



UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL
EN *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.*”**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGA

AUTOR:

NATHALY ALEJANDRA AYO GAVIN

TUTOR:

Blga. JANETH GALARZA TIPÁN, PhD.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2024

UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL
EN *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.*”**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGA

AUTOR:

NATHALY ALEJANDRA AYO GAVIN

TUTOR:

Blga. JANETH GALARZA TIPÁN, Ph.D.

LA LIBERTAD – ECUADOR

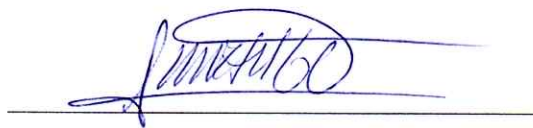
2024

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, “**Evaluación de tres protocolos de extracción de ADN total en *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.***”, elaborado por Ayo Gavin Nathaly Alejandra, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Bióloga. Me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos. Razón por la cual, apruebo en todas sus partes encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

La Libertad, 8 de Julio de 2024

Atentamente



Blga. Janeth Galarza Tipán Ph.D.
DOCENTE TUTOR
C.I.0201234044

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “**Evaluación de tres protocolos de extracción de ADN total en *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.***”, elaborado por Nathaly Alejandra Ayo Gavin, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, éste cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

Atentamente

Blga. Dadsania Rodríguez Moreira Mgt.

DOCENTE DE ÁREA

CI: 0913042008

DEDICATORIA

A mi amada madre Alicia Gavin que con su amor, paciencia y sacrificio me inspiró a perseguir mis sueños.

A mi abuela Manuela Morocho, quien me ha acompañado con su sabiduría y gentileza a largo de este trayecto.

Gracias, por tanto.

AGRADECIMIENTO

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a la Blga. Janeth Galarza Tipán Ph.D. mi tutora de tesis, por su invaluable guía, su apoyo constante y su confianza durante todo el proceso de investigación y redacción de este trabajo. Sus valiosos conocimientos, sugerencias y dedicación han sido fundamentales para la culminación de esta tesis.

Asimismo, agradezco a mi familia y amigos, quienes me han brindado su apoyo incondicional, su amor y su comprensión durante todo este recorrido. Gracias por creer en mí y alentarme a cumplir esta meta.

Finalmente, expreso mi gratitud a la Universidad Península de Santa Elena, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar esta investigación y por todo el apoyo recibido a lo largo de mi formación académica.

A todos ustedes, infinitas gracias.

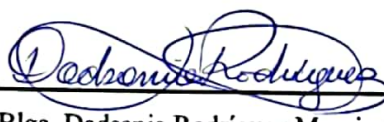
TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Nathaly Alejandra Ayo Gavin** como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo/a de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 15 de Julio de 2024



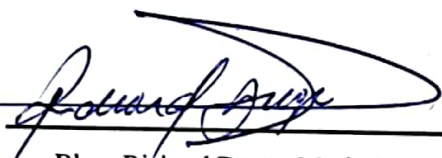
Ing. Jimmy Villón Moreno, MSc
DIRECTOR/A DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Blga. Dadsania Rodríguez Moreira, Mgt.
PROFESOR DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blga. Janeth Galarza Tipán Ph.D
DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blgo. Richard Duque Marín, Mgt.
DOCENTE GUÍA DE LA UIC II
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Lic. Pascual Roca Silvestre, MSc.
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

Declaración expresa

Yo, **NATHALY ALEJANDRA AYO GAVIN**, declaro bajo juramento que la responsabilidad por las ideas, contenido y análisis de los resultados expuestos en este trabajo de Integración Curricular pertenecen exclusivamente a los autores, y el patrimonio intelectual de los mismos, a la Universidad Península de Santa Elena (UPSE).



Nathaly Alejandra Ayo Gavin

CI: 0924483142

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
2. Problemática.....	4
3. Justificación.....	6
4. Objetivos	8
4.1. Objetivo General.....	8
4.2. Objetivos Específicos	8
5. Hipótesis.....	8
6. Marco Teórico	9
6.1. El Ácido Desoxirribonucleico	9
6.2. El ADN: Una herramienta fundamental en la comprensión de la vida	9
6.3. Importancia de la extracción de ADN	10
6.4. Evolución de los protocolos de extracción de ADN.....	11
6.5. Fases de la extracción de ADN.....	13
6.5.1. Lisis	13
6.5.2. Remoción de proteínas y contaminantes.	14
6.5.3. Precipitación de ADN.....	14
6.5.4. Lavado de ADN.....	15
6.5.5. Resuspensión	15
6.6. Principales componentes de los protocolos de extracción.....	16
6.6.1. CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio)	16
6.6.2. NaCl (Cloruro de sodio.....	17
6.6.3. Tris (Tris(hidroximetil)aminometano).....	17
6.6.4. EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético)	18
6.6.5. SDS (Dodecil sulfato de sodio)	18
6.6.6. Proteinasa K.....	18
6.6.7. β -mercaptoetanol	19
6.6.8. Fenol	19
6.6.9. Cloroformo	20
6.6.10. Alcohol isoamílico.....	20
6.6.11. Isopropanol/ Etanol.....	21
6.7. Evaluación de calidad del ADN.....	21
6.7.1. Importancia de la calidad e integridad del ADN.	21

6.7.2.	Fundamento de la espectrofotometría.....	22
6.7.3.	Fundamento de electroforesis.....	23
6.8.	Las Diatomeas	24
6.8.1.	Nitzschia sp.....	25
6.8.2.	Cymbella sp.....	25
7.	Marco Metodológico.....	27
7.1.	Extracción de ADN total.....	27
7.1.1.	Obtención y preparación de biomasa húmeda y seca	27
7.1.2.	Preparación de reactivos.....	27
7.1.3.	Protocolos de extracción.....	28
7.1.4.	Cuantificación de la concentración de ADN	32
7.2.	Evaluación de calidad del ADN.....	32
7.2.1.	Espectrofotometría por NanoDrop 2000c.....	32
7.2.2.	Electroforesis	33
7.3.	Relación Costo-Tiempo	34
7.4.	Análisis estadístico	36
8.	Resultados	37
8.1.	Obtención de ADN total a partir de tres protocolos de extracción.....	37
8.1.1.	Cymbella sp.....	37
8.1.2.	Nitzschia sp.....	42
8.2.	Calidad del ADN extraído	44
8.2.1.	Pureza	44
8.2.2.	Integridad.....	52
8.3.	Costos, tiempo y calidad.....	55
9.	Discusiones, Conclusiones y Recomendaciones.....	56
9.1.	Discusiones.....	56
9.2.	Conclusiones.....	63
9.3.	Recomendaciones.....	64
10.	Bibliografía.....	65
11.	ANEXOS.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Nitzschia sp.</i> Código PM020.....	25
Figura 2 <i>Cymbella sp.</i> Código PM016.	26
Figura 3 Concentración de ADN de <i>Cymbella sp.</i> según el estado de la muestra con el Protocolo NaCl.	38
Figura 4 Concentración de ADN de <i>Cymbella sp.</i> según el estado de la muestra con el Protocolo CTAB.	39
Figura 5 Concentración de ADN de <i>Cymbella sp.</i> según el estado de la muestra con el Protocolo SDS-PK.....	40
Figura 6 Concentración de ADN de <i>Cymbella sp.</i> entre protocolos de extracción con muestra seca.....	41
Figura 7 Concentración de ADN en <i>Nitzschia sp.</i> entre estado de la muestra con el Protocolo NaCl.	42
Figura 8 Concentración de ADN en <i>Nitzschia sp.</i> entre protocolos de extracción con muestra seca.....	44
Figura 9 Relación A260/280 en <i>Cymbella sp.</i> según el estado de la muestra con el Protocolo NaCl.	45
Figura 10 Relación A260/280 en <i>Cymbella sp.</i> según el estado de la muestra con el Protocolo SDS-PK.	46
Figura 11 Relación A260/280 de <i>Cymbella sp.</i> entre protocolos de extracción con muestras húmedas.....	47
Figura 12 Relación A260/280 de <i>Cymbella sp.</i> entre protocolos de extracción con muestras secas.....	48
Figura 13 Relación A260/280 en <i>Nitzschia sp.</i> según el estado de la muestra con el Protocolo NaCl.	49

Figura 14 Relación A260/280 de <i>Cymbella sp.</i> entre protocolos de extracción con muestras húmedas.....	50
Figura 15 Relación A260/280 de <i>Nitzschia sp.</i> entre protocolos de extracción con muestras secas.....	51
Figura 16 Electroforesis en gel de agarosa 1% muestras del Protocolo NaCl	54
Figura 17 Electroforesis en gel de agarosa 1%, muestras del Protocolo CTAB y SDS-PK	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Descripción detallada de los reactivos y soluciones para el Protocolo NaCl	29
Tabla 2	Descripción detallada de los reactivos y soluciones para el Protocolo CTAB	30
Tabla 3	Descripción detallada de los reactivos y soluciones para el Protocolo SDS-PK...	31
Tabla 4	Criterios de validez de acuerdo con los parámetros de calidad del espectrofotómetro.	33
Tabla 5	Criterios y puntuación estimado de acuerdo con la visualización de la banda.	34
Tabla 6	Integridad, pureza y concentración de ADN	52
Tabla 7	Resumen del tiempo y costo requerido por protocolo	55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Resumen de las medianas y diferencias significativas en concentración y pureza en <i>Cymbella</i> sp.	77
Anexo 2 Resumen de las medianas y diferencias significativas en concentración y pureza en <i>Nitzschia</i> sp.	77
Anexo 3 Detalle del costo de los componentes del protocolo NaCl.	78
Anexo 4 Detalle del costo de los componentes del protocolo CTAB	78
Anexo 5 Detalle del costo de los componentes del protocolo SDS-PK.....	79
Anexo 6 Detalle de la duración de los tres protocolos.	79
Anexo 7 Formación de pellet después de la precipitación de ADN con el protocolo NaCl80	
Anexo 8 Realización práctica del trabajo de investigación. Extracción de ADN	80
Anexo 9 Realización de electroforesis. Carga de muestras.....	80

GLOSARIO

Ácido nucleico: Biomoléculas que contienen la información genética de los seres vivos. Incluyen el ADN (ácido desoxirribonucleico) y el ARN (ácido ribonucleico).

Biología molecular: Área de la biología que estudia los procesos moleculares que tienen lugar en las células vivas, como la replicación, transcripción y traducción del material genético.

Buffer o tampón: Solución que mantiene un pH relativamente constante, aun cuando se le agreguen pequeñas cantidades de ácido o base.

Eficiencia: Capacidad de realizar una función con el mínimo de recursos posibles. En un proceso biológico, se refiere a obtener el mayor rendimiento con la menor cantidad de insumos.

Electroforesis: Técnica que separa moléculas, como proteínas o ácidos nucleicos, en función de su tamaño y carga eléctrica al aplicar un campo eléctrico.

Espectrofotometría: Técnica analítica que mide la cantidad de luz absorbida o transmitida por una muestra a diferentes longitudes de onda del espectro electromagnético.

Extracción de ADN: Proceso para aislar y purificar el ADN de una célula u organismo.

Integridad: Estado en el que se preserva la estructura y composición original de una molécula, como el ADN.

Lisis: Proceso de ruptura de la membrana celular y liberación del contenido de la célula.

Microalga: Organismos microscópicos fotosintéticos, como las diatomeas, cianobacterias y microalgas verdes.

Pellet: Precipitado compacto que se forma cuando se centrifuga una suspensión.

Polifenoles: Compuestos orgánicos que contienen múltiples grupos fenol en su estructura, con propiedades antioxidantes.

Polisacáridos: Macromoléculas formadas por la unión de varias unidades de monosacáridos.

Pureza: Grado de ausencia de contaminantes o impurezas en una sustancia.

Solvente orgánico: Compuesto químico de origen no mineral, capaz de disolver otras sustancias.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

NaOH: Hidróxido de sodio

IQR: Índice intercuartílico

IECT: Índice de eficiencia costo – tiempo

RPM: Revoluciones por minuto

AcNa: Acetato de sodio

NaCl: Cloruro de sodio

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

SDS: Dodecil sulfato de sodio

Tris: Trisaminometano

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

Me: mediana aritmética

Prot_NaCl: Protocolo salino

Prot_CTAB: Protocolo basado en CTAB

Prot_SDS-PK: Protocolo basado en SDS y proteinasa K

S: Biomasa seca

H: Biomasa húmeda

RESUMEN

La extracción de ADN constituye una etapa fundamental para la aplicación de técnicas moleculares. Sin embargo, los protocolos existentes no son universales ya que cada organismo plantea desafíos únicos. En particular, las diatomeas tienen una pared rígida de sílice y una gran variedad de metabolitos, lo cuales dificultan la obtención de material genético de calidad. La presente investigación se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la UPSE y tiene como objetivo evaluar tres protocolos de extracción de ADN total en *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.* para la selección de un método eficiente. El primer protocolo se basó en la sal NaCl, el segundo en CTAB y el tercero en SDS - Proteinasa K. Cada uno de estos protocolos se aplicó a la biomasa seca y húmeda de las dos especies ya mencionadas. Los parámetros analizados incluyeron la concentración, pureza e integridad del ADN, además se consideraron los costos y el tiempo empleado por cada protocolo. La mayor concentración de ADN se obtuvo de la biomasa seca con los protocolos NaCl (Me_{Cym} : 2083.45 $\frac{ng}{\mu l}$ y Me_{Nitz} : 433.05 $\frac{ng}{\mu l}$) y CTAB (Me_{Cym} : 923.40 $\frac{ng}{\mu l}$ y Me_{Nitz} : 317.65 $\frac{ng}{\mu l}$) para ambas especies. Por otro lado, en pureza *Nitzschia sp.* no presentó diferencias significativas en la relación A260/280, pero *Cymbella sp.* sí presentó diferencias, destacando el protocolo CTAB con una mediana de 2.02. Respecto a la relación tiempo y costo, el protocolo menos eficiente fue el SDS-PK. Por lo tanto, se concluye que el protocolo más eficiente es el CTAB, seguido de NaCl y por último SDS-PK.

Palabras clave: Extracción de ADN, Diatomeas, Pureza, Concentración, Integridad.

ABSTRACT

DNA extraction constitutes a fundamental step for the application of molecular techniques. However, the existing protocols are not universal, as each organism poses unique challenges. In particular, diatoms have a rigid silica cell wall and a wide variety of metabolites, which make it difficult to obtain high-quality genetic material. The present investigation was carried out at the Biotechnological Research Center of UPSE and aims to evaluate three protocols for extracting total DNA from *Nitzschia* sp. and *Cymbella* sp. to select an efficient method. The first protocol was based on NaCl, the second on CTAB, and the third on SDS-Proteinase K. Each protocol was applied to the dry and wet biomass of the two species above. The parameters analyzed included DNA concentration, purity, and integrity, in addition to the costs and time required for each protocol. The highest DNA concentration was obtained from dry biomass using the NaCl (Me_{Cym} : 2083.45 $\frac{ng}{\mu l}$ y Me_{Nitz} : 433.05 $\frac{ng}{\mu l}$) and CTAB (Me_{Cym} : 923.40 $\frac{ng}{\mu l}$ y Me_{Nitz} : 317.65 $\frac{ng}{\mu l}$) protocols for both species. On the other hand, in terms of purity, *Nitzschia* sp. did not show significant differences in the A260/280 ratio, but *Cymbella* sp. did, with the CTAB protocol standing out with a median of 2.02. Regarding the time-cost relationship, the SDS-PK protocol was the least efficient. Therefore, it is concluded that the most efficient protocol is CTAB, followed by NaCl, and lastly SDS-PK.

Keywords: DNA Extraction, Diatoms, Purity, Concentration, Integrity

1. Introducción

Las diatomeas son un grupo de microorganismos fotosintéticos unicelulares conocidos por su estructura celular única, ya que están envueltas por una pared de sílice llamada frústula que le confiere una apariencia en forma de caja (Round, Crawford y Mann, 1990). Las especies *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.* pertenecen a la clase de diatomeas pennadas, las cuales se caracterizan por su simetría bilateral, estos géneros están ampliamente distribuidos en diferentes ecosistemas acuáticos y tienen un papel ecológico importante (Okolodkov y Huerta-Quintanilla, 2018 y Martínez, 2020). En los últimos años, este grupo de microalgas han sido objeto de interés para estudios a nivel molecular principalmente ayudando en la identificación de especies de forma unitaria o en muestras ambientales (Falciatore, Jaubert, Bouly, Bailleul y Mock, 2020). Dado que el reconocimiento taxonómico basado en la observación de las valvas puede resultar muy tedioso incluso para expertos en el tema, se opta por complementar las investigaciones con análisis moleculares que pueden proporcionar datos más precisos y detallados de un organismo (Mora et al., 2019).

El primer paso para el inicio de pruebas moleculares es la extracción de ADN, esta molécula nos proporciona información sobre la identidad, biología y evolución de cada especie. Sin embargo, actualmente no existe un procedimiento único que pueda ser efectivo en todos los ámbitos de investigación, especialmente por sus limitaciones a la hora de obtener calidad y comodidad de uso óptimas (Dairawan y Shetty, 2020). Por tal razón es importante realizar un análisis comparativo de los diversos protocolos que existen en la literatura a fin de encontrar el que se adecue a las necesidades de cada especie y estado de la muestra.

Elegir un correcto protocolo para la extracción de ADN total en diatomeas es un desafío debido a la pared rígida de sílice que posee, lo cual dificulta la liberación del ADN. Vasselon, Domaizon, Rimet, Kahlert y Bouchez (2017) mencionan que es probable que los protocolos afecten de manera diferente a cada especie de diatomea debido a características estructurales y composición química única.

Los múltiples procedimientos que existen actualmente para la extracción de ADN se basan en una variedad de agentes químicos que desempeñan diferentes funciones en el proceso de extracción tales como: sales, detergentes, surfactantes, alcoholes, enzimas etc. (Dairawan y Shetty, 2020). Algunos protocolos pueden demorar más o ser más costosos, pero esto no implica nos brinden una buena calidad de ADN. Por tal razón es importante realizar una evaluación comparativa teniendo cuenta la cantidad y calidad de los resultados, pero sin dejar de lado costos y el tiempo implicado. De esta forma los investigadores podrán elegir con la información disponible que protocolo utilizar, a fin de optimizar los recursos y promover la investigación molecular en el Ecuador.

Estudios previos abordan este mismo enfoque, evaluado el desempeño de los distintos métodos existentes. Muñoz-Colmenero, Sánchez, Correa, Figueiras, Garrido y Sotelo (2020), analizan y comparan cinco protocolos de aislamiento de ADN (tres kits comerciales y uno basado en sales) utilizando muestras de distintas especies de fitoplancton, encontrando que los kits proporcionaban un mejor rendimiento. Por otro lado, Nguyen, Berzano, Gualerzi y Spurio (2011), evalúa seis kits comerciales y uno basado en CTAB, con muestras de diatomeas, concluyendo que los rendimientos de la PCR son mejores cuando no se utilizan kits. Estos estudios previos demuestran la relevancia de realizar estudios comparativos con las especies de interés.

En la presente investigación se ha escogido tres protocolos de extracción de ADN que destacan en investigaciones sobre diatomeas, el primero basado en la sal NaCl según (Edwards, Johnstone y Thompson, 1991 modificado por Castillejo, Ballesteros, Ríos, Cabrera, Heinrich y Lobo, 2022), el segundo basado en CTAB (Doyle y Doyle, 1987) y el tercero denominado SDS-Proteinasa K (Jacobs et al., 1992). Estos protocolos se aplicaron tanto en muestra seca como húmeda para las dos especies mencionadas anteriormente. Posteriormente se analizó la concentración, pureza e integridad de cada muestra por medio de espectrofotometría en Nanodrop y electroforesis en gel de agarosa. Adicionalmente se realizó un análisis del tiempo y costo para cada protocolo de extracción.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar tres protocolos de extracción de ADN total en *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.* mediante un análisis comparativo de la calidad y cantidad del material genético, para la selección de un método eficiente. Lo cual proporcionará una base sólida para futuros estudios genéticos y contribuirá al conocimiento de la biología molecular de estas especies de diatomeas.

2. Problemática

Desde el auge de la investigación genética, en todo el mundo se han creado numerosos protocolos de extracción de ADN, cada uno con sus propias ventajas y desventajas. Sin embargo, no todos son igualmente adecuados, reproducibles o eficientes para las diferentes muestras de interés, principalmente por las características químicas y morfológicas de cada célula. *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.* son organismos unicelulares microscópicos que pertenecen al grupo de las diatomeas, las cuales han resultado ser un problema en investigaciones relacionadas a la identificación molecular, esto debido a que poseen una pared celular rígida de sílice difícil de romper lo que dificulta la extracción de ácidos nucleicos e incrementa los costos del proceso de extracción de ADN.

