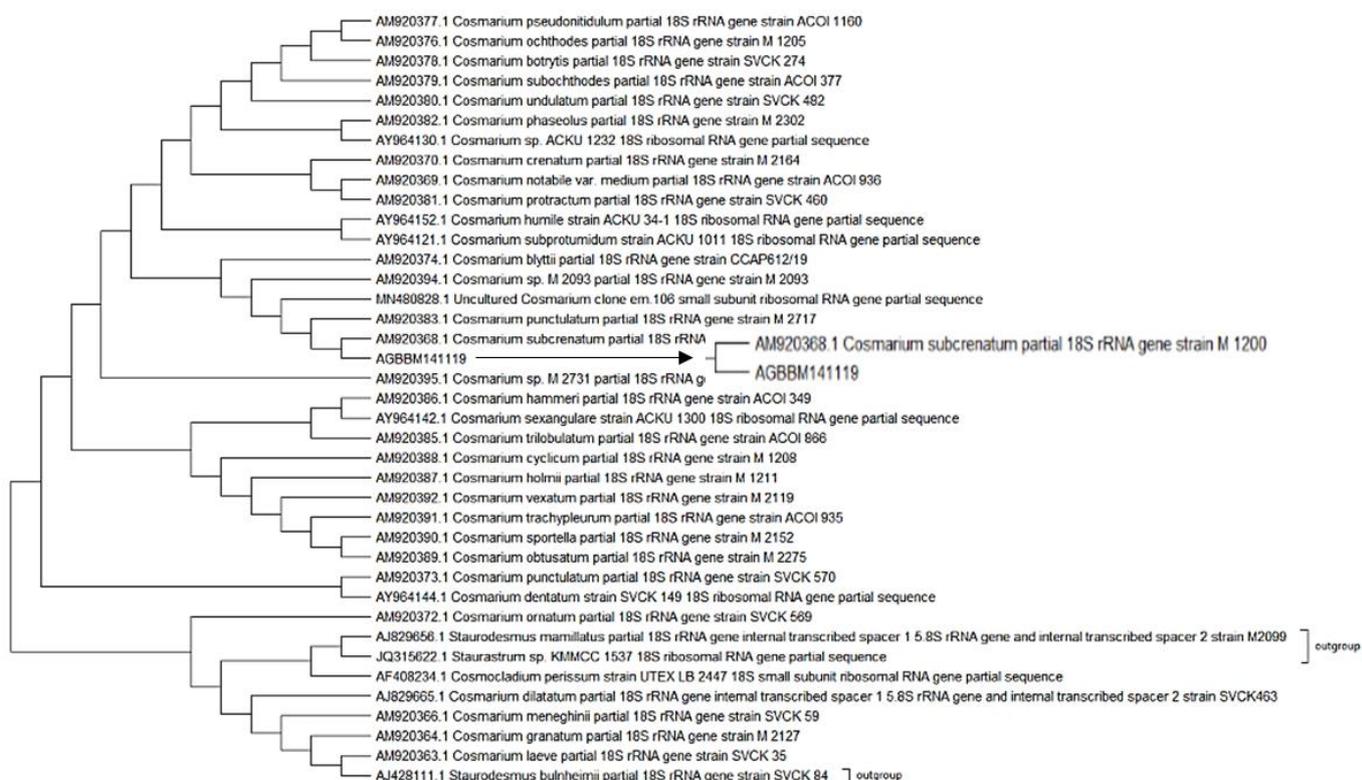
Análisis Filogenético

La secuencia consenso obtenida a partir de las secuenciaciones de los amplicones generados por los cebadores Gr (18s) fue de 668 pb. En la Figura 4 se observa la construcción

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium* sp. AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

del árbol filogenético el cual muestra que la especie aislada AGBBM-141119 se agrupa con la secuencia AM920368 18S rRNA partial M 1200 de la especie *Cosmarium subcreanatum*, indicando un grado de divergencia del 0% entre las dos secuencias. Por lo tanto, el análisis filogenético sugiere que AGBBM-141119 pertenece al género *Cosmarium*, especie *subcreanatum*.

Figura 4. Árbol filogenético de la región 18S Especie AGBBM-141119 Antisana.



