

IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS EN AGUAS RESIDUALES TRATADAS POR PCR



SANTOS SAÚL SALDAÑA CHÁVEZ

ASESOR: CRISTÓBAL ALDAMA AGUILERA.

COASESOR: SAÚL ENRIQUE ESCOTO CHÁVEZ.



23/06/2016

CONTENIDO.

- Introducción
- Antecedentes
- Justificación
- Objetivos
- Metodología
- Resultados y discusión
- Bibliografía

INTRODUCCIÓN

- El aumento de la población ejerce una presión sobre los recursos naturales.
- El tratamiento de aguas residuales y su potencial reúso es de vital importancia.



Fotografía de parte de la ciudad de San Luis Potosí

Fuente: Maricela Rojo Cruz, 2006



ANTECEDENTES

NORMA OFICIAL MEXICANA **NOM-001-SEMARNAT-1996**, QUE ESTABLECE LOS LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE CONTAMINANTES EN LAS DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES EN AGUAS Y BIENES NACIONALES.

LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES PARA CONTAMINANTES BÁSICOS																				
PARÁMETROS	RÍOS						EMBALSES NATURALES Y ARTIFICIALES				AGUAS COSTERAS						SUELO		HUMEDALES NATURALES (B)	
(miligramos por litro, excepto cuando se especifique)	Uso en riego agrícola (A)		Uso público urbano (B)		Protección de vida acuática (C)		Uso en riego agrícola (B)		Uso público urbano (C)		Explotación pesquera, navegación y otros usos (A)		Recreación (B)		ESTUARIOS (B)		Uso en riego agrícola (A)			
	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.
Temperatura °C (1)	N.A.	N.A.	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	N.A.	N.A.	40	40
Nitrógeno Total	40	60	40	60	15	25	40	60	15	25	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	15	25	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Fósforo Total	20	30	20	30	5	10	20	30	5	10	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	5	10	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

Las microalgas son altamente eficientes en la fijación de CO₂ y utilización de la energía solar para producir biomasa. Para su desarrollo requieren además, **nitrógeno**, **fósforo**, potasio, magnesio y otros nutrientes menores.

Norma Oficial Mexicana **NOM-002-SEMARNAT-1996**, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.

Norma Oficial Mexicana **NOM-003-SEMARNAT-1997**, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.

➡ No consideran N ni P

ANTECEDENTES

Table 1. Physical and chemical characterization of bulk water samples

	Sample date	Water temperature	pH	Dissolved oxygen*	Total nitrogen*	Total phosphorous*	Total organic carbon*	Algal bloom status
LaBonte Lake	May 12	15.6	8.9	3.7	2.8	0.3	14	Prebloom
	June 2	12.7	8.7	2.8	1.5	0.2	13	
	June 16	17.0	9.0	4.8	1.2	0.2	18	Algal bloom
	July 16	24.9	9.3	11.2	1.3	0.2	10	
	July 28	21.1	9.2	8.3	1.8	0.2	14	
	June 28	24.4	9.7	10.4	1.8	0.2	14	
	August 3	21.8	8.7	4.4	1.6	0.4	13	
	August 17	15.9	7.9	2.2	1.4	0.4	13	
	August 31	18.4	7.4	5.0	4.0	0.5	20	
	September 14	12.8	7.2	1.2	2.5	0.6	18	
	September 28	11.8	8.4	4.3	1.9	0.4	23	Postbloom
								Algal bloom
Rock Lake	July 9	20.6	8.5	8.2	1.1	0.1	10	
	July 21	31.9	8.4	8.4	3.3	0.1	15	
	August 4	16.3	8.0	4.3	3.5	0.1	12	

Con poco N y P hay proliferación de microalgas

*Values in mg L⁻¹.

En ambientes o ecosistemas acuáticos se ha documentado la proliferación de microalgas a concentraciones de nitrógeno total de 1.2 ppm y de fósforo total de 0.2 ppm [Steven et al., 2012].