Sumado a ello, la información científica demuestra que no es posible establecer un protocolo general para todas las diatomeas puesto que la resistencia mecánica de las frústulas depende de la especie muestreada, e intervienen factores como la forma, porosidad, espesor, tamaño y proporción de sílice, además los metabolitos presentes en cada especie varían en función del ambiente en el que se encuentran. Como consecuencia la pureza, integridad y concentración del ADN extraído disminuye afectando negativamente a la cantidad y calidad del material genético.

En Ecuador, los estudios a nivel molecular sobre *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.* son escasos. De acuerdo con una revisión exhaustiva en los repositorios de las universidades del país, la mayoría de las investigaciones sobre estas especies silíceas se basan en la abundancia y diversidad, en el cultivo para producción y en su capacidad como bioindicadores de calidad de agua. Existen tan solo tres tesis de grado relacionados a la extracción de ADN, en el que se utiliza el protocolo convencional basado en sales y se aplica en diatomeas epilíticas.

La falta de estudios comparativos de protocolos de extracción de ADN en especies de diatomeas marinas nativas de la Península de Santa Elena, genera inconvenientes al momento de realizar investigaciones de índole molecular, debido a la falta de optimización y sesgos o errores en la interpretación por una deficiente calidad de ADN. En base a lo antes mencionado surge la siguiente inquietud ¿Cuál es el método más eficiente para la extracción de ADN en *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.*?

3. Justificación

La extracción de ADN es un proceso fundamental en la investigación científica, ya que tiene una amplia gama de aplicaciones, tales como, la identificación de especies, la filogenia, la comprensión de los mecanismos de herencia e incluso la modificación genética. Sin embargo, para que esto se lleve a cabo es necesario utilizar un protocolo de extracción efectivo que se adecue al objetivo de cada investigación y que a la vez supere los obstáculos que conlleva trabajar con cada tipo de organismo.

En esta investigación se aplicaron tres diferentes protocolos de extracción de ADN en *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.*, diatomeas que han recibido una particular atención debido a que pueden ser tolerantes a la contaminación y bioindicadores de la calidad de un cuerpo de agua. Además, varios estudios destacan la necesidad de adoptar un enfoque de investigación genómica en este grupo de seres vivos para complementar la identificación morfológica clásica.

Estudios a nivel molecular en microalgas que incluyen a las diatomeas han reportado la aplicación de distintos protocolos de extracción de ADN, de entre los que han logrado destacarse se encuentran: Protocolo basado en la sal NaCl, protocolo basado en CTAB y protocolo SDS-Proteinasa K, estos han logrado obtener mejor resultado en cuanto a cantidad y calidad de ADN en comparación con diversos kits comerciales. Con el protocolo basado en CTAB se ha evidenciado que puede extraer alrededor de 699.83 µg/ml, SDS-Proteinasa K alrededor de 200 µg/ml y el protocolo NaCl demostró en electroforesis ser efectivo.

Al evaluar la integridad, pureza y concentración del ADN se asegura que los resultados de las pruebas posteriores sean precisos y confiables. Además, varios autores

concuerdan en que el costo y el tiempo que implica realizar estos procesos también son factores importantes a considerar en la investigación, ya que el uso de técnicas más avanzadas y costosas puede no ser viable en investigaciones con presupuestos limitados y al tener una comprensión clara de los recursos y el tiempo involucrado, los investigadores podrán tomar decisiones informadas de forma estratégica para garantizar el uso eficiente de recursos y la optimización de procesos.

En conclusión, la evaluación de tres protocolos de extracción de ADN en *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.* es esencial para avanzar en la investigación científica de diatomeas costeras en el Ecuador, ya que al mejorar la calidad de los datos genéticos se podrán generar conocimientos valiosos y aplicaciones prácticas en múltiples disciplinas, impulsando así la investigación genética en el país y beneficiando a la comunidad científica en general.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Evaluar tres protocolos de extracción de ADN total en *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.* mediante un análisis comparativo de la calidad y cantidad del material genético, para la selección de un método eficiente.

4.2. Objetivos Específicos

- Obtener ADN total de *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.* a partir de muestras secas y húmedas aplicando tres protocolos de extracción.
- Comparar la pureza e integridad del ADN aislado mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa.
- Analizar la eficiencia de los protocolos de la extracción de ADN en base a la relación costos - tiempo y calidad.

5. Hipótesis

H1: El protocolo de extracción basado en CTAB es eficiente para obtener ADN de óptima calidad en *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.*

6. Marco Teórico

6.1. El Ácido Desoxirribonucleico

El ácido desoxirribonucleico o también llamado ADN es la macromolécula que contiene la información genética de los organismos vivos, esta información es necesaria para lograr el desarrollo, mantenimiento y reproducción de todo ser viviente (Dairawan y Shetty, 2020). Está compuesto estructuralmente por unidades monoméricas denominadas nucleótidos, cada nucleótido contiene un azúcar de 5 carbonos, una base nitrogenada (timina, adenina, citocina y guanina) y un grupo fosfato (Michin y Lodge, 2019). Este último componente es el responsable de la carga negativa del ácido nucleico y le proporciona características acidas (Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2013).

La mayor parte del ADN de la célula se encuentra en el núcleo, sin embargo, también se pueden hallar pequeñas cantidades en la mitocondria el cual se denomina ADN mitocondrial (Pinilla-Bermúdez, 2019). En el caso de las microalgas, al ser organismos vegetales también poseen ADN cloroplástico, en conjunto conforman el ADN total.

6.2. El ADN: Una herramienta fundamental en la comprensión de la vida

El ADN nos puede proporcionar datos interesantes sobre las especies, para empezar la secuencia de nucleótidos del ADN es única para cada individuo, con lo cual las tareas de identificación han pasado de ser guiadas por el criterio del investigador a tener un resultado confiable mediante pruebas moleculares como la secuenciación metagenómica. Esto resulta beneficioso especialmente cuando se trabaja con microorganismos, como en el caso de las diatomeas, ya que las técnicas moleculares basadas en el ADN logran superar las

limitaciones morfológicas para identificar y clasificar a estos organismos. Adicionalmente la metagenómica permite la exploración y descubrimiento de nuevos genes su funcionalidad y productos metabólicos (Alindonosi, Baeshen y Elsharawy, 2021).

Según Sproles, Fields, Smalley, Le, Badary y Mayfield (2021), aunque el campo genético aún está en desarrollo para las microalgas, las herramientas moleculares actualmente disponibles aceleran enormemente la capacidad de los científicos para estudiar, manipular y mejorar las microalgas para obtener beneficios. Mediante el estudio del ADN y sus genes podemos realizar análisis filogenéticos que nos proporcionan información acerca de la evolución de plantas y animales, además nos permite explorar vías metabólicas, procesos biológicos en respuesta al estrés, los mecanismos de concentración de carbono y procesos implicados en los ciclos de nutrientes como el hierro, calcio, sílice, urea y nitrógeno (Cadoret, Garnier y Saint-Jean, 2012).

6.3. Importancia de la extracción de ADN

Con el fin de estudiar las propiedades biológicas y fisicoquímicas del ácido desoxirribonucleico, es recomendable contar con su estructura polimérica, ya que de esta manera se encontrará de forma lineal y unido covalente entre sus nucleótidos, lo cual le brindará más estabilidad y menor riesgo de fragmentarse en los análisis posteriores. Para ello, actualmente existen varias técnicas sencillas, rápidas, seguras y eficientes que permiten extraer y purificar el ADN a partir de diversas muestras (Pinilla-Bermúdez, 2019).

El aislamiento del ADN es el primer paso para cualquier estudio genético, por lo tanto, es una etapa crítica la cual debe realizarse con sumo cuidado. Los análisis moleculares como PCR, digestión mediante enzimas, hibridación, creación de bibliotecas genómicas y

secuenciación son muy sensibles, por lo que requieren de una alta calidad y cantidad de ADN. Obtener este resultado a menudo es difícil debido a la presencia de compuestos contaminantes en las células vegetales, como polisacáridos y polifenoles, los cuales pueden intervenir en la funcionalidad de algunas enzimas necesarias para los análisis genéticos, como las polimerasa, ligasas y endonucleasas. Por lo tanto, la selección de un método efectivo dependerá de la especie, tipo de muestra, propósito del análisis molecular y disponibilidad de recursos. (Nugroho, Satyawati, Tasma y Lestari, 2022).

6.4. Evolución de los protocolos de extracción de ADN

La primera extracción de ADN se realizó accidentalmente por el médico suizo Friedrich Miescher en 1869 cuando en su afán de comprender los fenómenos de crecimiento y multiplicación celular logró aislar los núcleos de los leucocitos y posteriormente notó que la sustancia que había extraído era insoluble, distinta a las proteínas que intentaba aislar, a esta nueva clase de sustancia celular la denominó “nucleína” (Dahm, 2008, como se cita en Ayoib, Hashim, Gopinath y Arshad, 2017). A partir de ese descubrimiento se han creado distintos métodos de extracción de ADN con el objetivo de minimizar el tiempo y recursos empleados y maximizar los resultados obtenidos en cuestión de cantidad y calidad.

En los años 50 se desarrollaron los primeros métodos de extracción de ADN principalmente basados en gradientes de centrifugación y cromatografía. Una de ellas, la cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), consiste en colocar las muestras sobre un gel y esperar a que las moléculas más pequeñas como el ARNm y las proteínas queden retenidas en los poros, mientras que el ADN se eluye rápidamente. Por otro lado, en la cromatografía de intercambio iónico (IEC) el ADN se mantiene en la columna, mientras que las demás moléculas como proteínas, lípidos, carbohidratos y ARN se desplazan. Para el año 1979 se

describió a extracción alcalina, con la cual se logra separar el ADN cromosómico del ADN plasmídico y en el que se utiliza principalmente NaOH y SDS para la lisis de la membrana celular. El mismo año Vogelstein y Gillespie crean el método de matrices de silica, basado en el principio de que el ADN con carga negativa se une de manera selectiva con la sílice la cual está cargada positivamente separando así el material genético de los demás contaminantes. Para 1988, Miller Dykes y Polesky introdujeron el método salino en el que se usa principalmente NaCl, Tris-HCl, EDTA y SDS con el objetivo de que las altas concentraciones de sal disminuyan la solubilidad de las proteínas y las precipiten en el fondo del tubo, dejando al ADN en el sobrenadante. En los años posteriores se fueron implementando otros componentes para superar los obstáculos de la extracción como el CTAB (1990) útil en la extracción con muestras que producen altas cantidades de polisacáridos. Otros métodos de extracción incluyen: fenol-cloroformo implementado por primera vez en 1998, SDS-Proteinasa K creado en 1974, con cuentas magnéticas en 1998, papel de celulosa en el 2000, Chelex-100 en 2011 y a base de papel filtro descrito en el 2017 (Dairawan y Sheety, 2020).

Actualmente los métodos de extracción de ADN se dividen en tres categorías, los métodos tradicionales, los kits comerciales y la automatización mediante equipos robóticos (Nugroho et al., 2022). Este último surgió debido a la necesidad de simplificar los procesos de extracción, por lo que científicos han creado tecnología basada en microfluídica para la extracción de ADN en chip, el cual utiliza volúmenes muy pequeños en espacios milimétricos y hasta nanométricos que contienen cámaras y canales capaces no solo extraer ADN, sino también identificar especies objetivo (Ayoib et al., 2017).

6.5. Fases de la extracción de ADN

6.5.1. Lisis

En la lisis celular el objetivo principal es romper la pared celular para liberar todo el contenido intracelular, lo cual incluyen proteínas, ácidos nucleicos, orgánulos y otros compuestos. Este paso es crítico y debe ser lo suficientemente fuerte para lograr la disrupción de la membrana celular, pero evitando dañar el ácido nucleico (Salazar et al., 2013). Habitualmente los métodos para lograr la lisis celular se pueden dividir como métodos físicos, químicos o enzimáticos.

Los métodos físicos se basan en deformar las células ejerciendo una fuerza sobre ellas, esto puede realizarse en líquido o sólido, por ejemplo, sonicación, pulverización con mortero, centrifugación con perlas de vidrio, de metal, congelación etc. Los métodos químicos consisten en la adición de soluciones que penetran en la célula y por lo general crean una desestabilización osmótica, haciendo que la célula se hinche y estalle su membrana, generalmente estas soluciones llevan un tampón, que logra mantener el pH ligeramente alcalino y así minimizar el daño al ADN. Al disolver la membrana permite que los demás componentes celulares se separen y ayuda a la solubilización de las proteínas obstaculizando la interacción lipido-lipido y proteína-proteína. Por otro lado, los métodos enzimáticos se basan en adicionar enzimas que degraden de forma selectiva componentes de las membranas celulares como lisozima, glucanasas, liticasas y proteasas, entre otras (Pinilla-Bermúdez, 2019). Dependiendo de las necesidades de la muestra se pueden elegir uno de estos métodos o utilizarlos todos en conjunto, de manera que se logre una correcta liberación de los ácidos nucleicos.

6.5.2. Remoción de proteínas y contaminantes.

Luego de liberar el ADN, es necesario separarlo de otros materiales contaminantes como el ARN y las proteínas. Para lograr esto, se utilizan soluciones desnaturalizantes y precipitantes, con el fin de clarificar y purificar el ADN. Dado que la pureza del ADN es fundamental para los procedimientos de biología molecular e ingeniería genética, es crucial eliminar todos los residuos celulares y contaminantes, como lípidos, carbohidratos, proteínas y sales, además de otros iones presentes en el medio (Pinilla-Bermúdez, 2019).

Se necesita poder tener una clara separación del ADN y los demás componentes celulares, para este propósito generalmente se utilizan compuestos tóxicos como el fenol o cloroformo, sin embargo, actualmente se pueden separar aprovechando las propiedades de materiales como la silica, lo cual brinda un método más sencillo y no tóxico (Dowhan, 2012).

6.5.3. Precipitación de ADN.

Luego de extraer eficazmente la solución que contengan el ADN, se deberá agregar alcohol absoluto, sea etanol o isopropanol, en presencia de estos compuestos el ADN se enrolla y precipita, dejando los demás componentes celulares que son solubles como oligonucleótidos, nucleótidos, sales y otras impurezas (Pinilla-Bermúdez, 2019).

La precipitación se realiza generalmente a temperaturas bajas (-20°C), aunque con el isopropanol puede realizarse a temperatura ambiente. Nugroho et al. (2022), menciona que la temperatura de la incubación afecta en la calidad de ADN, ya que si bien las temperaturas bajas dan como resultado mayor concentración de ADN también hay mayor probabilidad de contaminación, por el contrario, la temperatura ambiente puede disminuir la concentración, pero aumenta la pureza del ADN extraído.

Si la cantidad de ácido nucleicos es baja se puede agregar compuestos que faciliten su precipitación como glucógeno, el cual forma una “red” que arrastra al ADN. Finalizado el tiempo de precipitación (puede variar desde unas cuantas horas hasta toda la noche) se realiza una centrifugación para que el ADN se deposite en forma de pellet al fondo del tubo y se desecha el sobrenadante (Salazar et al., 2013).

6.5.4. Lavado de ADN.

Esta solución de lavado cumple una función crucial en el proceso de purificación. Generalmente se realiza con etanol al 70% ya que el ADN es insoluble en este compuesto, por lo tanto, elimina solamente las sales que hayan quedado en contacto con el ADN después de su extracción y purificación inicial. Sin embargo, es importante realizar el lavado de manera rápida y cuidadosa, ya que el 30% de agua presente en la solución podría, en caso de una exposición prolongada, disolver parcialmente el ADN precipitado (Pinilla-Bermúdez, 2019).

Los lavados se realizan mínimo dos veces y varía dependiendo del tipo de muestra utilizada. Luego de eliminar el sobrenadante de alcohol, se seca el pellet, ya sea a temperatura ambiente o en un horno a no más de 60 °C, con el fin de que los alcoholes utilizados se evaporen correctamente (Salazar et al., 2013).

6.5.5. Resuspensión

Una vez seco se agrega una solución acuosa, para disolver el pellet de ADN y preservarlo. Se deben utilizar soluciones libres de ADNasa o amortiguadoras como TE (Tris EDTA) si se requieren conservar por mucho más tiempo. La cantidad generalmente es de 50

-100 µl, lo mínimo para conservar una concentración adecuado y lo suficiente para una disolución total del ADN (Salazar et al., 2013).

6.6. Principales componentes de los protocolos de extracción

6.6.1. CTAB (*Bromuro de cetiltrimetilamonio*)

CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), es un detergente catiónico compuesto por una larga cadena hidrofóbica de hidrocarburos y una cabeza hidrofílica que en contacto con el agua forma estructuras esféricas llamadas micelas por la unión de sus partes hidrofóbicas. La primera función del CTAB al tener contacto con las células es secuestrar los lípidos de la membrana biológica para liberar el contenido celular junto con el ADN del núcleo. Una vez liberados los metabolitos secundarios y polisacáridos complejos propios de una célula vegetal el CTAB junto con otros productos químicos puede impedir que se coprecipiten con el ADN (Heikrujam, Kishor y Behari-Mazumder, 2020).

En presencia de polisacáridos, el CTAB ayuda a la extracción de ADN ya que debido a sus propiedades pueden formar un complejo con el ADN ayudándolo a precipitar en un medio con baja fuerza iónica y añadiendo altas concentraciones de sal se vuelve insoluble con las proteínas y demás polisacáridos ácidos promoviendo que el ADN se pueda aislar fácilmente (Varma, Padh y Shrivastava, 2007).

Ahora bien, el CTAB se considera un inhibidor de la PCR y puede intervenir en la concentración de ADN cuando se mide con espectrofotometría, dando resultados falsamente altos, por lo que se requiere una limpieza adecuada del compuesto al finalizar el proceso de extracción (Schenk, Becklund, Carey y Fabre, 2023).

6.6.2. *NaCl (Cloruro de sodio)*

El cloruro de sodio es una sal iónica, el cual puede participar en reacciones de intercambio iónico, neutralización, precipitación entre otras. La principal función de este compuesto es ayudar a lisis celular por medio de osmosis, el cual es un proceso en el cual la célula se hincha y estalla en solución hipotónica o se encoge y se arruga en solución hipertónica (Jadhav, Raja y Natesan, 2015). También fomenta la separación de las proteínas, ya que en presencia de altas concentraciones la solubilidad de las proteínas disminuye por la interacción de los aminoácidos hidrofílicos con los átomos de sal, los cuales no permiten que se una a las moléculas de agua logrando finalmente que se enlacen entre ellos mismos y formen un enlace hidrofóbico que precipita (Pinilla-Bermúdez, 2019).

Se ha reportado también que concentraciones de más de 0.5M en conjunto con el CTAB ayuda a precipitar los polisacáridos (Heikrujam et al., 2020). Adicionalmente, evita la desnaturalización del ADN ya que los iones Na^+ de la sal se atraen y se unen a los iones negativos de fosfato, lo cual también afecta la solubilidad del ADN en el tampón de extracción (Aggarwal, Edhigalla y Walia, 2022).

6.6.3. *Tris (Tris(hidroximetil)aminometano)*

Su fórmula molecular es $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, tienen tres alcoholes primarios y un grupo amina (Jadhav et al., 2015). Es un compuesto que se utiliza como amortiguador químico con el fin de mantener un pH estable en el proceso de extracción de ADN, por lo general conserva el pH alcalino de 8 (Aggarwal et al., 2022). Esta capacidad es especialmente útil ya que cuando se libera el material citoplasmático en la lisis el pH se altera y por consiguiente reduce la estabilidad de los ácidos nucleicos. Además, cuando se ajusta a pH 8 con el HCl

termina con una composición de base y ácido conjugado débil lo cual aumenta aún más la permeabilidad de la pared celular (Heikrujam et al., 2020).

6.6.4. EDTA (*Ácido etilendiaminotetraacético*)

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) tienen la capacidad de secuestrar los iones de magnesio y calcio, los cuales son cofactores importantes en la actividad de las enzimas DNasa y RNasa (Aggarwal et al., 2022). Además, los iones de Mg^{+2} juegan un papel importante en la formación de grandes complejos macromoleculares como el nucleosoma y los iones de Ca^{+2} son parte de cementación de capa media de la pared celular, por estas razones la presencia del EDTA ayuda a interrumpir y desestabilizar estas estructuras (Jadhav et al., 2015).

6.6.5. SDS (*Dodecil sulfato de sodio*)

Es un detergente anfílico es decir posee una parte hidrofílica y otra hidrofóbica dentro de su estructura. Esta propiedad permite que forme complejos con proteínas y polisacáridos, lo cual permite eliminar estos componentes de alto peso molecular (Schenk et al., 2023). Al unirse a las proteínas el SDS evita que éstas se unan al ADN lo cual facilita la separación y purificación del ADN del resto de los componentes celulares y ayuda al ADN a mantenerse en suspensión en la solución.