Crecimiento y densidad óptica

En la Figura 5 se observa la curva de crecimiento de AGBBM-141119 durante 12 días, determinada a partir del conteo celular en la cámara de Neubauer, con una concentración inicial de $3,17 \pm 2,33 \times 10^4$ células/mL. El crecimiento presenta una fase de latencia en los días 0-2, seguida de una fase exponencial que concluye en el día 10, a partir del cual empieza una fase estacionaria, alcanzado una concentración celular final de $3,76 \pm 0,120 \times 10^5$ células/ mL.

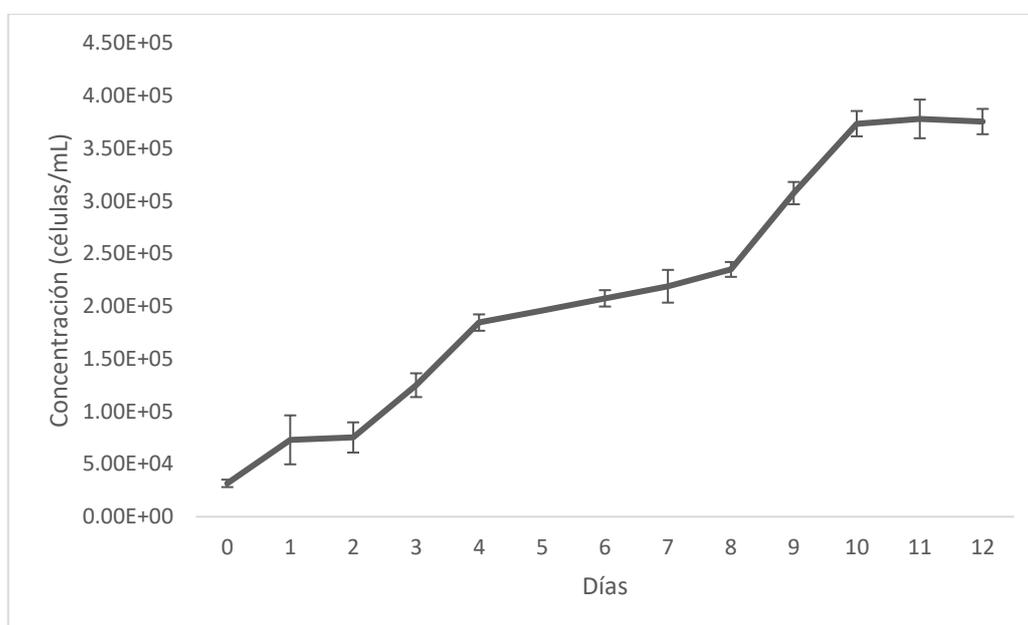
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Adicionalmente, se registraron absorbancias iniciales y finales de $0,051 \pm 0,00$ y $1,942 \pm 0,17$, respectivamente (Anexo 1.9). Los valores finales son estadísticamente significativos en comparación con los valores iniciales ($p < 0,05$).

Por otra parte, la velocidad específica de crecimiento máxima calculada fue de 0.22 (días⁻¹) (Anexo 1.7) junto una productividad celular global de 28650 células/(mL.día) (Anexo 1.8).

Figura 5. Cinética de crecimiento de AGBBM-141119 por conteo celular, en medio BBM.

Los puntos en la curva denotan los días de conteo y variación por días



Discusión

La especie *Cosmarium subcrenatum* a lo largo del tiempo ha llamado la atención de varios científicos a nivel del mundo debido a sus características morfológicas y sus potenciales usos biotecnológicos, es por esto que Lezenweger (2003) identificó 162 especies de desmidos, 10 de las cuales son nuevas para Austria y entre las cuales se encontró la especie *Cosmarium subcrenatum*. Las muestras fueron recolectadas en la flora ártico-alpina, es decir en un clima extremo. De la misma manera, el estudio de Şahin & Akar (2007) también corrobora que el

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium* sp. AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

género *Cosmarium* puede crecer en ambientes con temperaturas que oscilan entre 4 y 16.5 °C. De forma similar, las muestras del presente estudio fueron obtenidas en la Reserva Ecológica Antisana, la cual presenta un rango de temperatura de 4.7 a 8 °C, por lo tanto, según la bibliografía mencionada y la presente investigación esta especie puede desarrollarse y sobrevivir en este tipo de ecosistemas.