6.6.6. *Proteinasa K*

La Proteinasa K es una enzima hidrolizadora de proteínas, su función principal es romper los enlaces peptídicos desnaturalizando así las histonas e inactivando a las DNasas y RNasa en los lisados celulares, lo cual beneficia la obtención de ADN de alto peso

molecular (Varma et al., 2007). Su utilización puede variar desde 1% de 1mg/ml y el 0.625% 20mg/ml en el tampón de lisis (Schenk et al., 2023).

6.6.7. β -mercaptoetanol

El β -mercaptoetanol ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$) es un antioxidante que se utiliza principalmente en conjunto con CTAB para obtener ADN de calidad de organismos vegetales que poseen compuestos fenólicos. Este químico reduce los enlaces disulfuro de las proteínas globulares desnaturalizándolas a nivel de estructura terciaria y cuaternaria y así evitando que se disuelvan en el agua de la solución de extracción (Heikrujam et al., 2020).

Además, este compuesto evita la polimerización de los taninos, los cuales contaminan el ADN durante su aislamiento al igual que los polisacáridos (Varma et al., 2007). La mayoría de los protocolos utilizan entre el 0,2 y el 0,5%, de β -mercaptoetanol (Schenk et al., 2023).

6.6.8. Fenol

El fenol es un disolvente orgánico por lo tanto no se mezcla con el agua y generalmente se utiliza en combinación con el alcohol isoamílico y cloroformo para ayudar a la purificación del ADN. Cuando se añade el fenol a la muestra los componentes celulares no polares se fraccionarán en el fenol, mientras que los polares se quedarán en el agua. El ADN al ser polar no es soluble en el fenol, por otro lado, las proteínas tienen grupos polares y no polares a lo largo de su cadena de aminoácidos, los enlaces que forman esta cadena se rompen en presencia de fenol haciendo que la proteína se desnaturalice y se despliegue. Además, la combinación de fenol: cloroformo limita la formación de complejos de ARN

insolubles y reduce la presencia de poli A y ARNm en la fase orgánica (Heikrujam et al., 2020).

La solución de fenol con el buffer se somete a centrifugación para separar los componentes en tres fases: acuosa, interfase y fase orgánica. El ADN se encontrará en la fase acuosa y las proteínas y demás componentes celulares se localizarán en la interfase, por lo tanto, se retira con una pipeta la fase acuosa y se coloca en otro tubo para seguir con la precipitación del ADN o repetir la extracción si es necesario hasta eliminar todas las proteínas de la solución (Bermúdez, 2019).

Ahora bien, es importante recalcar que solo se debe usar fenol neutro ya que el fenol ácido se convierte en quinonas por oxidación y forma radicales libres que degradan el ADN, el tono de color rosa indicara que el fenol se ha vuelto ácido (Jadhav et al., 2015).

6.6.9. *Cloroformo*

También llamado triclorometano (CHCl_3), es un disolvente hidrofóbico (no polar) en el que se disuelven las proteínas y lípidos no polares, promoviendo la separación de estos desechos celulares de forma que el ADN quede aislado en la fase acuosa. El cloroformo tiene una mayor densidad que el agua por lo tanto se puede visualizar una separación de fases más nítida. Además, al ser volátil no interfiere en los procesos posteriores (Heikrujam et al., 2020).

6.6.10. *Alcohol isoamílico.*

El alcohol isoamílico ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$) se añade al cloroformo, para evitar que este forme espuma (fosfeno gaseoso) en la interfase de la solución de extracción, la cual interfiere con

el ADN y dificulta un correcto aislamiento. Este compuesto se considera alifático es decir no se mezcla en solución acuosa y logra estabilizar la interfase entre la capa orgánica y acuosa. Además, ayuda a inhibir la actividad de ARNasa y a prevenir la solubilización de porciones de poli A con ARNm, en consecuencia, aumenta la pureza del ADN (Heikrujam et al., 2020).

6.6.11. Isopropanol/ Etanol

El isopropanol y el alcohol se utilizan para precipitar el ADN luego de su extracción. Estos compuestos tienen la capacidad de romper la cadena de hidratación que forma el agua con el ADN, además también precipita de forma selectiva, ya que el ARN tiene 2oh adicionales que forman un enlace más fuerte con el agua por lo que permanece soluble. El etanol tiene una menor capacidad de reducción dieléctrica por lo cual se tiende a utilizar más volumen (2.5 volúmenes) que el isopropanol (0.7 volúmenes). Generalmente se utiliza isopropanol/etanol frío, sin embargo, algunos investigadores han reportado que a temperatura ambiente se reduce la precipitación de polisacáridos (Jadhav et al., 2015).

6.7. Evaluación de calidad del ADN

6.7.1. Importancia de la calidad e integridad del ADN.

A pesar de realizar correctamente los pasos de extracción de ADN, el producto no siempre está libre de contaminantes, ya que algunos compuestos son difíciles de extraer y requieren de múltiples pruebas para alcanzar una alta calidad. Por ello, son necesarias medidas cuantitativas que establezcan la calidad del ADN. Los compuestos orgánicos y solventes que no se eliminan en los lavados representan unos problemas para las posteriores técnicas de análisis en los que se utilice la muestra (Salazar et al., 2013).

Según Green y Sambrook (2018), es necesario conocer la cantidad de ADN presente en la muestra para lograr un nivel deseado de precisión, reproductibilidad y eficiencia de muchas de las técnicas utilizadas en biología molecular. Los compuestos fenólicos y polisacáridos que presentan algunas especies podrían ser un factor que cause deficiencias en los procesos de secuenciación, ya que estas sustancias interfieren con la transcriptasa inversa dependiente de ARN, la ADN polimerasa, las actividades de endonucleasa de restricción del ADN (Japelaghi, Haddad y Garoosi, 2011). Cada día las técnicas van avanzando, pero también se hacen más sensibles a contaminantes por lo que se cree que una de las más grandes limitaciones del futuro de la genética va a ser conseguir ADN no fragmentado y de alta calidad (Shenck et al., 2023).

Las técnicas más utilizadas para medir la pureza, es la espectrofotometría, mientras que la integridad se puede visualizar con electroforesis en gel de agarosa.

6.7.2. *Fundamento de la espectrofotometría*

La espectrofotometría consiste en la cantidad de luz UV que absorben las moléculas. El ADN absorbe a una longitud de onda de 260nm debido a las bases nitrogenadas. Esta longitud de onda absorbida es proporcional a la concentración de ADN en la muestra y se calcula con la siguiente fórmula:

$$Abs_{muestra} \times concentración_{del patrón} = Concentración_{del ADN}$$

La concentración patrón se establece mediante una OD (densidad óptica) medida a 260nm que corresponde a 50 µg/ml de ADN de doble cadena. Por otro lado, las proteínas absorben la luz a 280 nm, es decir las lecturas a esta longitud de onda demuestran la presencia de contaminantes proteicos o fenólicos. Por lo tanto, para medir la pureza en una

muestra de ADN se debe conocer la relación A260/280. Los valores de entre 1.8 a 2.0 se consideran óptimos (Pinilla-Bermúdez, 2019).

Ahora bien, medir la absorbancia en múltiples longitudes de onda proporciona una evaluación más completa de la pureza de la muestra de ácidos nucleicos, ya que a 230 nm se absorben fuertemente las longitudes para compuestos como sales de guanidina, iones fenolato, tiocinatos, etc., y a 320 la absorción puede ser causada por la presencia de materia particulada lo que genera turbidez (Green y Sambrook, 2018).

En el espectrofotómetro Nanodrop, se pueden medir volúmenes muy pequeños de muestras, utilizando la tensión superficial que se crea en el pedestal. Lo cual permite medir soluciones altamente concentradas a diferencia del espectrofotómetro de cubeta que necesita diluciones. Otra ventaja es la rapidez con la que se toman las lecturas y la facilidad de limpieza, lo que a su vez permite analizar múltiples muestras en poco tiempo (Green y Sambrook, 2018).

6.7.3. *Fundamento de electroforesis.*

El objetivo de la electroforesis es la migración de moléculas cargadas a través de un campo eléctrico según sus propiedades fisicoquímicas (Arakawa et al., 2022). La movilidad de las moléculas responde a un modelo cinético, según Hanada (2020) “cuando una partícula cargada se coloca en un campo eléctrico, se acelera su velocidad aumenta hasta que su resistencia se iguala a la fuerza eléctrica. Cuando la fuerza eléctrica y la resistencia se igualan, la velocidad de la partícula se vuelve constante, lo que a menudo se denomina estado estacionario”.

El ADN tiene carga negativa debido a los grupos fosfatos alojados en su estructura, por tal razón en una electroforesis, las moléculas de ADN migraran hacia el polo positivo. La velocidad y el patrón de migración del ADN dependerá de factores como el tamaño y la conformación de las moléculas de ADN, la concentración, y el voltaje aplicado (Salazar et al., 2013).

6.8. Las Diatomeas

Las diatomeas son un grupo diverso de microalgas unicelulares que se encuentran ampliamente distribuidas en los ecosistemas acuáticos, tanto en aguas dulces como marinas. Se caracterizan por tener una pared celular de sílice, la cual puede formar estructuras verdaderamente complicadas, algunas pueden ser alargadas, con simetría plana bilateral o redondas con simetría radial. El esqueleto silíceo de las diatomeas se denominada frústula que está separado en dos secciones, la epiteca e hipoteca que se unen en forma de caja Petri. La frústula puede estar perforada y tener una gran hendidura de lado a lado conocida como rafe (diatomeas pennadas), desde el cual segrega mucilago para adherirse al sustrato o desplazarse (Tiwari, Pandey, Show y Parameswaran, 2024).

Las diatomeas están presentes en todas partes, ríos, océanos, lagos, pantanos, superficies rocosas húmedas e incluso en la piel de una ballena. Este grupo de microalgas son importantes porque están en la base de la cadena alimentaria de los organismos marinos y son de las principales fuentes de oxígeno. Además, pueden ser utilizadas como indicadores ambientales porque tienen requisitos ecológicos específicos, por lo que nos brindan información sobre los cambios fisicoquímicos de un medio en particular (Kabiraj, Jyoti y Goutam, 2022).

Además de sus beneficios ecológicos, también tienen potencial biotecnológico como la producción de biocombustibles. Rabiee, Khatami, Jamalipour, Fatahi, Iravani y Varma (2021) menciona que, la aplicación de estos organismos a escala industrial necesita de muchos más estudios a nivel molecular incluyendo la modificación genética, datos metabolómicos y proteómicos etc.

6.8.1. *Nitzschia* sp.

Nitzschia sp. pertenece a las diatomeas pennadas, su célula tiene una forma alargada y un rafe asimétrico a lo largo de uno de los márgenes. Esta ampliamente distribuido en ambientes de agua dulce o marinos y pueden vivir en forma solitaria o formando colonias sobre un sustrato. Su coloración es amarilla o parda. Según WORMS (2024a), se clasifican taxonómicamente de la siguiente manera:

Filo: Heterokontophyta

Clase: Bacillariophyceae

Orden: Bacillariales

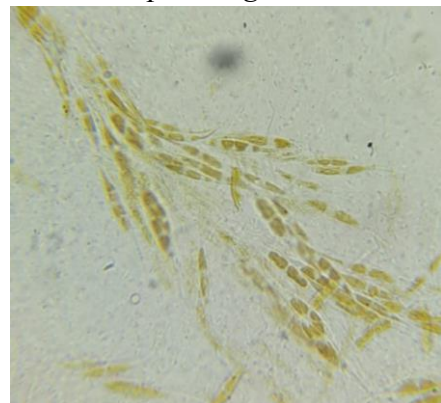
Familia: Bacillariaceae

Género: *Nitzschia*

Especie: *Nitzschia* sp.

Figura 1

Nitzschia sp. Código PM020



6.8.2. *Cymbella* sp.

Es una diatomea pennada asimétrica, generalmente curvadas, con un rafe excéntrico y un margen dorsal más convexo que el ventral. Puede vivir en forma solitaria o formando

colonias sobre un sustrato. Su color es amarillo o parda. Según WORMS (2024b) su clasificación taxonómica es la siguiente:

Filo: Heterokontophyta

Clase: Bacillariophyceae

Orden: Cymbellales

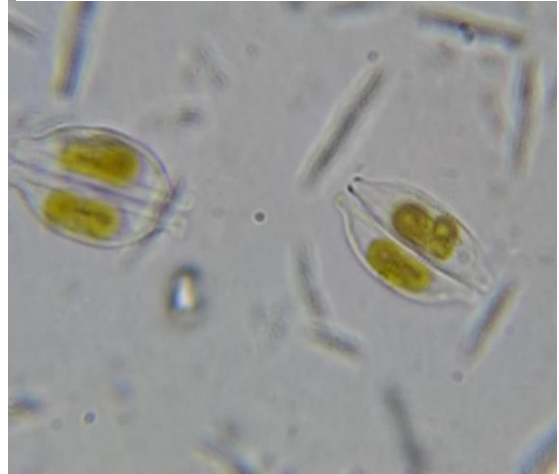
Familia: Cymbellaceae

Género: *Cymbella*

Especie: *Cymbella sp.*

Figura 2

Cymbella sp. Código PM016.



7. Marco Metodológico.

7.1. Extracción de ADN total

7.1.1. Obtención y preparación de biomasa húmeda y seca

Este trabajo se ejecutó en el laboratorio de biología molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la UPSE. Las cepas utilizadas fueron de las diatomeas *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.*, aisladas desde la Península de Santa Elena registrada con el código PM020 y PM016 respectivamente perteneciente al proyecto CUP: 91870000.0000.384095, que tiene el permiso del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE): código MAATE-DBI-CM-2022-0264.

La biomasa microalgal se recolectó mediante centrifugación por 5 min a 3500 RPM, se realizaron múltiples lavados con solución salina para eliminar el medio de cultivo y del sedimento resultante una parte se congeló a 4°C y otra se secó en un horno de secado por convección marca REBELK RS-70P a 37°C por 24 horas como recomienda (Kim y Kim, 2022). Se pesó y colocó 50 mg de biomasa seca y 100-150 mg de biomasa húmeda en tubos Eppendorft para todos los protocolos de extracción. Previo a empezar la extracción las muestras se lavaron con TE (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1 mM EDTA) para eliminar impurezas como menciona Jagielski, Gawor, Bakula, Zuchniewicz, Zak y Gromadka, (2017).

7.1.2. Preparación de reactivos

Para la preparación de los reactivos que se emplearon en los tres protocolos de extracción de ADN se siguieron las indicaciones de Singleton et al. (2018). Los tampones y

soluciones que utilizan concentraciones molares se elaboraron a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen}(L) \times \text{Molaridad}(M) \times \text{Peso de la fórmula} = (g) \text{ del compuesto}$$

Por otro lado, para las soluciones que utilizan porcentaje de concentración primero se convirtió el porcentaje deseado en número decimal (multiplicando por 100) y se multiplica el número decimal por el volumen total deseado.

Se ajustó el pH utilizando pequeñas cantidades de HCl para disminuirlo y NaOH para aumentarlo hasta el valor deseado como se recomienda en Currents Protocols (2011).

7.1.3. *Protocolos de extracción*

Los protocolos de extracción se eligieron a partir de una búsqueda bibliográfica exhaustiva, se tomaron en cuenta principalmente aquellos que ya han sido utilizados en Bacillariophyta.

7.1.3.1. Protocolo 1: NaCl modificado (Edwards, Johnstone y Thompson, 1991 modificado por Castillejos et al., 2022).

Se añadió 400 µl de tampón extracción a la muestra y se mezcló por vortex durante 15 segundos, posteriormente se incubó a 90 °C con un baño maría de marca Tissue Floating Bath XH-1003 Premiere® por un lapso de 10 minutos. Se centrifugó la muestra a 13000 RPM durante 10 minutos, y a continuación se tomó 350 µl del sobrenadante con una micropipeta y se transfirió a un nuevo tubo.

Al nuevo tubo se añadieron 300 µl de isopropanol frío, se mezcló y dejó reposar durante 45 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el isopropanol, se realizó una nueva centrifugación a 13 000 RPM durante 10 minutos, y se descartó el sobrenadante resultante. A continuación, se añadieron 500 µl de etanol al 70% al precipitado. Se despegó el pellet de ADN y se centrifugó a 13 000 RPM durante 10 minutos. Cabe mencionar que la etapa de lavado se repitió de 2-4 veces dependiendo de la claridad del sobrenadante. Los tubos fueron colocados en un horno de secado marca REBELK RS-70P para evaporar los alcoholes durante aproximadamente 30 minutos a 37°C. Finalmente, se agregaron 50 µl de agua ultrapura.

Tabla 1

Descripción detallada de los reactivos y soluciones para el Protocolo NaCl

Reactivo	Detalles
Tampón de lisis	200 mM tris-HCl
	250 mM NaCl
	25 mM EDTA
	0,5% SDS
Agente de precipitación	Isopropanol 96%
Solución de lavado	Etanol 70 %
Solución de resuspensión	Agua Ultrapure

7.1.3.2. Protocolo 2: CTAB modificado (Doyle y Doyle, 1987)

Primero, se añadieron 500 µl de un tampón 2x-CTAB precalentado durante 1 hora a 60 °C. A continuación, la muestra se incubó a 60°C durante 45 minutos en un baño maría Tissue Floating Bath XH-1003 Premiere®. Posteriormente, se agregaron 500 µl de una solución de extracción y se procedió a centrifugar la muestra a 14000 RPM durante 10 minutos. Se retiraron 300 µl del sobrenadante, los cuales se transfirieron a un nuevo tubo.

Luego, se añadieron 200 µl de etanol al 95% y se mezclaron suavemente para precipitar los ácidos nucleicos durante 45 minutos. La muestra se centrifugó a 13000 RPM durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. A continuación, se agregó el tampón de lavado y se agitó suavemente para resuspender el pellet durante 10 minutos. La muestra se centrifugó a 14000 RPM durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó reposar en un horno de secado marca REBELK RS-70P durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50 µl de agua ultrapura.

Tabla 2

Descripción detallada de los reactivos y soluciones para el Protocolo CTAB

Reactivo	Detalles
Tampón de lisis	Tris-HCl 100 mM
	NaCl 1,4 M
	EDTA 20 Mm
	CTAB al 2 %
	β-mercaptoetanol 0,2%
Solución extracción	Cloroformo: alcohol isoamílico 24:1
Agente de precipitación	Etanol 95%
Tampón de lavado	Etanol 76% AcNa 3M
Solución de resuspensión	UltraPure

7.1.3.3. Protocolo 3: SDS-Proteínasa K modificado (Jacobs et al., 1992)

Se adicionaron 450 µl de un tampón de lisis, 25 µl de SDS al 20% y 25 µl de proteína K a un tubo Eppendorf. Las células se incubaron durante 2 horas a 60 °C con agitación intermitente en un baño maría Tissue Floating Bath XH-1003 Premiere®. Posteriormente, se agregaron nuevamente 25 µl de proteína K y las células se incubaron durante 40 minutos en las mismas condiciones.

El lisado resultante se mezcló con 400 µl de una solución compuesta por fenol, cloroformo y alcohol isoamílico 25:24:1. Esta mezcla se centrifugó a 3500 RPM durante 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se mezcló con una solución de cloroformo y alcohol isoamílico 24:1. Nuevamente, se realizó una centrifugación en las mismas condiciones y se transfirió el sobrenadante a otro tubo.

El ADN se precipitó mediante la adición de 30 µl de acetato de sodio y 300 µl de isopropanol. La solución se enfrió en congelación durante 45 minutos y luego se centrifugó a 3500 RPM durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó de 2 a 4 veces con etanol al 70%. Después de cada lavado, se realizó una centrifugación a 3500 RPM durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, el pellet se secó en un horno marca REBELK RS-70P a 37°C y se disolvió en 50 µl de agua ultrapura.

Tabla 3

Descripción detallada de los reactivos y soluciones para el Protocolo SDS-PK.

Reactivo	Detalles
	TRIS-HCl 20 mM, pH 8,0
Tampón de lisis	NaCl 100 mM Na ₂ EDTA 50 mM.
Solución de lisis	SDS 20%
Enzima	Proteinasa K 10 mg/ml
Solución de extracción 1	Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1
Solución de extracción 2	Cloroformo: alcohol isoamílico 24:1
Agente de precipitación	Etanol 96 %
Solución de purificación	Acetato de sodio 3M
Solución de lavado	Etanol 70%
Solución de resuspensión	UltraPure

7.1.4. Cuantificación de la concentración de ADN

Para comprobar la concentración y la correcta extracción de ADN de las muestras se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2000 Thermo Scientific, siguiendo las especificaciones propias de la casa comercial. En primer lugar, se realizó un “blanco” con la misma solución con la que se resuspendió el pellet de ADN (UltraPure Destilled Water de Invitrogen) hasta que la concentración fue 0.0 ng/μl y la absorbancia no mayor de A0.04.

La concentración se calcula en base a la absorbancia de OD 260nm y su unidad de medida es ng/μl, para el ADN el valor mínimo de detección es 2 ng/μl y el máximo es 15000 ng/μl (Thermo Fisher, 2009).

7.2. Evaluación de calidad del ADN

7.2.1. Espectrofotometría por NanoDrop 2000c

Para evaluar la pureza se toma en cuenta la relación A260/280 de la lectura con NanoDrop 2000 Thermo Scientific, con el fin de determinar contaminación en la muestra y la relación 260/230 como medida secundaria para determinar perturbaciones por fenol y/o sales. Se utilizó los criterios de (Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020) y (Thermo Fisher, 2009). Los detalles de los criterios mencionados se pueden visualizar en la Tabla 4.

Tabla 4

Criterios de validez de acuerdo con los parámetros de calidad del espectrofotómetro.

Análisis	Parámetro	Criterios de validez
A260/280	Pureza	≥1.8 -2.1 Pureza óptima
		≥1.6 - 1.7 Pureza aceptable
		<1.6 ADN contaminado con compuestos aromáticos
		>2.1 ADN contaminado con ARN
		>2 – 2.2 Pureza óptima
A260/230	Pureza	>1.8 Pureza aceptable
		< 1.8 ADN contaminado.

Nota. Fuente: Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020.

7.2.2. Electroforesis

Para evaluar la integridad del ADN se utilizó la técnica de electroforesis, la cual consiste en provocar la migración de ADN a través de un gel de agarosa mediante la aplicación de un campo eléctrico. El gel se preparó utilizando 1 g de agarosa en 100 ml de buffer TAE 1X (Tris- Acetato EDTA), tal como se detalla en (Vinod, 2004), adicionalmente se agregó 3 µl SYBR Safe al gel antes de verterlo en el molde. Una vez solidificado, se transfirió el gel a la cámara de electroforesis de marca Labnet Internacional, Inc y se agregó aproximadamente 1.5 litros de TAE 1X teniendo en cuenta que el líquido cubra el gel. Por último, se cargaron los pocillos con una mezcla de 12 µl de muestra y 3 µl de azul de bromofenol. Se conectó el equipo a la fuente de poder por 1 hora a 50 mA, luego se transfirió el gel al transiluminador y se visualizaron los resultados con ayuda de la cámara frontal del móvil Samsung A33.

Las imágenes fueron tratadas con IMAGEJ para mejorar la visualización de las bandas. Para evaluar cuantitativamente las bandas se siguieron los criterios de Banco Nacional de ADN Carlo III (2020), los cuales se pueden visualizar en la Tabla 5.

Tabla 5

Criterios y puntuación estimado de acuerdo con la visualización de la banda.

Parámetro	Criterios de validez	Puntuación
Integridad del ADN	Banda definida en la parte superior del gel.	3
	Integridad alta Presencia simultanea de la banda en parte superior del gel y un ligero smear.	2
	Integridad adecuada Ausencia de banda definida y presencia de smear concentrado en la parte superior del gel.	1
	Parcialmente degradado Smear concentrado en la parte inferior del gel.	0
	Totalmente degradado	

Nota. Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020.

7.3. Relación Costo-Tiempo

Para comparar el valor económico de cada protocolo, se tomó en cuenta el costo de los reactivos químicos, enzimas y material descartable utilizados como tubos Eppendorf y puntas de pipetas (Nouws, et al., 2020). Se calculó la cantidad necesaria de cada componente para procesar 100 muestras y se consideró el valor en USD por unidad de extracción. Cabe mencionar que los precios fueron tomados de los catálogos web de distribuidores oficiales.

El tiempo se estimó en base a los procedimientos de cada protocolo detallados en el apartado 7.1.3 de este capítulo, a esto se sumó 30 minutos de manipulación por muestra y

se agregó el tiempo promedio de secado (Martín, Moreno-Ruiz, Ruiz, María, Silenzi y Bonano, 2017).

Para identificar el método más eficiente en términos de la relación entre costo y tiempo se calculó el IECT (Índice de la eficiencia costo-tiempo) siguiendo la formula detallada por Wang, Dai, Tian, Wan, y Zhang (2019):

$$(C/C_{max}) \times (T/T_{max}) = IECT$$

Donde:

- C: costo estimado por extracción de cualquier protocolo
- Cmax: costo máximo estimado entre los tres protocolos
- T: tiempo estimado por extracción de cualquier protocolo
- Tmax: tiempo máximo estimado entre tres protocolos

Si el resultado de la multiplicación es 1, significa que el costo y el tiempo estimados para el protocolo evaluado son iguales al costo máximo y al tiempo máximo estimados entre los tres métodos. En otras palabras, el método en consideración tiene la misma proporción de costo y tiempo que el peor caso posible. Si el resultado de la multiplicación es mayor que 1, significa que el costo y el tiempo estimado para el protocolo evaluado son más altos que el costo y tiempo máximo estimados entre los tres métodos. Por el contrario, si el resultado de la multiplicación es menor que 1, significa que el costo tiempo estimados del protocolo evaluado son más bajos que el costo y tiempo máximo estimados entre los tres métodos (Wang et al., 2019).

7.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el Software R Studio. En primer lugar, se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk con el fin de identificar si los datos seguían una tendencia normal y así poder determinar la prueba estadística más confiable. Para todos los análisis posteriores se utilizaron un nivel de significancia del 95%.

Los datos resultaron no paramétricos por lo cual se utilizó la prueba Mann-Whitney para determinar diferencias significativas entre muestra seca y húmeda, y la prueba Kruskal-Wallis para evaluar la diferencia entre protocolos de extracción, adicionalmente se realizó la prueba de Dunn con el objetivo de determinar qué pares de grupos difieren significativamente entre sí.

8. Resultados

8.1. Obtención de ADN total a partir de tres protocolos de extracción

Se logró extraer ADN total de *Cymbella sp.* y *Nitzschia sp.* aplicando los 3 protocolos de extracción (NaCl, CTAB y SDS-PK) con ambos tipos de muestra (Seca y Húmeda). Se realizaron 8 réplicas para cada protocolo y tipo de muestra, trabajando con un total de 48 muestras por especie.

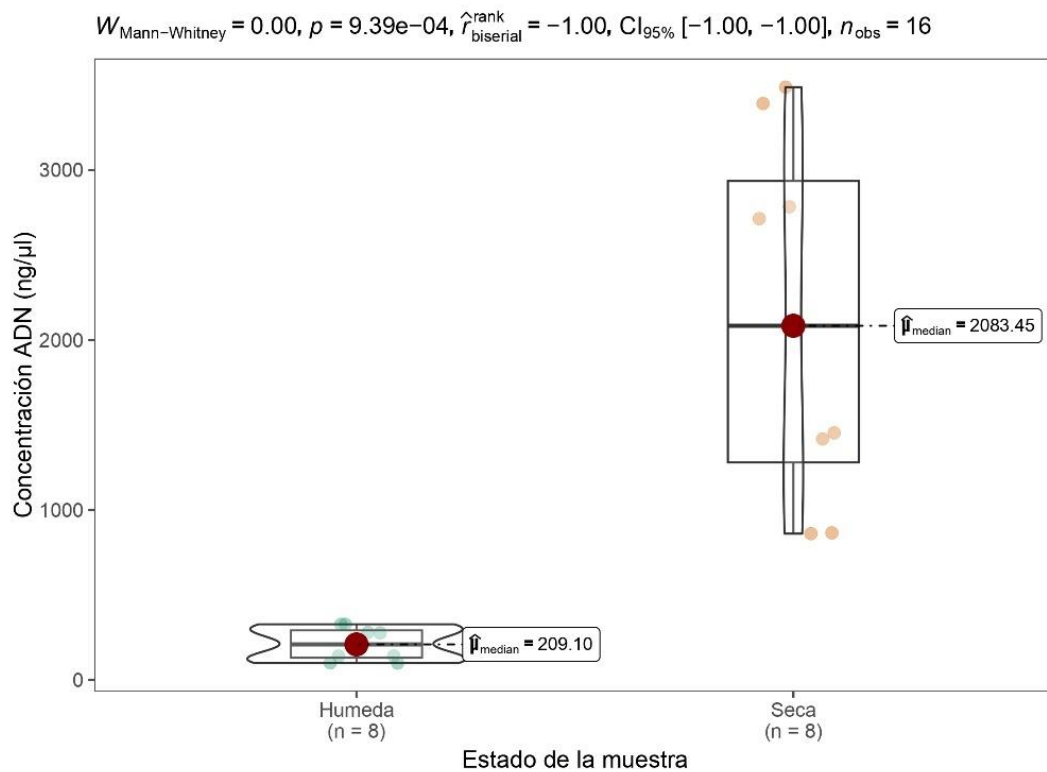
Para verificar cada extracción se cuantificó la concentración de ADN, la cual se mide en ng/μl. A continuación, se muestran los resultados por especie.

8.1.1. *Cymbella sp.*

Los resultados del análisis con el Protocolo NaCl indican que el grupo “Seca” tiene una mediana de concentración 2083.45 ng/μl, mientras que el grupo “Húmeda” muestra una mediana de 209.10 ng/μl. El estadístico dio como resultado un valor $p = 0.0009$, con lo cual se demuestra que existen diferencias significativas entre estados de muestra, siendo la muestra seca quien alcanzó una mayor concentración de ADN (Figura 3).

Figura 3

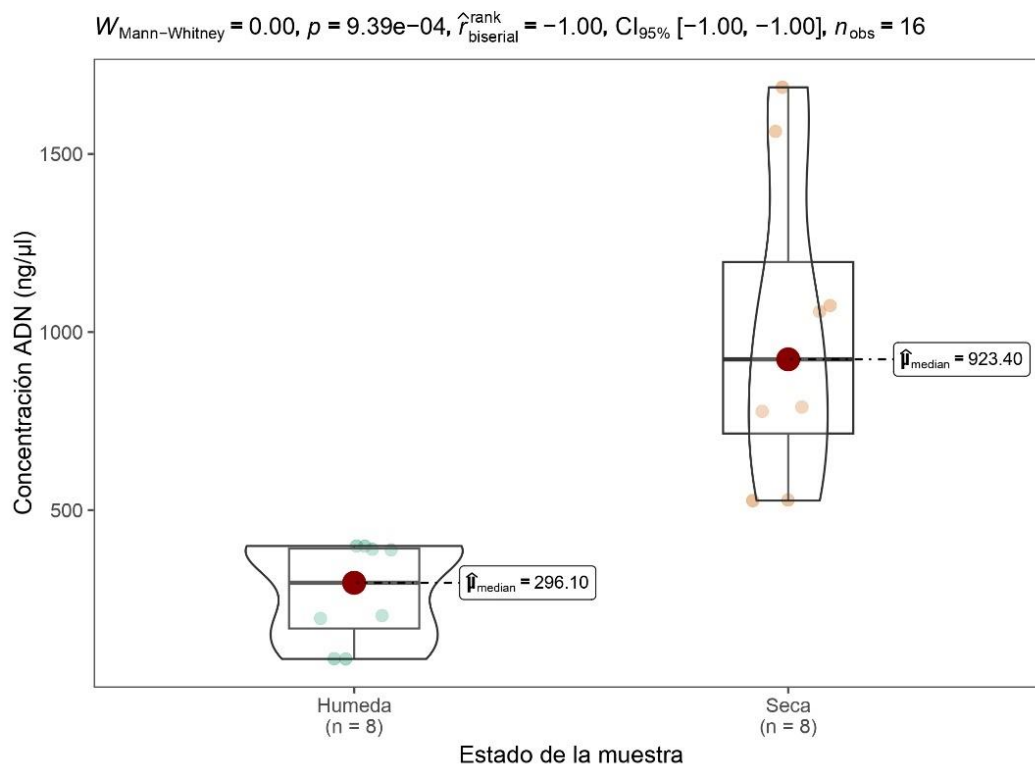
Concentración de ADN de Cymbella sp. según el estado de la muestra con el Protocolo NaCl.



En cuanto al Protocolo CTAB, el análisis estadístico dio como resultado un valor $p = 0.0009$ entre las medianas de las muestras “Secas “(923.40 ng/μl) y “Húmeda” (296.10 ng/μl) lo cual corrobora que existen diferencias significativas entre el estado de las muestras, siendo las muestras secas las de mayor concentración de ADN. Véase Figura 4.

Figura 4

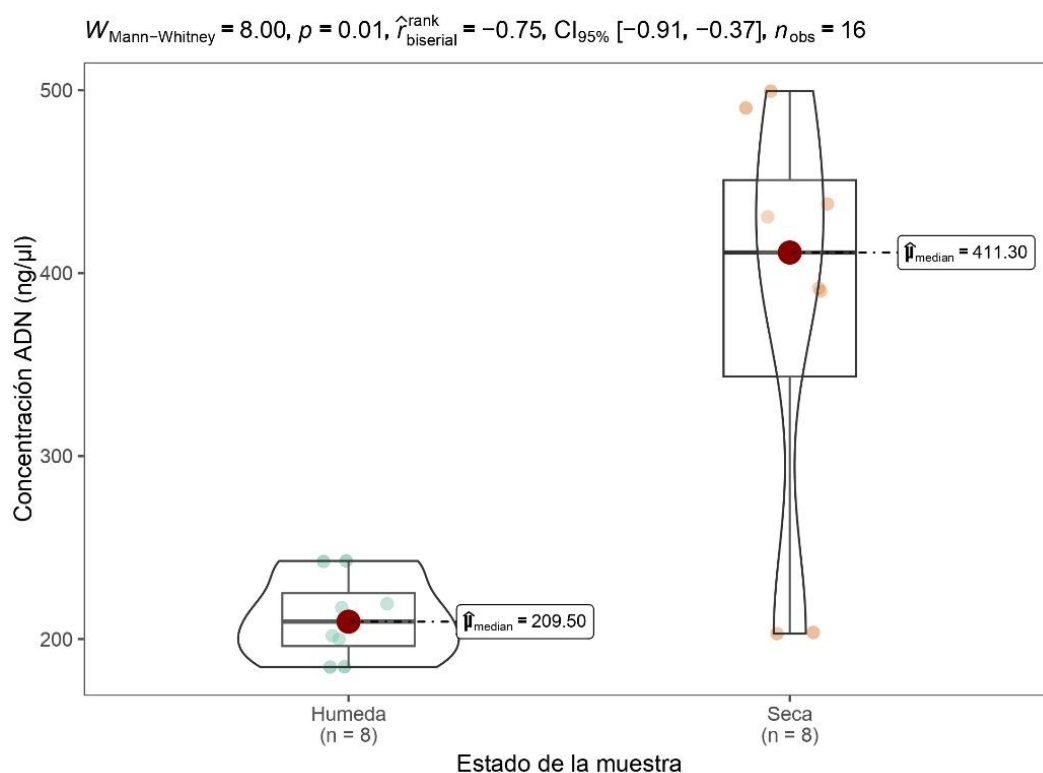
Concentración de ADN de Cymbella sp. según el estado de la muestra con el Protocolo CTAB.



Para el Protocolo “SDS-PK”, en la Figura 5 se puede apreciar las medianas de las muestras del grupo “Seca” (209.50 ng/μl) y “Húmeda” (411.30 ng/μl). El valor estadístico $p = 0.01$ demuestra que existe una diferencia significativa entre los estados de la muestra, siendo la biomasa seca con la que mayor concentración de ADN se obtiene.

Figura 5

Concentración de ADN de Cymbella sp. según el estado de la muestra con el Protocolo SDS-PK



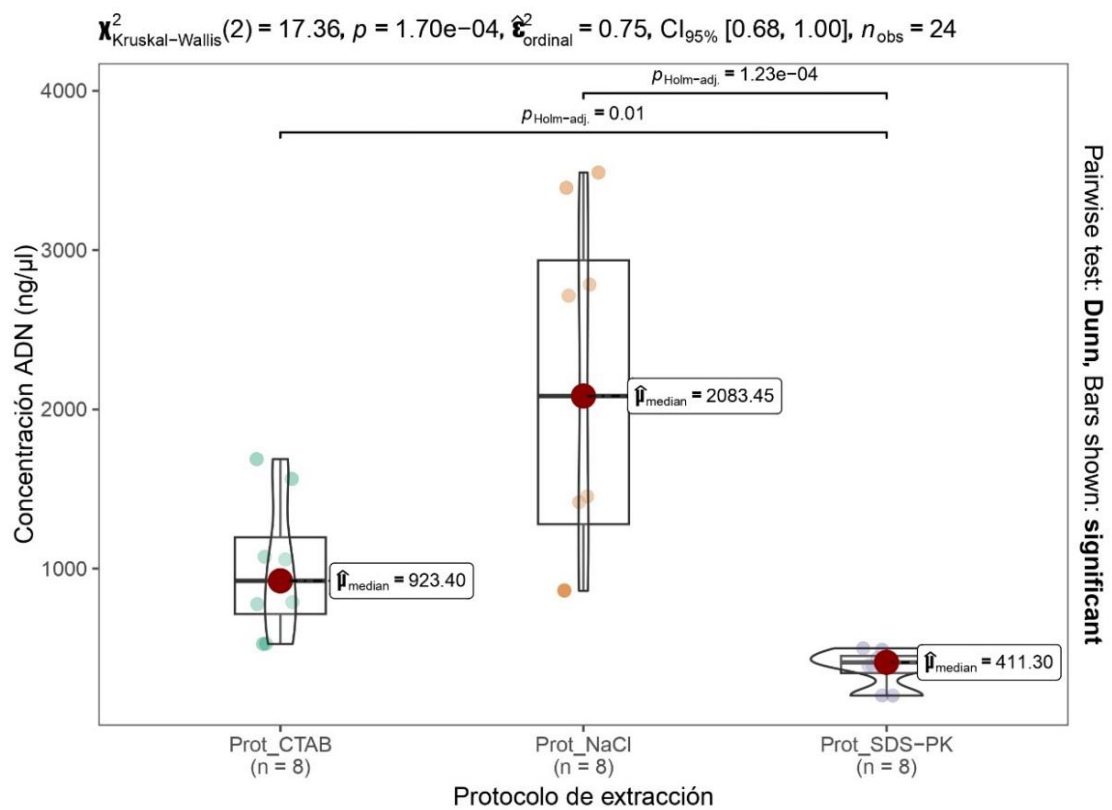
Para todos los protocolos las mejores concentraciones se obtuvieron de la biomasa en estado seco. Ahora bien, para determinar el protocolo con el que se obtiene mayor concentración se realizó un análisis estadístico por separado para muestras secas y húmedas. En húmedas, las medianas de los protocolos estuvieron entre 209,10 ng/μl – 296.10 ng/μl, resultando ser el Prot_CTAB el de mayor concentración, pese a esto el valor estadístico p fue de 0.69 determinando que no existen diferencias significativas entre los protocolos.

En cuanto a las muestras secas el valor $p = 0.00017$ indica que al menos uno de los protocolos muestra diferencias significativas, el análisis entre pares revela que el Prot_SDS-PK difiere significativamente tanto del Prot_NaCl ($p_{\text{holm-adj}} = 0.000123$) como del Prot_CTAB ($p_{\text{holm-adj}} = 0.01$), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los protocolos con CTAB y NaCl (Figura 6).

Cabe mencionar, en la Figura 6 se observa que el rango intercuartílico (IQR) de Prot_NaCl es notablemente mayor (IQR= 1656) que el IQR de los otros dos protocolos, lo cual sugiere una mayor variabilidad de resultados en este grupo, lo cual hay que considerar ya que muestra una menor consistencia y predictibilidad del protocolo.

Figura 6

Concentración de ADN de Cymbella sp. entre protocolos de extracción con muestra seca.