Por otra parte, se conoce que, en Sao Paulo, Brasil el ficólogo Carlos Eduardo de Mattos Bicudo es el científico que más estudios ha realizado sobre el género *Cosmarium*. Sin embargo, en las diversas investigaciones de identificación taxonómica publicadas por Bicudo & Menezes (2006), no se ha descubierto la especie *Cosmarium subcrenatum*. Similarmente, en Ecuador no existen estudios sobre el género *Cosmarium* y la especie *subcrenatum*. Es por ello que es necesario realizar una identificación molecular y usar herramientas bioinformáticas, las cuales permiten corroborar la identificación morfológica de este género de microalgas. El análisis morfológico descrito en la obra de Hantzsch, (1868) permitió clasificar a AGBBM-141119 como *Cosmarium subcrenatum*. Todo lo antes mencionado destaca la importancia de continuar y profundizar, a nivel regional, las investigaciones a nivel molecular, que vayan de la mano con la identificación taxonómica clásica. Esto para que todos los potenciales usos biotecnológicos presentes en las microalgas puedan ser descubiertos y explotados.

A pesar de que la identificación taxonómica clásica siga siendo muy utilizada hoy en día, las herramientas de biología molecular ofrecen una certera confirmación del género y/o especie que se está investigando. Por este motivo en esta investigación se realizó una identificación molecular de AGBBM-141119, utilizando cebadores que sirvieron como punto de partida para la replicación del ADN. Se utilizaron los cebadores ITS, los cuales amplifican las regiones espaciadoras internas del ADNr y permiten realizar estudios filogenéticos a diferentes niveles taxonómicos (Saltos, 2012). También se utilizaron los cebadores Chloro, ss5 y Gr que amplifican regiones flanqueantes altamente conservadas de la subunidad ribosomal

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium* sp. AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

18s. Sin embargo, Chloro y ss5 no amplificaron *C. subcrenatum*. Esto podría deberse a que el cebador Chloro fue diseñado específicamente para la clase taxonómica de microalgas *Chlorophyceae* (Moro et al., 2009) y el cebador ss5 no presentó identidad con la secuencia de la especie estudiada obtenida del NCBI (Anexos 1.1 y 1.2.). El cebador ITS tampoco amplificó a *C. subcrenatum*, lo cual podría estar relacionado con que existen mismatches entre los cebadores y la secuencia de dicha especie (Anexos 1.3 y 1.4). Los cebadores Gr si lograron amplificar la región 18S, lo cual podría estar asociado a que existe identidad del 100% con las secuencias del templado y los cebadores respectivamente (Anexos 1.5 y 1.6). Tomando en cuenta lo antes mencionado, la presente investigación no concuerda con el autor Khaw et al.(2020), en relación al cebador ss5, el cual indica que al utilizarlo se obtiene una universalidad del 94,29% en términos de amplificación y secuenciación de microalgas en la región 18S. Sin embargo, en dicho estudio el autor Khaw et al.(2020) si concuerda con lo mencionado en relación a los cebadores Gr, ya que tienen una correlación relativa del 88.57%. Por tal motivo representó un método eficiente para identificar microalgas del género *Cosmarium*. Después de los análisis realizados sobre los cebadores utilizados y la secuencia obtenida del NCBI de la microalga *C. subcrenatum*, se puede confirmar que los cebadores Gr son óptimos para la amplificación de esta especie, y que existe concordancia entre la identificación taxonómica clásica y molecular. La realización de procedimientos que permitan una identificación confiable hasta el nivel taxonómico de especie, como el llevado a cabo en este estudio, representa una ventaja al momento de asignar características microbiológicas o potencial biotecnológico a una especie en concreto. Dicha aproximación, es diferente a los estudios en los cuales se evalúa la aplicabilidad en la industria, pero únicamente usando la identificación de microorganismos hasta el nivel taxonómico de género. Con base en esto, se recomienda que la evaluación del potencial biotecnológico de un microorganismo vaya acompañada con una identificación confiable, apoyada en herramientas clásicas y moleculares.

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Con relación al crecimiento de AGBBM-141119 (*C. subcrenatum*), se obtuvieron valores finales de 3.76×10^5 células/mL. En la investigación realizada por Daneshvar et al. (2005) se evaluó el potencial de *Cosmarium sp* para la biodegradación de aguas contaminadas con colorantes textiles, la remoción del colorante aumentaba significativamente junto con la cantidad de biomasa hasta alcanzar una concentración celular de 4.5×10^6 células/mL. En otro estudio realizado por Hammound et al. (2015) se evaluó a *Cosmarium subtumidum* con diferentes intensidades de luz de (1500, 200 y 2500 lux), con el fin de obtener mas biomasa la cual se puede utilizar para la nutrición del fitoplancton. Dicho estudio obtuvo una concentración celular de 1.65×10^3 células/mL. De esta forma, la concentración de biomasa de AGBBM-141119 es similar a lo descrito en la bibliografía. Las comparaciones de la productividad celular y velocidad de crecimiento se realizaron con las especies *Desmodesmus communis* y *Desmodesmus armatus* debido a que se cultivaron bajo las mismas condiciones de temperatura 25°C e intensidad de luz 3000 luxes, en el estudio de Encalada-Rosales (2021), la especie *Desmodesmus communis* presentó una velocidad de crecimiento de 0.1 (días⁻¹) y una productividad celular de (256000/(mL.día)), mientras que en el estudio de González-Loyo (2021), la especie *Desmodesmus armatus* generó una velocidad de crecimiento de 0.052 (días⁻¹) y una productividad celular de (188000 (células/(mL.día))). La velocidad de crecimiento mostrada por AGBBM-141119 fue de 0.22 (días⁻¹) alcanzando una productividad celular de (28650 células/(mL.día)). Como se puede observar la especie *C. subcrenatum* a pesar de presentar una mayor velocidad de crecimiento alcanza una menor productividad celular con respecto a otras especies como *D. communis* y *D. armatus* es por ello que debido a los escasos trabajos asociados a la especie *C. subcrenatum*, es necesario profundizar los estudios sobre sus características microbiológicas y además a la obtencion de biomasa para usos biotecnológicos.

Por todo lo antes mencionado es necesario destacar la importancia de los análisis moleculares, taxonómicos y filogenéticos para la identificación de especies que conforman la

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

biodiversidad en el Ecuador, ya que al ser un país megadiverso en términos de ecosistemas, tiene potencial de futuras investigaciones y especies a descubrir que aporten en el campo de la biotecnología.

Conclusiones

Hasta el día de hoy en todo el Ecuador no existen estudios morfológicos ni moleculares de *Cosmarium subcrenatum*, por lo que el presente estudio representa un avance a nivel biotecnológico y un gran aporte para las investigaciones sobre la biodiversidad que existe en los ecosistemas del país. Los análisis morfológicos aportaron características importantes para la identificación de AGBBM-141119 aislada de la Reserva Ecológica Antisana, la cual se identificó que pertenece al género *Cosmarium*. Estos resultados fueron corroborados por los análisis moleculares y filogenéticos. De esta forma, se obtuvo una concordancia entre las aproximaciones morfológicas clásicas y moleculares, concluyendo que AGBBM-141119 pertenece a la especie *Cosmarium subcrenatum*.

Los resultados preliminares obtenidos tanto para el potencial de crecimiento celular como biomasa, son favorables para desarrollar investigaciones biotecnológicas. Sin embargo, se hace necesario profundizar sobre las características microbiológicas de AGBBM-141119.

Recomendaciones

Esta investigación es pionera en el Ecuador y para futuras investigaciones representa el inicio de grandes descubrimientos que pueden aportar a los diferentes ecosistemas que existen en el país, a la identificación de diversas especies aun no descubiertas que existen en ellos y a las aplicaciones biotecnológicas que pueden ser usadas para beneficio de la naturaleza y el ser humano. Por lo que se recomienda analizar las diferentes condiciones de crecimiento de esta microalga, evaluando cual medio de cultivo es el óptimo para generar una mayor cantidad de

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

biomasa y a la vez una mayor productividad de las aplicaciones biotecnológicas, como obtención de balanceado para peces, elaboración de biodisel y producción de antioxidantes.