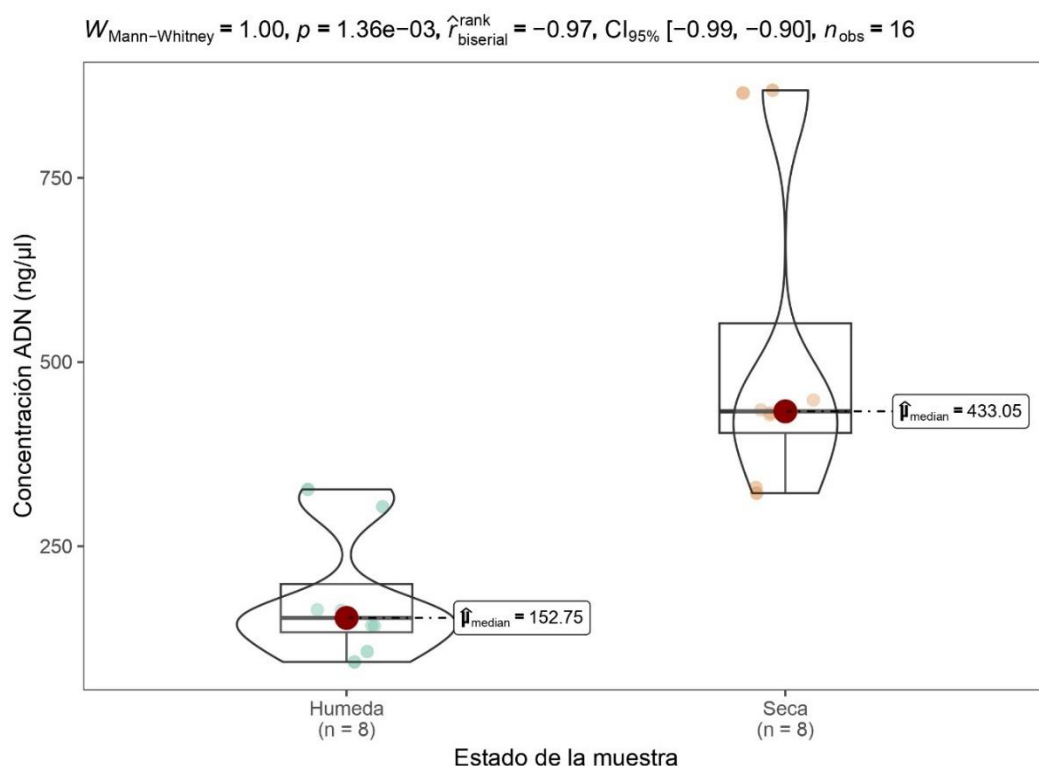


8.1.2. *Nitzschia sp.*

En lo que respecta a *Nitzschia sp.* la concentración de ADN con el Protocolo NaCl dio como resultado una mediana de 152.75 ng/μl para muestras húmedas y 433.05 ng/μl para muestras secas, siendo esta última el estado con el cual se obtiene mayor concentración. El valor $p = 0.00136$ muestra una clara diferencia significativa entre las medianas. Véase la Figura 7.

Figura 7

Concentración de ADN en Nitzschia sp entre estado de la muestra con el Protocolo NaCl.



La prueba estadística entre las medianas del Protocolo CTAB ($Me_H: 163.4; Me_S: 317.65$) dio como resultado un valor $p = 0.19$, esto demuestra que no existen diferencias significativas entre los estados de la muestra, pese a que la concentración

de ADN en el grupo “Húmeda” es superior. En cuanto al Protocolo SDS-PK, la mayor concentración se obtuvo con muestras secas. No obstante, la prueba estadística entre las medianas (Me_H : 94.35; Me_S : 108.10) arrojó un valor $p = 0.27$ el cual revela que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos estados de muestra evaluados en este protocolo.

En resumen, para el protocolo de CTAB y SDS-PK no se puede determinar si la muestra seca supera a la húmeda como ocurrió con *Cymbella sp.*, debido a que en este caso el estadístico no muestra diferencias significativas, sin embargo, para el protocolo de NaCl la muestra seca fue estadísticamente superior a la húmeda.

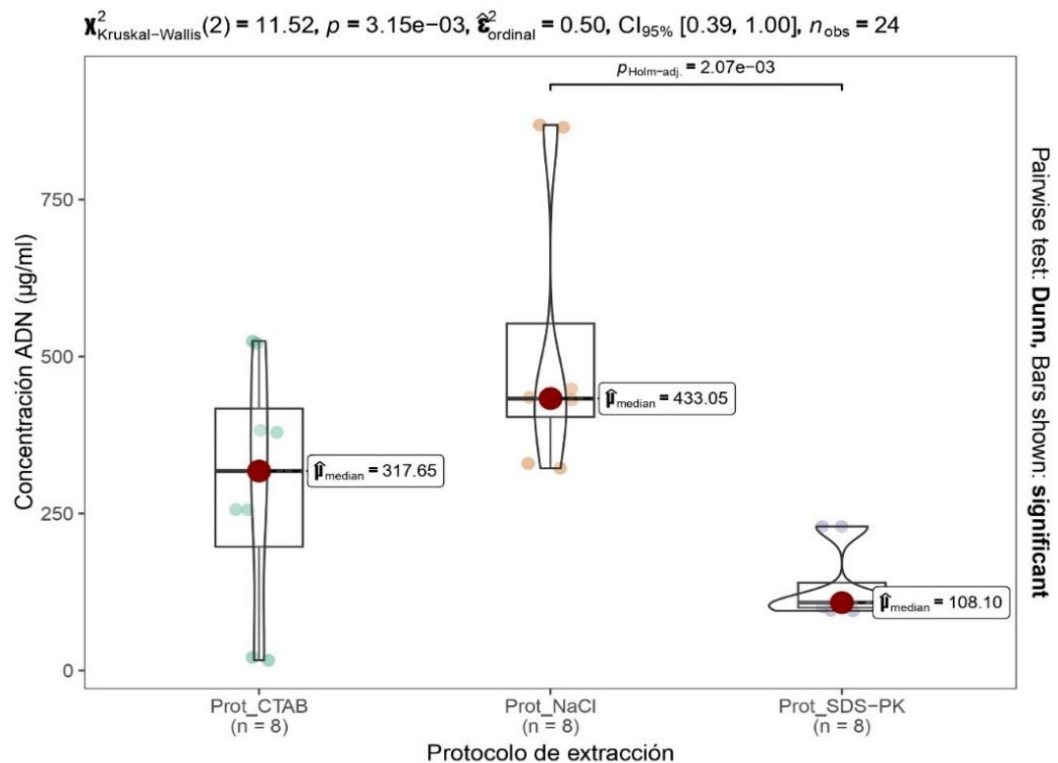
Se realizó un análisis individual por estado de la muestra para compararla entre los 3 protocolos. Para las muestras húmedas, las concentraciones de ADN se ubicaron entre 94.35 ng/μl y 163.40 ng/μl, siendo el Prot_CTAB el de mayor concentración, sin embargo, la prueba estadística arrojó un valor $p = 0.15$ el cual es > 0.05 por lo tanto se establece que no hay diferencias significativas entre protocolos.

Por otro lado, el análisis de las muestras secas revela que existe al menos un grupo con diferencias significativas ($p = 0.00315$). En la Figura 8 se observa que Prot_NaCl es con el que se obtienen mayor concentración de ADN, y este tiene una diferencia estadísticamente pronunciada con el Prot_SDS-PK ($p_{holm-adj} = 0.00207$) pero no con Prot_CTAB. Tomando en consideración la información expuesta, se puede determinar que para *Nitzschia sp.* las mejores condiciones para extraer una mayor concentración de ADN fueron en muestra seca aplicando el protocolo basado en NaCl, seguido del CTAB. Es oportuno mencionar que en la Figura 8 también se evidencia que el IQR del Prot_SDS-PK es el menos disperso (39.95), pero entre los protocolos con mayor concentración, el IQR del protocolo NaCl

(148.85) es ligeramente menor que el de CTAB (220,08), lo cual indica que los datos del protocolo basado en NaCl son más consistentes.

Figura 8

Concentración de ADN en Nitzschia sp. entre protocolos de extracción con muestra seca.



8.2. Calidad del ADN extraído

8.2.1. Pureza

La pureza del ADN extraído se analizó en función de dos criterios, la relación A260/280 como medida principal y A260/230 como medida secundaria para determinar la pureza del ADN. Los rangos y denominaciones para los valores de ambas ratios se detallan en el apartado 7.2.1. de metodología.

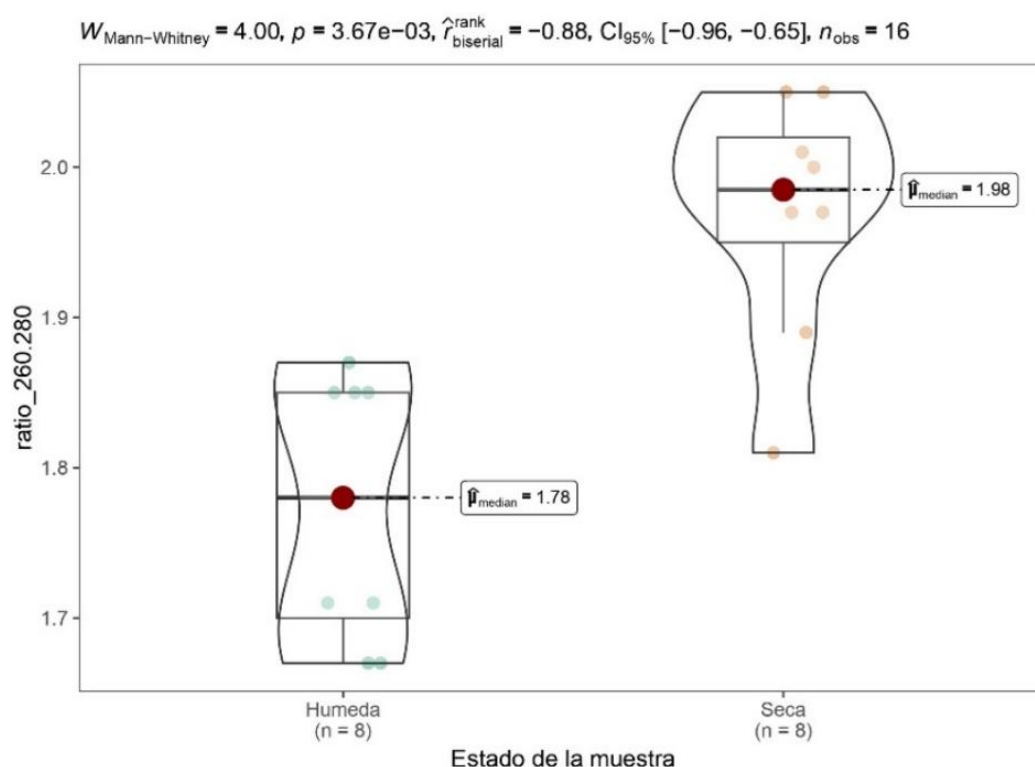
8.2.1.1. *Cymbella sp.*

En cuanto al Protocolo NaCl, la A260/280 tuvo una mediana de 1.78 para muestras húmedas y 1.98 para muestras en estado seco, siendo esta última la de mayor nivel. El valor $p = 0.00367$ demuestra que si existen diferencias significativas entre estado de la muestra (Figura 9). Cabe mencionar que la mediana de la muestra “Seca” se considera de “Pureza óptima”, mientras que para el grupo “Húmeda” la mediana se considera “Pureza aceptable”.

Para el protocolo CTAB, la relación A260/280 no posee diferencias significativas entre estados de la muestra ($p = 0.49$). Siendo la mediana para las muestras Secas igual a 2.02 y para muestras húmedas igual a 2.00. Ambos datos se consideran de “pureza óptima”. Por lo tanto, este Protocolo funciona de forma correcta tanto para muestras secas como para muestras húmedas.

Figura 9

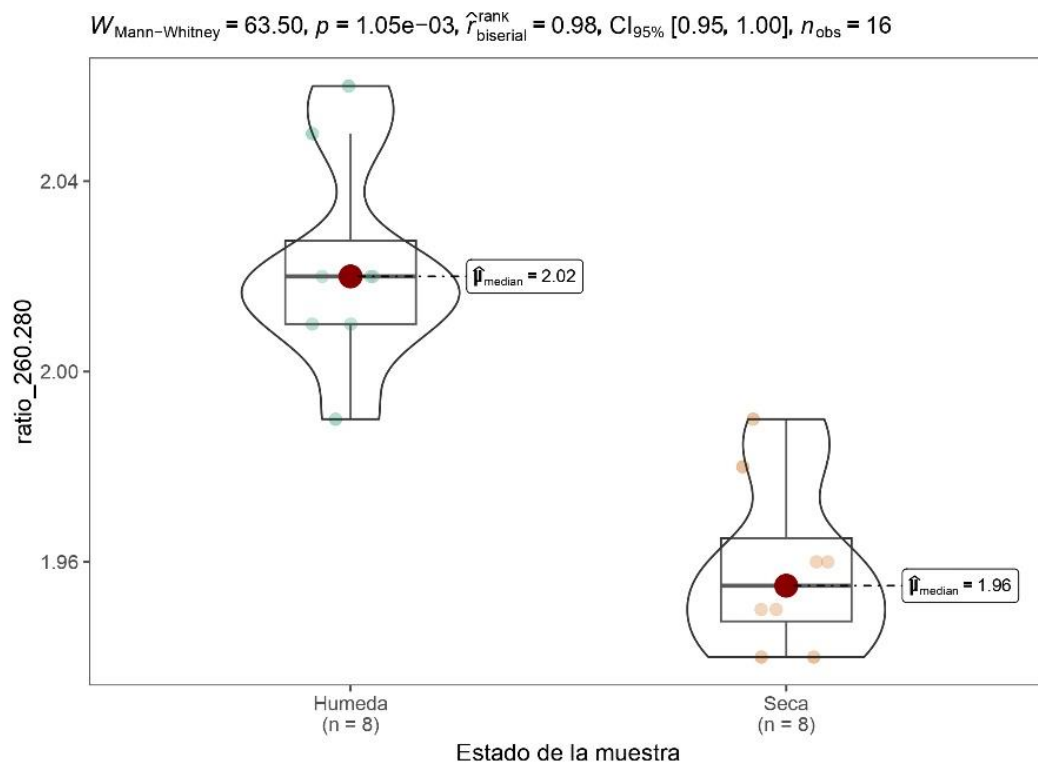
Relación A260/280 en Cymbella sp. según el estado de la muestra con el Protocolo NaCl.



En cuanto al Protocolo SDS-PK, la relación A260/280 muestra diferencias significativas ($p = 0.001$) entre estados de muestra, siendo la mediana de las muestras húmedas ($Me = 2.02$) mayor que la seca ($Me = 1.96$). Sin embargo, en ambos casos se considera una muestra con “Pureza óptima” (Véase Figura 10).

Figura 10

Relación A260/280 en Cymbella sp. según el estado de la muestra con el Protocolo SDS-PK.



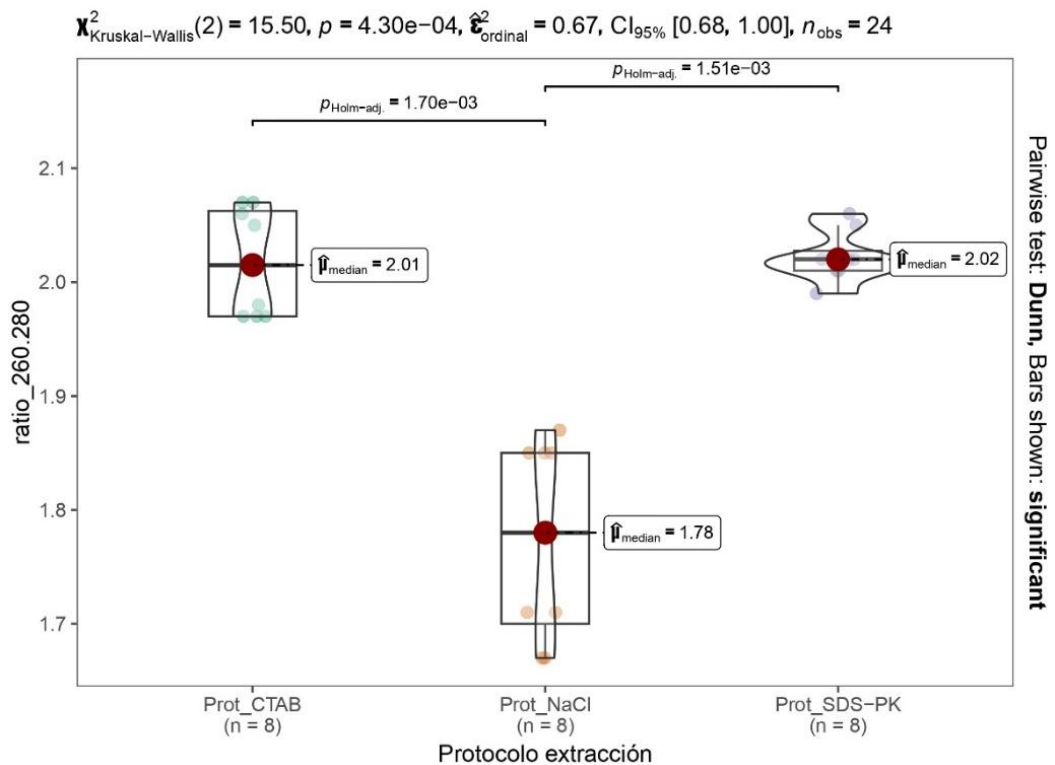
La comparación de los valores A260/280 entre los 3 protocolos para la muestra Húmeda revelan diferencias significativas ($p = 0.00043$). Con el análisis entre pares se puede apreciar que Prot_NaCl difiere significativamente con Prot_CTAB ($p_{\text{holm-adj}} = 0.0017$) y Prot_SDS-PK ($p_{\text{holm-adj}} = 0.00151$), siendo las medianas de estos últimos ($Me_{\text{CTAB}}: 2.01; Me_{\text{SDS-PK}}: 2.02$) superiores al de NaCl. Cabe mencionar que las medianas

de Prot_CTAB y Prot_SDS-PK son consideradas de “pureza óptima” (Ver Figura 11). En cuanto al ratio A260/230, el valor de la mediana del Pro_CTAB (1.77) es considerado el menos contaminado y más cercano a una “pureza aceptable”.

En la Figura 11 Se observa que el IQR de Prot_NaCl (0.15) es el más amplio de los tres, mientras que el menor es del Prot_SDS-PK (0.0175) el cual indica que los datos son menos dispersos en este protocolo.

Figura 11

Relación A260/280 de Cymbella sp. entre protocolos de extracción con muestras húmedas

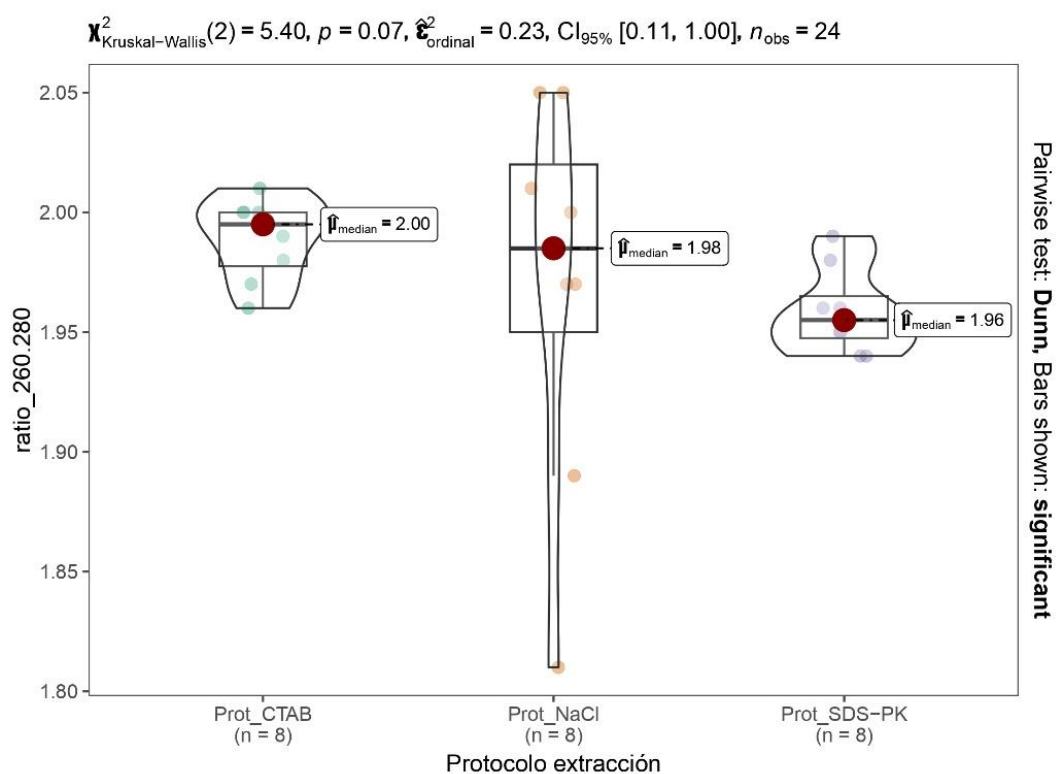


Por último, para las muestras en estado seco, los valores de A260/280 sugieren que no existe diferencia significativa entre las medianas de los protocolos, ya que tienen un valor $p = 0.07$. Para A260/280 las medianas de todos los protocolos se consideran de “pureza óptima”, no obstante, en A260/230 la mediana de Prot_NaCl y Prot_CTAB se consideran menos contaminadas y más cercanas a una “pureza aceptable”. En la Figura 12 se pueden

observar las medianas y la dispersión de los datos con respecto a ella, el protocolo NaCl tiene un IQR (0.07) superior al del Prot_CTAB y Pro_SDS-PK, lo cual significa que ambos protocolos tienen una mejor consistencia de los resultados.

Figura 12

Relación A260/280 de Cymbella sp. entre protocolos de extracción con muestras secas.