Bibliografía

- Anderson, R. (2005). *Algal Culturing Techniques* (F. Cynar & P. M. J. Palmeiro (eds.); Copyright, p. 368).
- Araújo, A. (2006). *Diversidade específica e de hábitat dos Cosmarium de parede lisa (Zygnemaphyceae) do estado de São Paulo*. UNESP.
- Bicudo, de M., & Menezes, C. (2006). *GÉNERO DE ALGAS DE AGUA CONTINENTALES DE BRASIL*.
- Brown, K. J., Rüber, L., Bills, R., & Day, J. J. (2013). Mastacembelid eels support lake tanganyika as an evolutionary hotspot of diversification. *BMC Evolutionary Biology*, 23(3). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-188>
- Conrad, D. J. (2003). The clinical use of aerosolized antibiotics. *Clinical Pulmonary Medicine*, 10(4), 201–207. <https://doi.org/10.1097/01.cpm.0000080903.11193.e9>
- Daneshvar, N., Ayazloo, M., Khataee, A. R., & Pourhassan, M. (2007). Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium sp.* *Bioresource Technology*, 98(6), 1176–1182. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.025>
- De Mattos Bicudo, C. E. M. M. (2006). *GÉNERO DE ALGAS DE AGUA CONTINENTALES DE BRASIL*.
- Encalada-Rosales, P. E. (2021). Aislamiento, identificación y evaluación del potencial generador de biocombustibles de *Desmodesmus communis* procedente de la Reserva Biológica Limoncocha. Universidad Internacional SEK
- González-Loyo, J. F. (2021). Aislamiento, identificación y evaluación del potencial generador de biocombustibles de *Desmodesmus armatus* procedente de la Reserva Biológica Limoncocha. Universidad Internacional SEK
- Gross, W., Heilmann, I., Lenze, D., & Schnarrenberger, C. (2001). Biogeography of the cyanidiaceae (rhodophyta) based on 18s ribosomal rna sequence data. *European Journal*

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

of Phycology, 36(3), 275–280. <https://doi.org/10.1080/09670260110001735428>

Hadi, S. I. I. A., Santana, H., Brunale, P. P. M., Gomes, T. G., Oliveira, M. D., Matthiensen, A., Oliveira, M. E. C., Silva, F. C. P., & Brasil, B. S. A. F. (2016). DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PLoS ONE*, 11(2), 1–18.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149284>

Hammoud, N., Mayhoub, H., & Allaan, T. (2015). The influence of illumination and soil extract concentration on growth rate and protein content of *Cosmarium subtumidum* microalgae. ~ 27 ~ *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(5), 27–31.

Hantzsch. (1868). *Flora europaea algarum aquae dulcis et submarinae. Sectio III. Algas chlorophyllophyceas, melanophyceas et rhodophyceas complectens.*

Khaw, Y. S., Khong, N. M. H., Shaharuddin, N. A., & Yusoff, F. M. (2020). A simple 18S rDNA approach for the identification of cultured eukaryotic microalgae with an emphasis on primers. *Journal of Microbiological Methods*, 172(August 2019).

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105890>

Lezenweger, R. (2003). Desmids from some alpine lakes in Austria (Niedere Tauern, Steiermark). *Algological Studies/Archiv Für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 110(November), 27–41. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2003/0110-0027>

Manoj, B. S., Ahlawat, S., Chavan, M., & Karosiya, A. (2018). Successive production of biodiesel and bioethanol feedstock from the *Cosmarium sp.* *International Journal of Chemical Studies*, 6(6), 550–554. <https://doi.org/10.22271/chemi.2018.v6.i6j.14>

Moro, C. V., Crouzet, O., Rasconi, S., Thouvenot, A., Coffe, G., Batisson, I., & Bohatier, J. (2009). New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5729–5733.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00509-09>

Mundt, F., Hanelt, D., Harms, L., & Heinrich, S. (2019). Darkness-induced effects on gene expression in *Cosmarium crenatum* (Zygnematophyceae) from a polar habitat. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47041-7>

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium* sp. AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