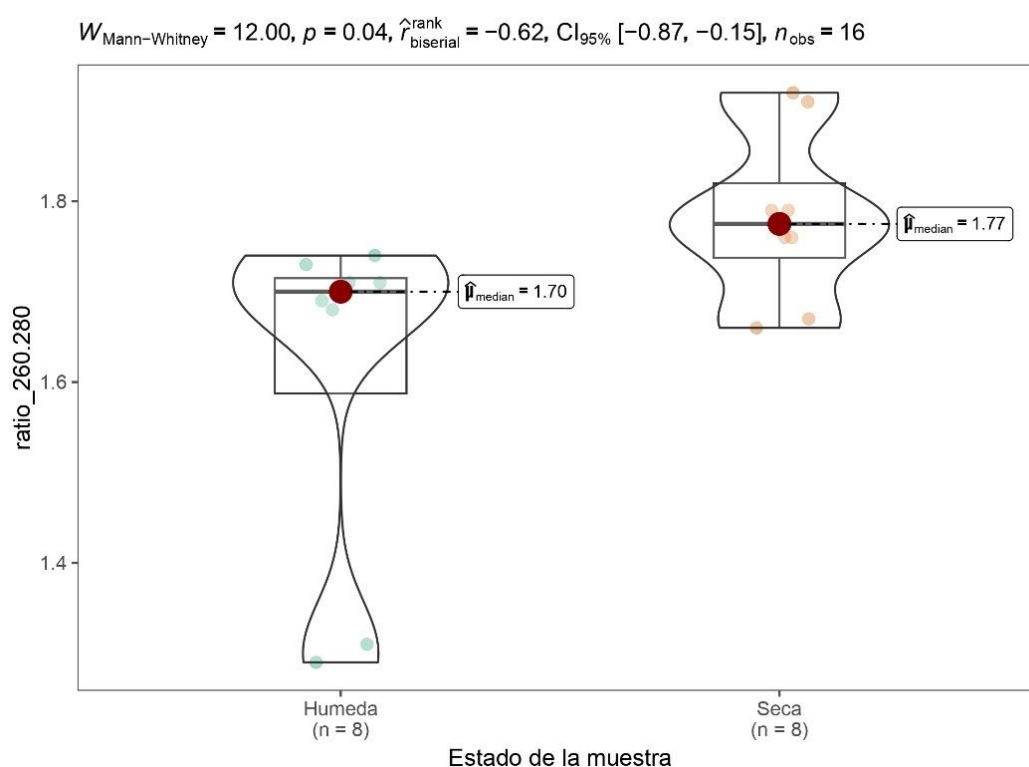


8.2.1.2. *Nitzschia sp.*

Para el Protocolo de NaCl, tanto en A260/280 como en A260/230 se evidenciaron diferencias significativas entre muestra Húmeda y Seca. El valor para A260/280 fue de $p = 0.04$, la mediana más alta pertenece a las muestras secas ($Me: 1.77$), y para A260/230 ocurre lo mismo, la mediana más alta es de la biomasa seca ($Me: 0.88$). Cabe mencionar que en A260/280 las dos medianas se consideran de “pureza aceptable”. Ver Figura 13.

Figura 13

Relación A260/280 en Nitzschia sp. según el estado de la muestra con el Protocolo NaCl.



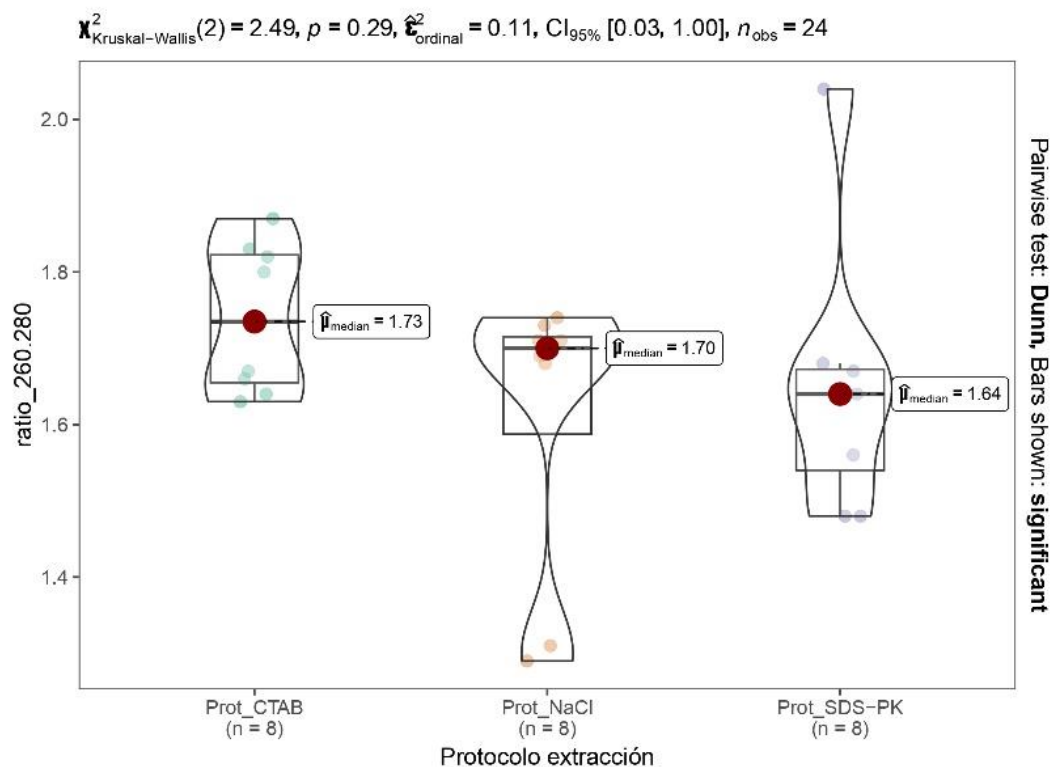
Con respecto al protocolo CTAB, no se demostraron diferencias significativas entre muestras secas y húmedas, siendo el p valor de A260/280 igual a 0.13. Es importante destacar que para A260/280 las medianas ($Me_H: 1.73$; $Me_S: 1.84$) de ambos tipos de

muestras se consideran de “pureza aceptable” y “pureza óptima. En cuanto al protocolo SDS-PK, los valores de las medianas en A260/280 no mostraron diferencias significativas entre muestras secas y húmedas con un $p = 0.06$ y ambas medianas 1.64 (húmedas) y 1.70 (seca) se consideran de “pureza aceptable”.

Para muestras húmedas la relación A260/280 no revela diferencias significativas entre sus medianas, ya que su valor p fue de 0.29. Sin embargo, cabe mencionar que el protocolo de CTAB es el menos contaminado en A260/230. En la Figura 14 se muestra que los datos en del protocolo CTAB son más homogéneos respecto a la mediana y no tiene valores atípicos muy alejados en comparación con Prot_NaCl y Prot_CTAB, aunque el IQR de los tres protocolos no difiere mucho entre sí ($IQR_{NaCl} = 0.12$; $IQR_{CTAB} = 0.16$; $IQR_{SDS-PK} = 0.13$).

Figura 14

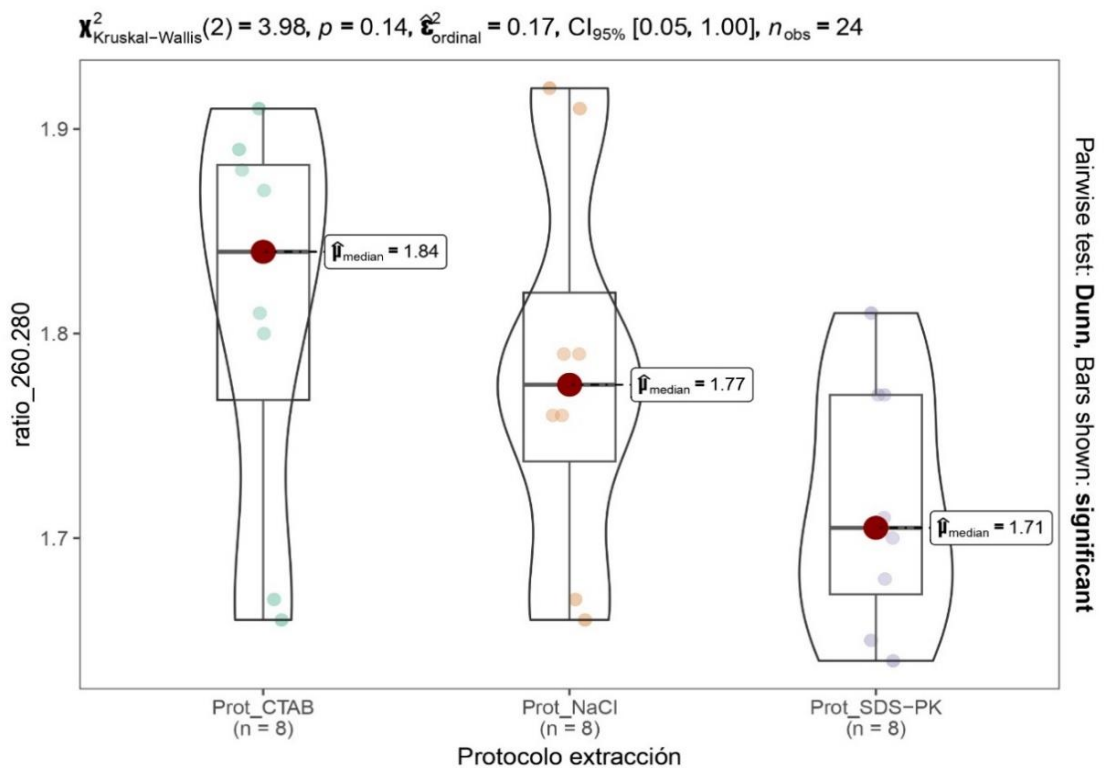
Relación A260/280 de Cymbella sp. entre protocolos de extracción con muestras húmedas.



Considerando las muestras secas, el A260/280 no muestra diferencias significativas ($p = 0.14$), encajando la mediana del Prot_NaCl y Prot_SDS-PK como valores de “pureza aceptable”, mientras que Prot_CTAB tiene “pureza óptima”. Adicionalmente, para A260/230 la mediana del Prot_CTAB (1.43) es superior a los otros protocolos, considerándose el menos contaminado. En la Figura 15., se muestra que la mediana del Prot_CTAB es mayor que Prot_NaCl y Prot_SDS-PK. En cuanto a la dispersión de los datos, el IQR de los tres protocolos indica que el Prot_NaCl (0.08) tiene una mejor distribución con respecto a la mediana que los otros protocolos.

Figura 15

Relación A260/280 de Nitzschia sp. entre protocolos de extracción con muestras secas



8.2.2. *Integridad*

Para realizar la electroforesis se escogieron las muestras que tenían las mejores curvas de ADN y aquellas que cumplan o se acerquen a los parámetros de calidad A260/280 Y A260/230. Para el Protocolo 1 NaCl (P1) se analizaron 9 muestras (Figura 16.), para el Protocolo 2 CTAB (P2) se analizaron 12 muestras y por último para el Protocolo 3 SDS-PK (P3) se analizaron 6 muestras (Figura 17). En la Tabla 6 se muestran las calificaciones en base a los criterios detallado en el apartado 7.2.2. de metodología.

Tabla 6
Integridad, pureza y concentración de ADN

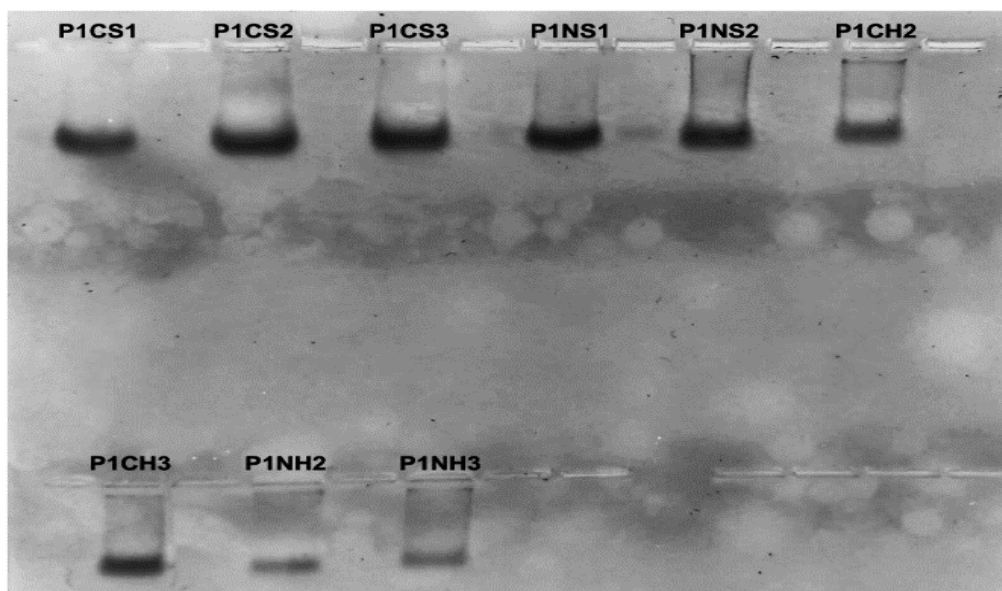
ID Sample	A260/280	Concentración	Calificación Integridad
P1CS1	2.07	2841.4	3/3
P1CS2	2.05	3390.9	3/3
P1CS3	1.97	864.9	3/3
P1CH2	1.85	327.5	3/3
P1CH3	1.87	277.2	3/3
P1NS1	1.79	435	3/3
P1NS2	1.91	868.8	3/3
P1NH2	1.71	93	2/3
P1NH3	1.74	162.9	2/3
P2CS1	1.98	805.1	3/3
P2CS2	1.99	1687.3	3/3
P2CS3	2	530	3/3
P2CS4	2.1	765	3/3
P2CH1	1.97	399.4	3/3
P2CH2	2.07	390.3	3/3
P2CH3	2.05	195.9	3/3

P2CH4	1.98	83.1	2/3
P2NS1	1.81	521	2/3
P2NS2	1.89	255.2	2/3
P2NH1	1.67	83.2	2/3
P2NH2	1.8	262.4	3/3
P3NS1	1.68	110.1	2/3
P3NS2	1.77	101.4	2/3
P3NH3	2.04	182	2/3
P3CS2	1.94	430.8	3/3
P3CH4	2.02	155.9	2/3
P3CS4	1.93	258.7	3/3

Los resultados nos indican una integridad entre alta y adecuada para todas las muestras analizadas. Este hallazgo es consistente con los valores de pureza A260/280 obtenidos durante el análisis. Para el Prot_NaCl el 77.7 % obtuvo una integridad alta, mientras que el 22,2% una integridad adecuada. Por otro lado, el Prot_CTAB consiguió que el 66.6% con integridad alta y el 33.3 % con integridad adecuada. Por último, el Prot_SDS-PK consiguió 33.33% de integridad alta y 66.67% con integridad adecuada.

Figura 16

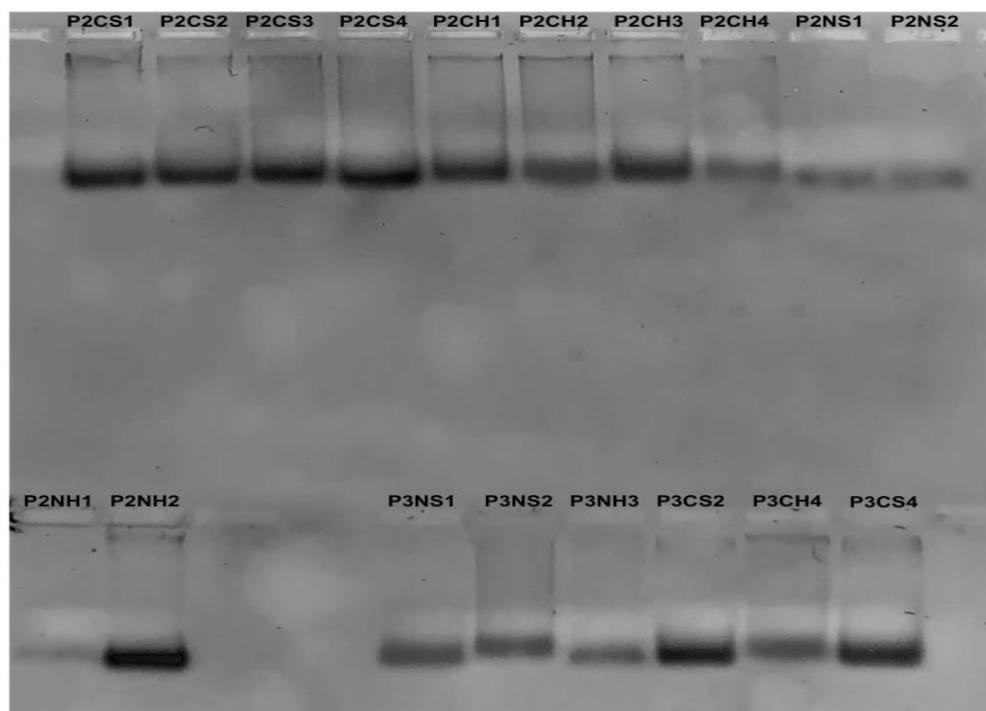
Electroforesis en gel de agarosa 1% muestras del Protocolo NaCl



Nota. Las iniciales pertenecen al código de la muestra protocolo NaCl (P1), especie *Nitzschia sp* (N) o *Cymbella sp* (C), estado de muestra seca (S) o húmeda (H), y numero de muestra.

Figura 17

Electroforesis en gel de agarosa 1%, muestras del Protocolo CTAB y SDS-PK



Nota. Las iniciales pertenecen al código de la muestra: protocolo CTAB (P2) y SDS-PK (P3), especie *Nitzschia sp* (N) o *Cymbella sp* (C), estado de muestra seca (S) o húmeda (H), y numero de muestra.

8.3. Costos, tiempo y calidad

Según los datos presentados en la Tabla 7., en términos de eficiencia por unidad, el protocolo NaCl destaca tanto en tiempo como en precio. Además, este protocolo tiene el índice de eficiencia de costo y tiempo (IECT) más bajo, lo cual nos indica una mejor relación entre el tiempo y el precio en comparación con los otros protocolos.

Por otro lado, el protocolo SDS-PK tiene un IECT de 1, lo que indica que el tiempo y el precio están en la misma proporción. Esto sugiere que el SDS-PK puede ser menos eficiente en términos de costo y tiempo en comparación con los otros protocolos analizados. En resumen, al considerar la relación entre el tiempo y el precio, el protocolo más eficiente es el NaCl, seguido por el CTAB. Por otro lado, el SDS-PK se posiciona como el menos eficiente en este aspecto.

Sin embargo, en términos de pureza, el protocolo CTAB logró destacar por tener una pureza más alta tanto en muestras húmedas como secas en *Cymbella sp.* pero presentando diferencias significativas con los otros protocolos solo en muestras húmedas. De la misma forma en *Nitzschia sp.*, los valores de pureza de CTAB fueron más altos en los dos estados de muestra, pero las pruebas estadísticas no arrojaron diferencias significativas en ninguno de los casos.

Tabla 7

Resumen del tiempo y costo requerido por protocolo

Protocolo	Precio \$: 100m	Tiempo: 100 m	Tiempo /U	Precio \$/U	IECT
NaCl	23.07	7:45:15	3:15:15	0.23	0.06
CTAB	23.62	8:32:00	4:02:00	0.24	0.08
SDS-PK	207.54	10:25:00	5:55:00	2.08	1

9. Discusiones, Conclusiones y Recomendaciones

9.1. Discusiones

Los resultados de este estudio proporcionan una evaluación comparativa de los protocolos de extracción de ADN: NaCl, CTAB y SDS-PK aplicado a las microalgas diatomeas *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.*, tomando en cuenta el estado de la muestra analizada, es decir seca o húmeda. Con el objetivo de determinar un protocolo de calidad y cantidad óptima tomando en cuenta además el precio y costo de cada uno de ellos para de esa manera escoger un protocolo que sea eficiente y económico.

Evaluación de la cantidad y pureza del ADN obtenido a partir de los protocolos utilizados.

Los resultados evidencian que el protocolo CTAB produjo los mejores rendimientos a partir de muestras húmedas en *Cymbella sp.* y *Nitzschia sp.* ya que presentan la mayor concentración de ADN de entre los tres protocolos en ambas especies (Me_{cym} : 296.10 ng/ μ l y Me_{Nitz} : 163.4 ng/ μ l) aunque no presentan diferencias significativas en este aspecto. De igual manera, la mediana de la pureza medida por la relación A260/280 en *Nitzschia sp.* (1.74) fue mayor pero no desde el punto de vista estadístico, en cambio para *Cymbella sp.* la mediana (A260/280: 2.02) si fue estadísticamente mayor. Estudios anteriores de extracción de material genético en diatomeas como *Asterionella Formosa* y *Chaetoseros sp.*, muestran valores de pureza similares, 1.98 y 2.00 respectivamente (Puppo, Voisin y Gontero, 2017; Zulkarnain et al., 2021). En cuanto a concentración, los resultados de este estudio superaron a los hallazgos de Zulkarnain et al., (2021), quien logró obtener 93.9 ng/ml de material genético, debido probablemente a que en el presente estudio si se utilizó β -mercaptoetanol, mientras que Zulkarnain lo excluyó. El β -mercaptoetanol es un poderoso

antioxidante que evita la degradación del ADN (Heikrujam et al., 2020). Esta propiedad es especialmente importante cuando se utilizan microalgas con un alto contenido de metabolitos oxidantes (Ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido clorogénico, apigenina y Kaempferon) como las diatomeas (Santana-Casiano, González-Dávila, González, Rico, López y Martel, 2014; Mateos, Pérez-Correa y Domínguez, 2020).