- Nieto, Carlos, Tapia César, Paredes, Nelly, Nieto Mercedes, Añazco, Mario , Hidrobo, Gabriela, F. E. (2017). *La Biodiversidad para la Agricultura y la Alimentación en el Ecuador*.
- Osório, N. C., Polinario, A. M., Dunck, B., Adame, K. L., Carapunarla, L., Junqueira, M. G., Fernandes, U. L., & Rodrigues, L. (2018). Periphytic cosmarium (Zygnematophyceae, desmidiaceae) in lentic environments of the upper paraná river floodplain: Taxonomy and ecological aspects. In *Acta Limnologica Brasiliensia* (Vol. 30).
<https://doi.org/10.1590/s2179-975X4717>
- Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. J. (2011). Códigos de barras de la vida: Introducción y perspectiva. In *Acta Biologica Colombiana* (Vol. 16, Issue 3, pp. 161–175).
- Rafika, C., Khemissa, G., & Ouada, H. Ben. (2012). Antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities of extracts from the thermophilic green alga, *Cosmarium* sp. *African Journal of Biotechnology*, 11(82), 14844–14849. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1118>
- Ramírez-Salcedo, J., Chavez, L., & Guzmán-León, S. (2014). *Microarreglos de DNA: Fabricación Proceso y Análisis*.
- Ramírez D., N., Serrano R., J. A., & Sandoval T., H. (2006). Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37, 56–71.
- Şahin, B., & Akar, B. (2007). The desmid flora of some high mountain lakes of the Turkish Eastern Black Sea region. *Pakistan Journal of Botany*, 39(5), 1817–1832.
- Saltos, N. (2012). *Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino Lulwarthia grandispora*. 91.
- Solomon, E., Berg, L., & Martin, D. (2013). *Biología*.
- Stamenković, M., & Hanelt, D. (2011). Growth and photosynthetic characteristics of several *Cosmarium* strains (Zygnematophyceae, Streptophyta) isolated from various geographic regions under a constant light-temperature regime. *Aquatic Ecology*, 45(4), 455–472.
<https://doi.org/10.1007/s10452-011-9367-7>
- Urbieta, M. S. (2013). *Diversidad Microbiana en Ambientes Volcánicos María Sofía Urbieta*. 11–15.

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Índice de figuras

Figura 1. Cultivo axénico de AGBBM-141119 en medio BBM. Alga recolectada de la Reserva Ecológica Antisana. Vista superior (A). Vista con inclinación lateral (B).	17
Figura 2. Vista morfológica de las células del cultivo axénico AGBBM-141119 en microscopio óptico con aumento 100X. Vista frontal (A-C). Vista Lateral (D). Vista apical (E).....	17
Figura 3. Análisis electroforético de la amplificación por PCR de colonia de la región 18S ribosomal de AGBBM-141119. Amplificación por los cebadores: ss5 (1-3), Gr (4- 6), control H2O sin templado (C1 y C2) y marcador molecular 100 pb.	18
Figura 4. Árbol filogenético de la región 18S Especie AGBBM-141119 Antisana	19
Figura 5. Cinética de crecimiento de AGBBM-141119 por conteo celular, en medio BBM.	20

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Índice de anexos

Anexo 1.1. Alineamiento en Clustal Omega de <i>Cosmarium subcrenatum</i> para la región 18S con el primer forward.....	30
Anexo 1.2. Alineamiento en Clustal Omega de <i>Cosmarium subcrenatum</i> para la región 18S con el primer reverse	30
Anexo 1.3. Alineamiento en Clustal Omega de <i>Cosmarium subcrenatum</i> para la región 18S con el primer forward.....	30
Anexo 1.4. Alineamiento en Clustal Omega de <i>Cosmarium subcrenatum</i> para la región 18S con el primer reverse	31
Anexo 1.5. Alineamiento en Clustal Omega de <i>Cosmarium subcrenatum</i> para la región 18S con el primer forward.....	31
Anexo 1.6. Alineamiento en Clustal Omega de <i>Cosmarium subcrenatum</i> para la región 18S con el primer reverse	31
Anexo 1.7 Gráfica de velocidad específica de crecimiento máxima	32
Anexo 1.8 Gráfica del potencial celular global.....	32
Anexo 1.9 Cinética de crecimiento de AGBBM-141119 por densidad óptica a 680 nm, en medio BBM.....	33

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Anexo 1

Anexo 1.1. Alineamiento en Clustal Omega de *Cosmarium subcrenatum* para la región 18S con el primer forward

```
Cosmarium      GGGGCATTTCGTATTTTCATTGTCAGAGGTGAAAATTCCTTGGATTTATGAAAAGACGAACTACT
ss5            -----GCCAGTAGTCATATGCTTG-----
                *  ***  **  *  **  ****
```

- Se observa la secuencia de *Cosmarium subcrenatum* y la secuencia del primer forward ss5

Anexo 1.2. Alineamiento en Clustal Omega de *Cosmarium subcrenatum* para la región 18S con el primer reverse

```
Cosmarium      TCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTCTTTTATACTGTGAAACTGCCGAATG      60
ss5            -----GGTTTCCGTAGGTGAACCTGCCGGAAG      26
                ***          *****  *****  *  *

Cosmarium      GCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGATAACCGTAGTAAT      120
ss5            GATC-----
                *  **
```