Con respecto al protocolo NaCl, las medianas de los datos con biomasa húmeda para concentración se ubicaron en segundo lugar tanto para *Cymbella sp.* (Me: 209.10 ng/μl) como para *Nitzschia sp.* (Me: 152.75 ng/μl) En cuanto al nivel de pureza los datos ubican a NaCl como el tercer mejor protocolo para *Cymbella sp.* (Me: 1.78) y el segundo para *Nitzschia sp.* (Me: 1.70). Este protocolo ha sido utilizado con diatomeas epilíticas de agua dulce en Ecuador con éxito para investigaciones moleculares posteriores de barcoding (Ballesteros, Castillejo, Haro, Montes, Heinrich y Lobo, 2020; Haro, 2019; Terán, 2019; Castillejos et al., 2022), y aunque estos estudios no presentan datos de pureza y concentración relacionados al protocolo, no se mencionan que hayan tenido inconvenientes con la utilización de este a excepción de Terán (2019), quien modificó el protocolo agregando perlas de vidrio y mencionó que los resultados en cuanto a calidad y cantidad de material genético reflejada en las relaciones 260/280 y 260/230 no fueron consistentes y no se pudieron replicar entre diferentes tipos de muestras, cabe mencionar que este autor concluye que los resultados se pueden atribuir a factores inherentes a la muestra ya que se probó a la vez un kit comercial y el rendimiento fue el mismo.

Ahora bien, este protocolo es principalmente utilizado en extracción de ADN con plantas por lo que hay más información en estos organismos. Alexander (2016), comparó el protocolo NaCl con otros tres (Kit, Cloroformo y fenol) para extracción de ADN en *Osmanthus via*, los resultados indicaron que el método NaCl produjo concentraciones más

altas que cualquier otro protocolo ($117 \pm 54,1 \mu\text{g}$), pero las proporciones A260/280 fueron las más bajas, aunque llegaron a alcanzar 1,8 que se considera “ADN puro”, sin embargo los espectros de absorbancia en 230 nm indicaron contaminación, por lo cual el autor evidenció un color oscuro en la elución. Estos resultados son similares a los expuestos en este estudio ya que si bien los valores de la relación A260/280 alcanzaron una “Pureza óptima” tanto para *Nitzschia sp.* como para *Cymbella sp.*, los valores en A260/230 con biomasa húmeda y seca en su mayoría se consideraron “ADN contaminado”, además también evidenció un color oscuro café en las extracciones de las muestras que se mantuvo incluso después de múltiples lavados, este color también se presentó con el protocolo SDS-PK, pero no con el protocolo CTAB. Este color probablemente se debe a la interacción con los compuestos fenólicos presentes comúnmente en las microalgas que se unen a las proteínas y al ADN, lo cual hace estas muestras inservibles para aplicaciones moleculares posteriores (Sharma, Khajuria y Verma, 2013).

En cuanto al protocolo SDS-PK, las medianas resultantes lo ubican en tercer lugar en cuanto a concentración y pureza (A260/280) de ADN en biomasa húmeda para *Nitzschia sp.* ($Me: 94.35 \text{ ng}/\mu\text{l}$; $Me: 1.64$), mientras que para *Cymbella sp.* se ubica por debajo del protocolo CTAB con $209.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ similar al protocolo NaCl, pero en cuanto a pureza (2.02) se ubica en primer lugar al igual que CTAB. Este protocolo ha sido utilizado en otras diatomeas para identificación molecular como *Chaetoceros sp.* (Hiransuchalert et al., 2022; Kutaku et al., 2023), *Cylindrotheca fusiformis* (Hildebrand, Dahlin y Volcani, 1998; Jacobs et al., 1992), *Synedra ulna* (Marchenkov et al., 2018), Ulnaria y Fragilaria (Zakharova, 2023), en estos estudios no se reportaron problemas con relación a la eficiencia del protocolo. Sin embargo, Iwatani, Murakami y Suzuki (2004) mencionó que el protocolo no fue eficiente con volúmenes pequeños y además gran parte de la solución se quedaba en los

tubos en vez de recuperarse. Aunque cabe señalar que en el estudio de Iwatani et al. (2004) el buffer de lisis se modificó, este problema también se presentó en el estudio actual, aun después de los dos tratamientos de extracción la fase acuosa seguía siendo difícil de extraer sin arrastrar la fase orgánica, lo cual pudo provocar que el producto resultante mostrara un nivel de contaminación alto en la relación A260/230 en ambas especies tanto en biomasa seca como húmeda.

Por otro lado, Chakraborty, Vijayan, Nair, Santra y Bhattacharya (2008) modifica el protocolo SDS-PK agregando 2% β -mercaptoetanol al buffer de lisis, con lo cual logró aislar ADN de buena calidad ($1,15 \pm 0,66$ - $1,94 \pm 0,03$) y mínima degradación. Adicionalmente Gaget, Keulen, Lau, Monis y Brookes (2017) en su investigación señala que el método SDS-PK logró obtener un promedio de $1.70 \pm 0,26$ en cuanto a la relación A260/280 y $7,8 \pm 3,4$ ng μL^{-1} en cuanto a concentración. Estos datos son similares a los resultados de este estudio en lo que a pureza respecta, pero difieren en concentración, siendo esta superior en la presente investigación. Probablemente debido a las modificaciones que Gaget et al. (2017) implementó, especialmente la reducción del porcentaje de SDS en el buffer de lisis, ya que este componente interfiere con las proteínas y ayuda a solubilizar las membranas celulares permitiendo la liberación del ADN (Schenk et al., 2023). Por lo tanto, una reducción del porcentaje utilizado pudo reducir a su vez el rendimiento de la extracción de ADN.

Ahora bien, con biomasa seca los resultados de pureza (A260/280) no tuvieron diferencias significativas entre protocolos, pero si en concentración. El protocolo NaCl destacó en concentración con *Nitzschia sp.* y *Cymbella sp.* (Me_{Cym} : $2083.45 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ y Me_{Nitz} : $433.05 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$) ocupando el primer lugar, seguido del protocolo CTAB que alcanzó el segundo lugar y el protocolo SDS-PK que ocupó el tercer lugar. Para los tres protocolos la mayor concentración de ADN se obtuvo de la biomasa seca, por lo que

si lo que se requiere son altas concentraciones, este tipo de muestra sería una gran opción. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Khanuja, Shasany, Darokar y Kumar (1999), Khan, Irfan, Alam y Abdin (2007) y Sharma, Gill y Singh (2002), aunque cabe mencionar que estos estudios se realizaron con plantas superiores. Ahora bien, las altas concentraciones de ADN probablemente se deban a la también alta concentración de células que conforman la biomasa seca. Además, el proceso de secado puede eliminar ciertos metabolitos secundarios que no son resistentes al calor (Chen, Chang y Lee, 2015), dejando una muestra más limpia y promoviendo una mejor extracción de ADN. Sin embargo, las extracciones con biomasa seca raramente se realizan en microalgas, debido al esfuerzo requerido para obtener el peso necesario sumado al costo energético que conlleva una técnica adecuada de secado (Kim y Kim, 2022) por esta razón en este estudio se utilizó 50 mg, es decir la mitad de lo que se usó para la biomasa húmeda, para de esta manera reducir las cantidades requeridas.

Análisis de la integridad del ADN.

La integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa 1% se utiliza como evaluación complementaria de la calidad del ADN (Arakawa et al., 2022). Para los propósitos de este estudio se escogieron las muestras con mejor pureza (A260/280 y A260/230) de los tres protocolos, siendo CTAB el que mayor número de muestras se evaluó (12 muestras) en las cuales se observaron bandas definidas. Resultados similares se obtuvieron en Kang, Chanderbali, Lee, Soltis, Soltis y Kim (2023), en donde se comparó CTAB con un kit comercial, y fue el protocolo CTAB quien obtuvo bandas más integrales libres de contaminantes.

Por otro lado, Misque (2018), comparó la eficiencia del protocolo NaCl con el kit comercial PowerSoil® y concluyó que el método más eficiente fue el protocolo NaCl ya que se obtuvo una banda más visible en el gel de agarosa mediante electroforesis a diferencia del método basado en el kit, por lo tanto, eligió este protocolo para los posteriores estudios de identificación molecular de diatomeas. Los resultados del presente estudio concuerdan con los hallados por Misque (2019) ya que 7/9 muestras tuvieron integridad alta y 2/9 integridad adecuada y ninguno degradado. En cuanto al protocolo SDS-PK, los resultados arrojaron integridades de alta (2/6 muestras) y adecuada (4/6 muestras), similares al estudio de Kaarunya, Sivagama, Somasundaram y Anantharaman (2016), aunque en este no se utilizó fenol como componente del buffer de extracción. En los tres protocolos, la especie *Nitzschia sp* fue la que obtuvo los menores puntajes de integridad, aunque aún se consideraron adecuados, lo cual concuerda con los valores de pureza, ya que estos apenas alcanzaron 1.78 entre secas y húmedas en comparación con *Cymbella sp.* que alcanzó 2.02 en el A260/280.

Análisis de costos y tiempo empleado

El análisis del tiempo y costo reveló que los protocolos NaCl y CTAB son más eficientes en este aspecto. El precio de los tres protocolos es considerablemente más barato en comparación con los algunos kits comerciales, que pueden llegar hasta 10.88 € por muestra, aunque la ventaja de estos radica en que requieren menos tiempo de ejecución (Nouws et al., 2020; Wang et al., 2019). El protocolo SDS-PK resultó ser el más costoso debido principalmente a la enzima Proteinasa K y el número de veces que se aplica, lo cual también influye en el tiempo empleado. Cabe mencionar que los precios pueden variar en función del país, el tiempo y estado de la moneda. En general, se procuró optimizar el tiempo empleado de los protocolos estandarizando el tiempo de secado a 30 min, aunque esto puede

llegar a variar dependiendo de la muestra, debido a que hay muestras que secan más rápido que otras, por lo que se recomienda ir revisando cada 10 min para evitar que el excesivo secado del pellet de como resultado ADN dañado de bajo peso molecular o que evite su elución (Shenck, et al., 2023). Otra etapa que considerar es el tiempo de preparación de soluciones y reactivos, que en este estudio no se toma en cuenta, pero que es fundamental para una correcta extracción tal como menciona Martin et al., (2017).

Análisis de la peligrosidad de los reactivos

De entre los tres protocolos de extracción de ADN, el método NaCl fue el más amigable ya que no utiliza reactivos con un grado de peligrosidad alta. Por otro lado, el protocolo CTAB hace uso de compuestos peligrosos como β -mercaptoetanol, cloroformo y alcohol isoamílico, los cuales son altamente contaminantes (Chemos GmbH & Co.KG, 2024; NJ Department of Health, 2017; Reeb, 2023). El protocolo SDS-PK, también utiliza cloroformo y alcohol isoamílico, pero adicionando fenol, el cual es un químico toxico que resulta peligroso de almacenar y eliminar, que además requiere de un equipo de protección más sofisticado como una cámara de extracción de gases o un respirador con filtro para evitar inhalar los vapores que libera. Gaget et al. (2017), concuerda con la opinión sobre la peligrosidad del fenol, pero además menciona que este agente no es indispensable en las extracciones de ADN y puede ser omitido, como ocurrió en el estudio de Kaarunya et al. (2016).

En resumen, para determinar un protocolo efectivo es necesario tomar en consideración tanto la calidad y concentración, como los costos el tiempo e incluso la peligrosidad de los reactivos. En este estudio las concentraciones alcanzadas por los tres protocolos son adecuadas para la utilización en posteriores aplicaciones moleculares (Banco

Nacional de ADN Carlos III, 2020), sin embargo, tomando en consideración todos los criterios de calidad, CTAB fue el más apropiado. Ahora bien, el protocolo NaCl es el más económico y seguro de realizar, sin embargo, este protocolo no logró separar adecuadamente los metabolitos secundarios de las muestras produciendo un pellet oscuro que, si bien la contaminación no fue evidente por espectrofotometría, pudiera causar repercusiones a nivel de otros análisis moleculares más sensibles, como en PCR o secuenciación (Sharma et al., 2012). CTAB es el protocolo más recomendado por la literatura ya que al poseer β -mercaptoetanol que, aunque es peligroso, puede reducir eficientemente la contaminación por metabolitos secundarios y tiene un corto tiempo de ejecución. Precisamente por su eficiencia se han realizado múltiples pruebas con el objetivo de bajar la cantidad requerida por este compuesto (Yee, Kumar y Muthusamy, 2018). Por lo tanto, la mejor opción sería el protocolo CTAB además de que es económico y menos peligroso en comparación con el protocolo SDS-PK que hace uso del fenol.

9.2. Conclusiones.

Se logró extraer ADN total de *Nitzschia sp* y *Cymbella sp*. tanto en muestras secas como húmedas, modificando y optimizando los protocolos NaCl, CTAB y SDS-PK. La mejor concentración de ADN para ambas especies se obtuvo en biomasa seca con los protocolos NaCl (Me_{Cym} : 2083.45 $\frac{ng}{\mu l}$ y Me_{Nitz} : 433.05 $\frac{ng}{\mu l}$) y CTAB (Me_{Cym} : 923.40 $\frac{ng}{\mu l}$ y Me_{Nitz} : 317.65 $\frac{ng}{\mu l}$).

En cuanto a la pureza, no se encontraron diferencias significativas entre protocolos para la biomasa seca, aunque CTAB resultó tener valores más altos (Me_{Cym} : 2.00 y Me_{Nitz} : 1.84). En biomasa húmeda, *Nitzschia sp*. no tuvo diferencias significativas en la ratio A260/280, pero *Cymbella sp*. si se mostraron diferencias, pese a

que en ambos casos la mayor mediana fue del protocolo CTAB (Me_{Cym} : 2.02 y Me_{Nitz} : 1.74). Adicionalmente CTAB obtuvo la mayoría de las muestras viables para utilizarse en electroforesis, las cuales se consideraron ADN integro con una banda definida.

Con respecto a los costos y el tiempo, el mejor protocolo fue NaCl (IECT = 0.06), seguido de CTAB (IECT = 0.07) y por último SDS-PK (IECT = 1). Teniendo en cuenta todos los criterios evaluados en este estudio y dado que la pureza es de gran importancia para múltiples aplicaciones moleculares se puede concluir que, el protocolo CTAB es el más recomendado en la extracción de ADN para ambas especies, seguido del protocolo NaCl y el menos recomendado es SDS-PK. En base a lo antes expuesto, se acepta la hipótesis verdadera y se rechaza la nula.

9.3. Recomendaciones.

Se recomienda seguir con la evaluación y validación de estos protocolos mediante la aplicación en diferentes análisis moleculares tales como secuenciación, expresión génica y filogenia. Además, es importante que se pongan a pruebas más especies de diatomeas tanto de agua dulce como salada para poder ampliar el conocimiento sobre este grupo de microalgas.

10. Bibliografía

- Aggarwal, G., Edhigalla, P., & Walia, P. (2022). *A comprehensive review of high-quality plant DNA*. Thepharmajournal.com. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2022/vol11issue6S/PartC/S-11-5-226-798.pdf>
- Alexander, L. (2016). Rapid, effective DNA isolation from *Osmanthus* via modified alkaline lysis. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 27(2), 53–60. <https://doi.org/10.7171/jbt.16-2702-001>
- Alindonosi, A. R., Baeshen, M. N., & Elsharawy, N. T. (2021). Prospects for diatoms identification using metagenomics: A review. *Applied ecology and environmental research*, 19(6), 4281–4298. https://doi.org/10.15666/aeer/1906_42814298
- Arakawa, T., Nakagawa, M., Tomioka, Y., Sakuma, C., Li, C., Sato, T., Sato, R., Shibata, T., Kurosawa, Y., & Akuta, T. (2022). Gel-electrophoresis based method for biomolecular interaction. En *Biomolecular Interactions Part B* (pp. 67–95). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2021.12.030>
- Ayoib, A., Hashim, U., Gopinath, S. C. B., & Md Arshad, M. K. (2017). DNA extraction on bio-chip: history and preeminence over conventional and solid-phase extraction methods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(22), 8077–8088. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8493-0>
- Ballesteros, I., Castillejo, P., Haro, A. P., Montes, C. C., Heinrich, C., & Lobo, E. A. (2020). Genetic barcoding of Ecuadorian epilithic diatom species suitable as water quality bioindicators. *Comptes Rendus. Biologies*, 343(1), 41–52. <https://doi.org/10.5802/crbiol.2>

- Banco Nacional de ADN Carlos III. (2020). *Programa de control de calidad de ácidos nucleicos*. Bancoadn.org. <https://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
- Cadoret, J.-P., Garnier, M., & Saint-Jean, B. (2012). Microalgae, functional genomics and biotechnology. En *Advances in Botanical Research* (pp. 285–341). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-391499-6.00008-6>
- Castillejo, P., Ballesteros, M. I., Ríos, B. P., Cabrera, S. O., Heinrich, C., & Lobo, E. (2022). *Diatomeas epilíticas de los Andes ecuatorianos. Protocolos para su empleo como bioindicadores de la calidad del agua*. UDLA Ediciones. <https://udlapublicaciones.com/diatomeas-epiliticas-de-los-andes-ecuatorianos-protocolos-para-su-empleo-como-bioindicadores-de-la-calidad-del-agua-e1fqf.html>
- Chakraborty, S., Vijayan, K., Nair, C. V., Santra, S. C., & Bhattacharya, T. (2008). Isolation and characterization of high quality DNA from marine benthic macroalgae. *Journal of Environmental Biology*, 29(6), 907–910. https://www.researchgate.net/publication/216590790_Isolation_and_characterization_of_high_quality_DNA_from_marine_benthic_macroalgae?enrichId=rgreq-86e331e6e09089a64b6556bb40a8da08-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzIxNjU5MDc5MDtBUzo5ODc5OTM4MDg2MDkzN0AxNDAwNTY3MDE2NTA2&el=1_x_2&_esc=publicationCoverPdf
- Chemos GmbH & Co. KG. (2024). *Fichas de datos de seguridad: Cloroformo*. CHEMOS solutions through service. https://www.chemos.de/import/data/msds/ES_es/67-66-3-A0304055-ES-es.pdf
- Chen, C.-L., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2015). Dewatering and drying methods for microalgae. *Drying Technology*, 33(4), 443–454. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.997881>

- Currents Protocols. (2011). Common buffers and stock solutions. [*Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*], 00(1). <https://doi.org/10.1002/0471142700.nca02as46>
- Dairawan, M., & J Shetty, P. (2020). The evolution of DNA extraction methods. *American journal of biomedical science & research*, 8(1), 39–45. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2020.08.001234>
- Dowhan, D. H. (2012). Purification and concentration of nucleic acids. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 6(1). <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0502s06>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh Leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11–15. https://webpages.charlotte.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf
- Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(6), 1349–1349. <https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>
- Falciatore, A., Jaubert, M., Bouly, J.-P., Bailleul, B., & Mock, T. (2020). Diatom molecular research comes of age: Model species for studying phytoplankton biology and diversity. *The Plant Cell*, 32(3), 547–572. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00158>
- Gaget, V., Keulen, A., Lau, M., Monis, P., & Brookes, J. D. (2017). DNA extraction from benthic Cyanobacteria: comparative assessment and optimization. *Journal of Applied Microbiology*, 122(1), 294–304. <https://doi.org/10.1111/jam.13332>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). Isolation and quantification of DNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), db.top093336. <https://doi.org/10.1101/pdb.top093336>
- Hanada, K. (Ed.). (2020). *DNA electrophoresis: Methods and protocols*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0323-9>

- Haro, A. (2019). *Evaluación de dos genes como código de barras de ADN para la identificación de diatomeas epilíticas en Ecuador* [Universidad de las Americas]. <https://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/11813>
- Heikrujam, J., Kishor, R., & Behari Mazumder, P. (2020). The chemistry behind plant DNA isolation protocols. En *Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies*. IntechOpen.
- Hildebrand, M., Dahlin, K., & Volcani, B. E. (1998). Characterization of a silicon transporter gene family in *Cylindrotheca fusiformis*: sequences, expression analysis, and identification of homologs in other diatoms. *Molecular & General Genetics: MGG*, 260(5), 480–486. <https://doi.org/10.1007/s004380050920>
- Hiransuchalert, R., Kutako, M., Watchasit, S., Kaewduang, M., Setthamongkol, P., Chindudsadeegul, P., Gunbua, V., & Jaritkhuan, S. (2022). Morphological and molecular comparison of three centric diatoms (Bacillariophyceae: Chaetoceros) isolated from the coast of Eastern Thailand. En *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1406725/v1>
- Iwatani, N., Murakami, S., & Suzuki, Y. (2004). A sequencing protocol of some DNA regions in nuclear, chloroplastic and mitochondrial genomes with an individual colony of *Thalassiosira nordenskioeldii* Cleve (Bacillariophyceae). *Polar Bios*, 18, 35–45. https://www.researchgate.net/publication/242515749_A_sequencing_protocol_of_some_DNA_regions_in_nuclear_chloroplastic_and_mitochondrial_genomes_with_an_individual_colony_of_Thalassiosira_nordenskioeldii_Cleve_Bacillariophyceae
- Jacobs, J. D., Ludwig, J. R., Hildebrand, M., Kukel, A., Feng, T.-Y., Ord, R. W., & Volcani, B. E. (1992). Characterization of two circular plasmids from the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis*: plasmids hybridize to chloroplast and nuclear

- DNA. *Molecular & General Genetics: MGG*, 233(1–2), 302–310.
<https://doi.org/10.1007/bf00587592>
- Jadhav, K., Raja, R., & Natesan, S. (2015). Chemistry of plant genomic dna extraction protocol. *Bioinfolet*, 12(3A), 543–548.
https://www.researchgate.net/publication/288357598_Chemistry_of_plant_genomic_dna_extraction_protocol
- 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).
<https://doi.org/10.1186/s13007-017-0228-9>
- Japelaghi, R. H., Haddad, R., & Garoosi, G.-A. (2011). Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Molecular Biotechnology*, 49(2), 129–137.
<https://doi.org/10.1007/s12033-011-9384-8>
- Kaarunya, E., Sivagama, S., Somasundaram, S. T., & Anantharaman, P. (2016). A simple approach combining microscopic and molecular techniques to identify diatoms isolated from Vellar Estuary, South East Coast of India. *Journal of alga*, 7(1), 71–77.
https://www.researchgate.net/profile/Kaarunya-Eswaran/publication/308674402_A_simple_approach_combining_microscopic_and_molecular_techniques_to_identify_diatoms_isolated_from_Vellar_Estuary_South_East_Coast_of_India/links/5fc3faec299bf104cf93c05a/A-simple-approach-combining-microscopic-and-molecular-techniques-to-identify-diatoms-isolated-from-Vellar-Estuary-South-East-Coast-of-India.pdf
- Kabiraj, S., Jyoti, S., & Goutam, U. (2022). Species Identification in Diatoms using DNA Barcoding: An Overview. *Biological Forum-An International*, 14(3), 979–985.

https://www.researchgate.net/publication/380000252_Species_Identification_in_Diatoms_using_DNA_Barcoding_An_Overview

- Kang, M., Chanderbali, A., Lee, S., Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Kim, S. (2023). High-molecular-weight DNA extraction for long-read sequencing of plant genomes: An optimization of standard methods. *Applications in Plant Sciences*, 11(3). <https://doi.org/10.1002/aps3.11528>
- Khan, S., Irfan Qureshi, M., Alam, T., & Abdin, M. Z. (2007). *Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion*. Academicjournals.org. <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text-pdf/E92F5926123>
- Khanuja, S., Shasany, A., Darokar, M., & Kumar, S. (1999). Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils. *Plant Molecular Biology*, 17, 1–7. https://www.researchgate.net/publication/251152041_Rapid_Isolation_of_DNA_from_Dry_and_Fresh_Samples_of_Plants_Producing_Large_Amounts_of_Secondary_Metabolites_and_Essential_Oils?enrichId=rgreq-a35c1ea0e2165de7785c50115b1df668-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI1MTE1MjA0MTtBUzoxMDY0OTIwNDg5Njk3MjIAMSQwMjQwMTA5MTE0OQ%3D%3D&el=1_x_2&_esc=publicationCoverPdf
- Kim, G. M., & Kim, Y.-K. (2022). Drying Techniques of Microalgal Biomass: A Review. *Applied Chemistry for Engineering*. *Applied Chemistry for Engineering*, 33(2), 145–150. <https://doi.org/10.14478/ace.2022.1007>
- Kutako, M., Hiransuchalert, R., Watchasit, S., Kaewduang, M., Hanchana, O., Setthamongkol, P., Chindudsadeegul, P., Gunbua, V., & Jaritkhuan, S. (2023).

- Morphological and molecular comparison as a useful tool for identification of the three centric marine diatoms (Bacillariophyceae: Chaetoceros). *Archives of Microbiology*, 205(5). <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03525-9>
- Marchenkov, A. M., Petrova, D. P., Morozov, A. A., Zakharova, Y. R., Grachev, M. A., & Bondar, A. A. (2018). A family of silicon transporter structural genes in a pennate diatom *Synedra ulna* subsp. *danica* (Kütz.) Skabitsch. *PloS One*, 13(8), e0203161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203161>
- Martin, E., Moreno Ruiz Holgado, M., Ruiz, M., María, G., Silenzi Usandivaras, G., & Bonano, M. (2017). Comparación de métodos de extracción de ADN para el género *Astylus* (Coleoptera: Melyridae). *Acta Zoológica Lilloana*, 61(1), 55–64. <https://www.researchgate.net/publication/319681991>
- Mateos, R., Pérez-Correa, J. R., & Domínguez, H. (2020). Bioactive properties of marine phenolics. *Marine Drugs*, 18(10), 501. <https://doi.org/10.3390/md18100501>
- Minchin, S., & Lodge, J. (2019). Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays in Biochemistry*, 63(4), 433–456. <https://doi.org/10.1042/ebc20180038>
- Misque, S. (2018). *Utilización del gen 18s, como marcador genético para la identificación molecular de diatomeas epilíticas* [Universidad Técnica de Cotopaxi]. <https://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/11560>
- Mora, D., Abarca, N., Proft, S., Grau, J. H., Enke, N., Carmona, J., Skibbe, O., Jahn, R., & Zimmermann, J. (2019). Morphology and metabarcoding: a test with stream diatoms from Mexico highlights the complementarity of identification methods. *Freshwater Science*, 38(3), 448–464. <https://doi.org/10.1086/704827>
- Muñoz-Colmenero, M., Sánchez, A., Correa, B., Figueiras, F. G., Garrido, J. L., & Sotelo, C. G. (2021). Evaluation of DNA extraction methods and bioinformatic pipelines

- for marine nano- and Pico-eukaryotic plankton analysis. *Frontiers in marine science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.584253>
- New Jersey Department of Health. (2017). *Derecho a Saber Hoja Informativa sobre Sustancias Peligrosas*. New Jersey Department of Health. <https://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1487sp.pdf>
- Nguyen, T. N. M., Berzano, M., Gualerzi, C. O., & Spurio, R. (2011). Development of molecular tools for the detection of freshwater diatoms. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.10.008>
- Nouws, S., Bogaerts, B., Verhaegen, B., Denayer, S., Piérard, D., Marchal, K., Roosens, N. H. C., Vanneste, K., & De Keersmaecker, S. C. J. (2020). Impact of DNA extraction on whole genome sequencing analysis for characterization and relatedness of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71207-3>
- Nugroho, K., Satyawan, D., Tasma, I. M., & Lestari, P. (2022). Genomic DNA extraction: The critical stage in plant molecular analysis activities. *Jurnal agrobiogen*, 18(1), 33. <https://doi.org/10.21082/jbio.v18n1.2022.p33-44>
- Okolodkov, Y., & Huerta-Quintanilla, D. (2018). Marine benthic diatoms. *Materia, Ciencia y Nanociencia*, 1(2), 14–18. <https://www.uv.mx/veracruz/microna/files/2019/06/A2-Diatomeas-bentonicas-marinas1.pdf>
- Pinilla-Bermúdez, G. (2019). *Biología molecular: ADN recombinante y sus aplicaciones*. El Manual Moderno.
- Puppo, C., Voisin, T., & Gontero, B. (2017). *Genomic DNA extraction from the pennate diatom *Asterionella formosa* optimised for next generation sequencing*. v1. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.jytcpxn>

- Rabiee, N., Khatami, M., Jamalipour Soufi, G., Fatahi, Y., Iravani, S., & Varma, R. S. (2021). Diatoms with invaluable applications in nanotechnology, biotechnology, and biomedicine: Recent advances. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(7), 3053–3068. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00475>
- Reeb, E. (2023). *Ficha de datos de seguridad: 2 Mercaptoethanol (BME)*. Chevron Philips Chemical. <https://www.cpchem.com/sites/default/files/2023-10/01956660.pdf>
- Round, F., Crawford, R., & Mann, D. G. (1990). The diatoms: biology and morphology of the general. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 70(4), 1–10. <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-the-marine-biological-association-of-the-united-kingdom>
- Salazar, A., Sandoval, A., & Armendáriz, J. (2013). *Biología Molecular: Fundamentos y aplicaciones*. McGraw Hill. https://www.academia.edu/45376129/Biologia_Molecular_Adriana_Maria_Salazar
- Santana-Casiano, J. M., González-Dávila, M., González, A. G., Rico, M., López, A., & Martel, A. (2014). Characterization of phenolic exudates from *Phaeodactylum tricornutum* and their effects on the chemistry of Fe (II)–Fe (III). *Marine Chemistry*, 158, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2013.11.001>
- Schenk, J. J., Becklund, L. E., Carey, S. J., & Fabre, P. P. (2023). What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. *Applications in Plant Sciences*, 11(3). <https://doi.org/10.1002/aps3.11517>
- Sharma, A. D., Gill, P. K., & Singh, P. (2002). DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(4), 415–415. <https://doi.org/10.1007/bf02772129>
- Sharma, P., Khajuria, A., & Verma, S. (2013). Genomic DNA extraction from *Ferula jaeschkeana* vatke (Apiaceae) optimized for random amplified polymorphic DNA

- polymerase chain reaction (RAPD-PCR) analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India. Section B*, 83(3), 341–345.
<https://doi.org/10.1007/s40011-012-0142-x>
- Singleton, T. L. (Ed.). (2018). *Schizosaccharomyces pombe: Methods and Protocols*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7546-4>
- Sproles, A. E., Fields, F. J., Smalley, T. N., Le, C. H., Badary, A., & Mayfield, S. P. (2021). Recent advancements in the genetic engineering of microalgae. *Algal Research*, 53(102158), 102158. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102158>
- Teran, P. (2019). *Identificación de microalgas aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la Sierra y Amazonía del Ecuador mediante el sistema de código de barras de ADN* [Universidad de las Americas]. <https://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/11444>
- Thermo Fisher. (2009). *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. User Manual V1.0*. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>
- Tiwari, A., Pandey, A., Show, P. L., & Parameswaran, B. (2023). *Diatoms biotechnology*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003436553>
- Varma, A., Padh, H., & Shrivastava, N. (2007). Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal*, 2(3), 386–392.
<https://doi.org/10.1002/biot.200600195>
- Vasselon, V., Domaizon, I., Rimet, F., Kahlert, M., & Bouchez, A. (2017). Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: ¿Do DNA extraction methods matter? *Freshwater Science*, 36(1), 162–177.
<https://doi.org/10.1086/690649>
- Vinod, K. (2004). Total, genomic DNA extraction, quality check and quantitation. In: *Proceedings of the training programme on “Classical and modern plant breeding*

- techniques – A hands on training. *Agricultural University*, 109–121.
https://www.researchgate.net/profile/Vinod-Kurungara/publication/265490368_TOTAL_GENOMIC_DNA_EXTRACTION_QUALITY_CHECK_AND_QUANTITATION/links/5538b2ec0cf2239f4e79b0e3/TOTAL-GENOMIC-DNA-EXTRACTION-QUALITY-CHECK-AND-QUANTITATION.pdf
- Wang, Y.-S., Dai, T.-M., Tian, H., Wan, F.-H., & Zhang, G.-F. (2019). Comparative analysis of eight DNA extraction methods for molecular research in mealybugs. *PloS One*, 14(12), e0226818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226818>
- WORMS. (2024a). *Nitzschia A.h. hassall*, 1845. [Marinespecies.org. https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=149045](https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=149045)
- WORMS. (2024b). *WoRMS - world register of marine species - Cymbella affinis Kützing*, 1844. [Marinespecies.org. https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=149547](https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=149547)
- Yee, W., Kumar, J. N., & Muthusamy, P. D. (2018). Inclusion of 2-mercaptoethanol in lysis buffer could interfere with isolation of high molecular weight DNA from freshwater microalgae. *Indian Journal of Microbiology*, 58(1), 109–113. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0698-5>
- Zakharova, Y., Marchenkov, A., Petrova, D., Bukin, Y., Morozov, A., Bedoshvili, Y., Podunay, Y., Davidovich, O., Davidovich, N., Bondar, A., Kahlert, M., & Likhoshway, Y. (2023). Delimitation of some taxa of Ulnaria and Fragilaria (Bacillariophyceae) based on genetic, morphological data and mating compatibility. *Diversity*, 15(2), 271. <https://doi.org/10.3390/d15020271>
- Zulkarnain, M. I., Rahayu, H. T., Herida, A. P., Erfianti, T., Kusumaningrum, H. P., Zainuri, M., Endrawati, H., Widowati, I., Haryanti, W. D. U., & Mahendrajaya, R. T. (2021).

Improvement of the potency of microalgae *Nannochloropsis* and *Chaetoceros* through antioxidant analysis and optimization of DNA isolation. *Journal of physics. Conference series*, 1943(1), 012080. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1943/1/012080>

11. ANEXOS

Anexo 1

Resumen de las medianas y diferencias significativas en concentración y pureza en Cymbella sp.

Protocolo	Húmeda								Seca							
	Conc.	IQR	Sig.	A260/280	IQR	Sig.	A260/230	Sig.	Conc.	IQR	Sig.	A260/280	IQR	Sig.	A260/230	Sig.
Prot_NaCl	209.10	161.18	A	1.78	0.15	A	0.925	A	2083.45	1656	A	1.99	0.07	A	1.84	A
Prot_CTAB	296.10	224.75	A	2.02	0.09	B	1.77	B	923.40	481.45	A	2.00	0.02	A	1.78	A
Prot_SDS-PK	209.50	28.925	A	2.02	0.02	B	1.49	C	411.30	107.36	B	1.96	0.02	A	1.46	A

Anexo 2

Resumen de las medianas y diferencias significativas en concentración y pureza en Nitzschia sp.

Protocolo	Húmeda								Seca							
	Conc	IQR	Sig.	A260/280	IQR	Sig.	A260/230	Sig.	Conc	IQR	Sig.	A260/280	IQR	Sig.	A260/230	Sig.
Prot_NaCl	152.75	65.475	A	1.7	0.128	A	0.705	A	433.05	148.85	A	1.78	0.08	A	0.88	A
Prot_CTAB	163.4	183.4	A	1.74	0.168	A	1.075	A	317.65	220.08	AB	1.84	0.12	A	1.425	B
Prot_SDS-PK	94.35	59.825	A	1.64	0.133	A	0.73	A	108.1	39.925	B	1.71	0.1	A	1.015	AB

Anexo 3

Detalle del costo de los componentes del protocolo NaCl.

NaCl	Detalles	Precio \$	Cantidad gr	Valor/gr	Valor/muestra
Tampón extracción	200 mM tris-HCl	32.24	100.00	0.32	0.00
	250 mM NaCl	208.62	2500.00	0.08	0.00
	25 mM EDTA	245.32	500.00	0.49	0.00
	0,5% SDS	161.47	1000.00	0.16	0.00
	Isopropanol 96% frío	105.33	1000.00	0.11	0.03
Solución lavada	Etanol 70 % frío	22.54	1400.00	0.02	0.03
Solución resuspensión	Agua Ultrapure	57.19	1000.00	0.06	0.00
Material desechable	Puntas de 20-200	7.39	1000.00	0.01	0.01
	puntas de 100-100	8.62	500.00	0.02	0.09
	Tubos ependorft	16.17	500.00	0.03	0.06
				SUMA	0.2306933

Anexo 4

Detalle del costo de los componentes del protocolo CTAB

CTAB	Detalles	Precio \$	Cantidad gr	Valor/gr	Valor/muestra
Tampón extracción	Tris-HCl 100 mM	32.24	100.00	0.32	0.00
	NaCl 1,4 M	208.62	2500.00	0.08	0.00
	EDTA 20 Mm	245.32	500.00	0.49	0.00
	CTAB al 2 %	600.00	5000.00	0.12	0.00
	β-mercaptoetanol	128.10	1000.00	0.13	0.00
Solución de extracción	Cloroformo	219.60	2500.00	0.09	0.04
	Alcohol isoamílico	109.42	500.00	0.22	0.00
Solución de precipitación	Etanol 95	22.54	1000.00	0.02	0.00
	Etanol 76	22.54	1400.00	0.02	0.01
Solución de lavado	Acetato de sodio	30.84	500.00	0.06	0.01
Solución resuspensión	ultrapura	57.19	1000.00	0.06	0.00
	Puntas de 20-200	7.39	1000.00	0.01	0.01
Material desechable	puntas de 100-100	8.62	500.00	0.02	0.09
	Tubos ependorft	16.17	500.00	0.03	0.06
				SUMA	0.236266147

Anexo 5

Detalle del costo de los componentes del protocolo SDS-PK

SDS-PK	Detalles	Precio \$	Cantidad gr	Valor/gr	Valor/muestra
Tampón extracción	Tris-HCl 20 mM	32.24	100.00	0.32	0.00
	NaCl 100 mM	208.62	2500.00	0.08	0.00
	EDTA 50 Mm	245.32	500.00	0.49	0.00
	20% SDS	161.47	1000.00	0.16	0.00
enzima	Proteinasa K	270.00	5.00	54.00	1.35
	Cloroformo	219.60	2500.00	0.09	0.02
	alcohol isoamílico	109.42	500.00	0.42	0.00
	fenol	56.05	25.00	2.24	0.39
Solución extracción	Cloroformo	219.60	2500.00	0.09	0.02
Solución precipitación	isopropanol	105.33	1000.00	0.11	0.03
Solución lavada	AcNa	30.84	500.00	0.06	0.00
	Etanol 70	22.54	1400.00	0.02	0.03
Solución resuspensión	ultrapure	57.19	1000.00	0.06	0.00
	Puntas de 20-200	7.39	1000.00	0.01	0.03
	puntas de 100-100	8.62	500.00	0.02	0.10
	Tubos ependorft	16.17	500.00	0.03	0.10
Material desechable				SUMA	2.075618419

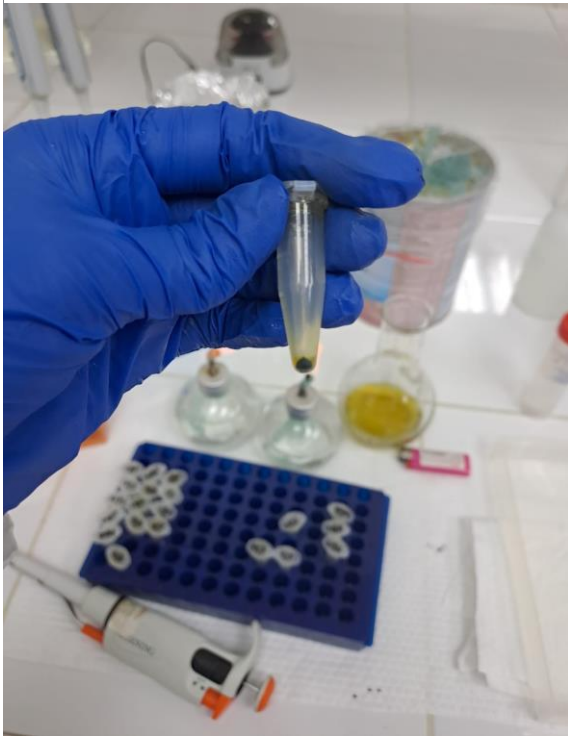
Anexo 6

Detalle de la duración de los tres protocolos.

Paso	NaCl	CTAB	SDS-PK
pre-prep		1:00:00	
Incubación	0:30:15	0:45:00	2:40:00
Centrifugación	0:10:00	0:10:00	0:20:00
Precipitación	00:45:00	00:45:00	00:45:00
Centrifugación	0:10:00	0:02:00	0:30:00
Lavado	00:40:00	0:20:00	00:40:00
Secado	00:30:00	00:30:00	00:30:00
Manipulación	00:30:00	00:30:00	00:30:00
Total	3:15:15	4:02:00	5:55:00

Anexo 7

Formación de pellet después de la precipitación de ADN con el protocolo NaCl



Anexo 8

Realización práctica del trabajo de investigación. Extracción de ADN



Anexo 9

Realización de electroforesis. Carga de muestras.