- Se observa la secuencia de *Cosmarium subcrenatum* y la secuencia del primer reverse ss5

Anexo 1.3. Alineamiento en Clustal Omega de *Cosmarium subcrenatum* para la región 18S con el primer forward

```
Cosmarium      TTGTGAGAAGTTCATTAAACCTTATCATTAGAGGAAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCG
ITS1           -----AGGAGAAGTCGTAACAAGGT-----
                *****
```

- Se observa la secuencia de *Cosmarium subcrenatum* y la secuencia del primer forward ITS1

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Anexo 1.4. Alineamiento en Clustal Omega de *Cosmarium subcrenatum* para la región 18S

con el primer reverse

```
Cosmarium      GATGGGGATAGATTATTGCAATTATTGATCTTCAACGAGGAATACCTAGTAAGCGCGAGT
ITS4           -----TCCTCCGCTTATTGATATGC-----
                * * * ***** * *
```

- Se observa la secuencia de *Cosmarium subcrenatum* y la secuencia del primer reverse ITS4

Anexo 1.5. Alineamiento en Clustal Omega de *Cosmarium subcrenatum* para la región 18S

con el primer forward

```
Cosmarium      GGGGCATTCGTATTTTCATTGTCAGAGGTGAAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACT      900
Gr             -----GTCAGAGGTGAAAATTCTTGGATTTA-----      25
                *****
```

- Se observa la secuencia de *Cosmarium subcrenatum* y la secuencia del primer forward Gr

Anexo 1.6. Alineamiento en Clustal Omega de *Cosmarium subcrenatum* para la región 18S

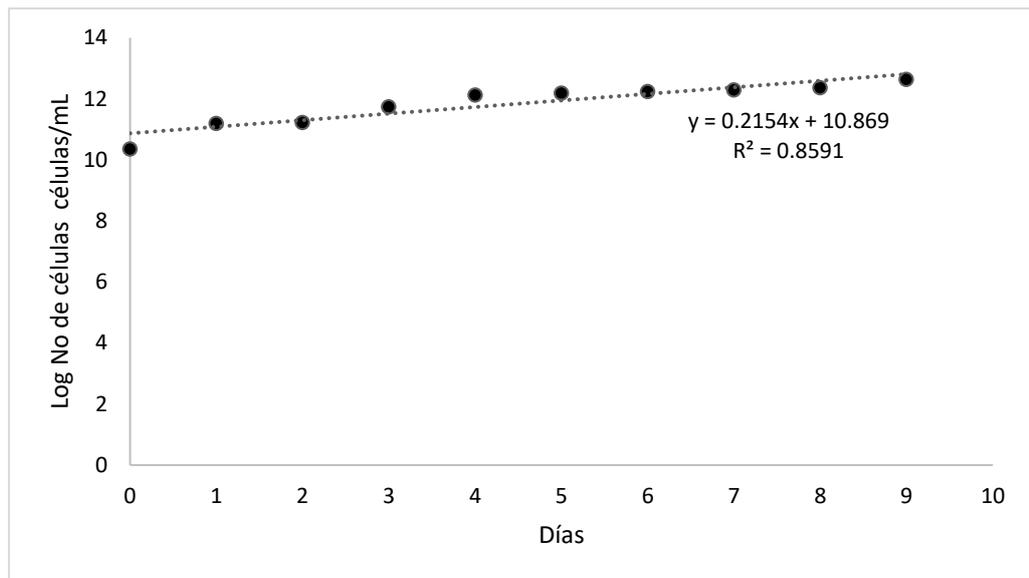
con el primer reverse

```
Cosmarium      CATCAGCTCGCGTTGATTACGTCGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGA
Gr             -----CGTTGATTACGTCGCCCTT-----
                *****
```

- Se observa la secuencia de *Cosmarium subcrenatum* y la secuencia del primer reverse Gr

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

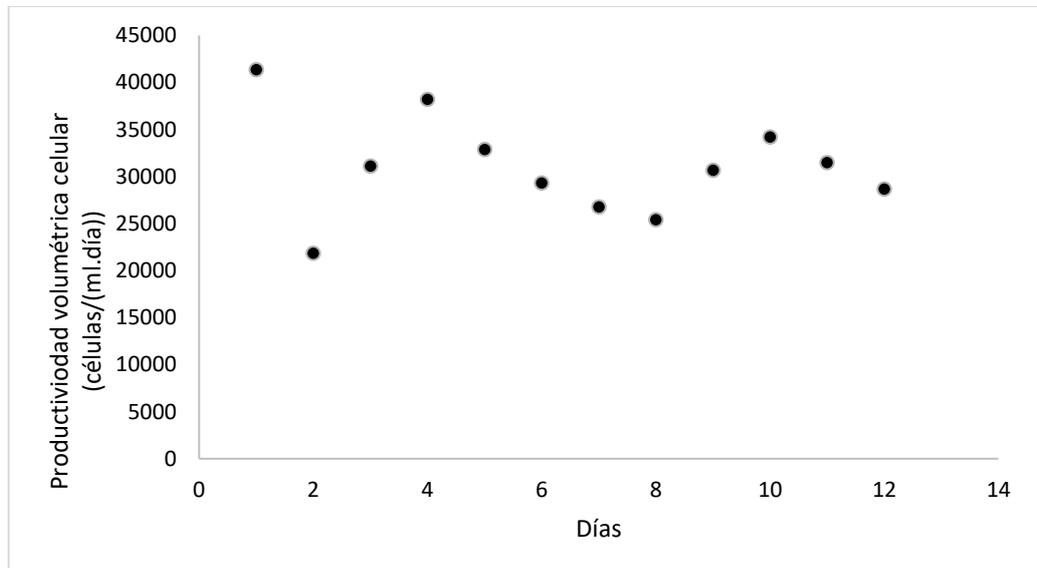
Anexo 1.7 Gráfica de velocidad específica de crecimiento máxima



- Se observa la velocidad específica de crecimiento máxima de

Cosmarium subcrenatum obteniendo un valor de 0.22 (días⁻¹)

Anexo 1.8 Gráfica del potencial celular global

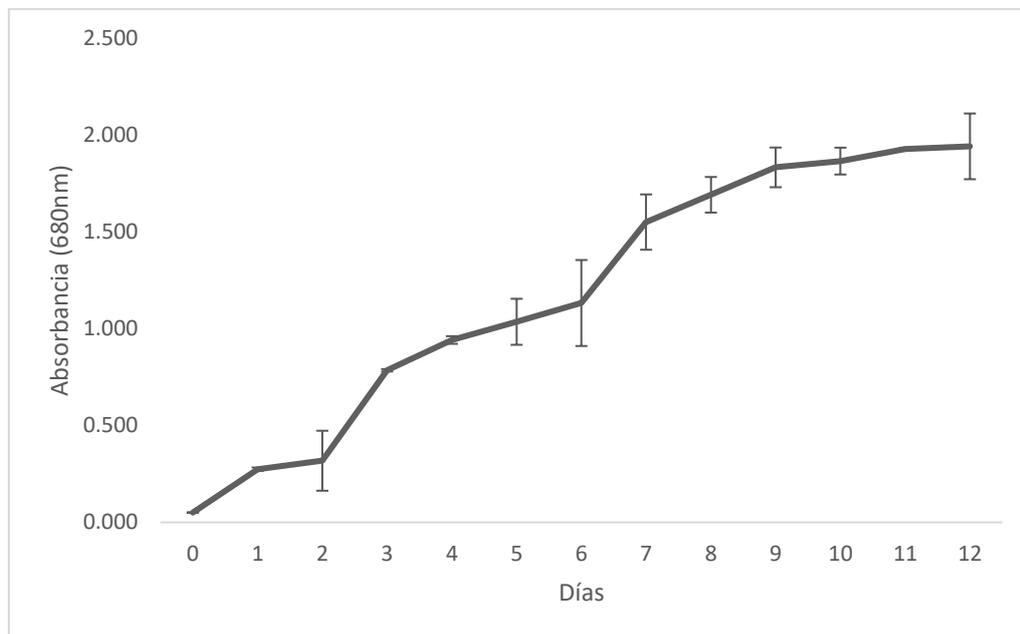


- Se observa el potencial celular global de *Cosmarium subcrenatum*

obteniendo un valor de 28650 células/(mL.día)

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Cosmarium sp.* AISLADO DE LOS LAGOS DE LA RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA

Anexo 1.9 Cinética de crecimiento de AGBBM-141119 por densidad óptica a 680 nm, en medio BBM.



- Se observa la cinética de crecimiento por absorbancia a 680 nm de *Cosmarium subcrenatum* obteniendo un valor de 28650 células/(mL.día)