ANTECEDENTES

Aguas tratadas del Potosí

Vista panorámica de la planta



Leyenda

- Dentro de estos cuerpos de agua con P y N proliferan las algas, pueden llegar a deteriorar la calidad del agua, variando el pH, color, turbidez, olor y sabor, además de dañar las tuberías por donde corre el agua.
- Las cianobacterias llegan a producir toxinas que afectan a la salud (silvestre y/o humana).

ANTECEDENTES



- Una opción es el uso de dispositivos como el LG SONIC para el Control ultrasónico de algas.
- El Aparato tiene una configuración con la posibilidad de cambiar el programa ultrasónico según los tipos de algas (especies).

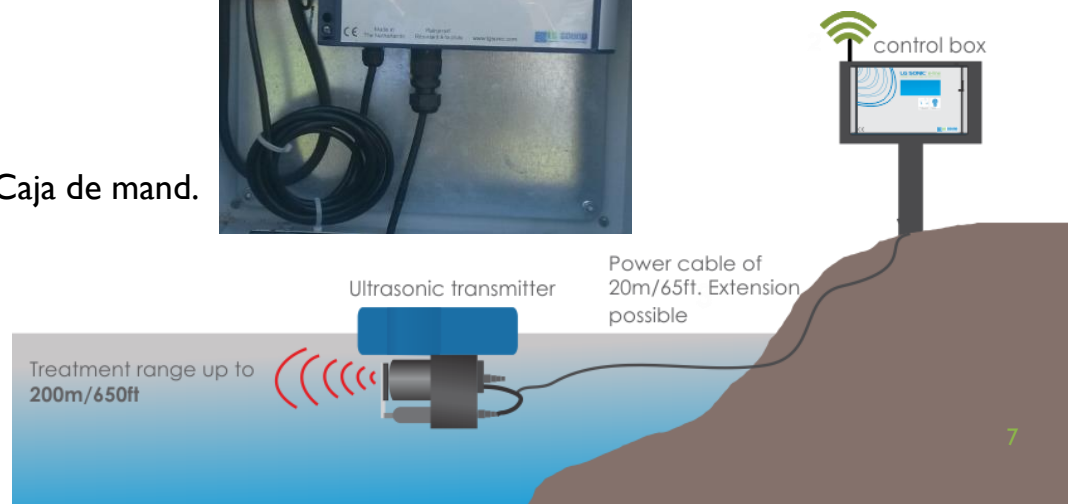
No se conocen las especies presentes



LG SONIC e-line



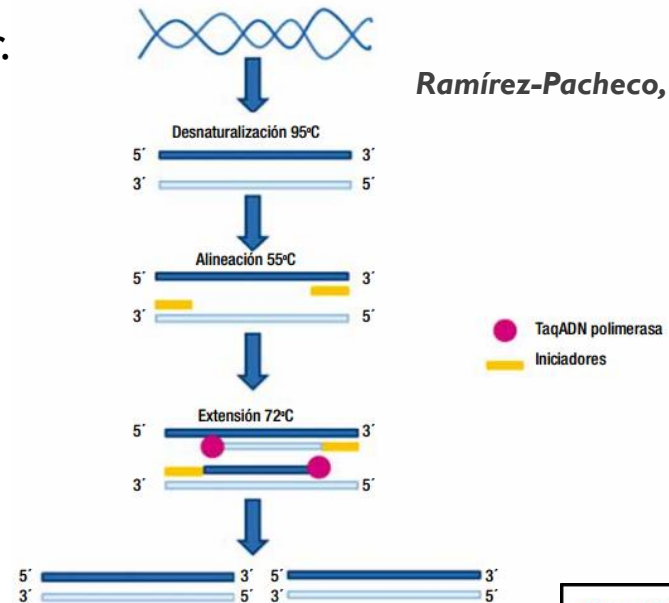
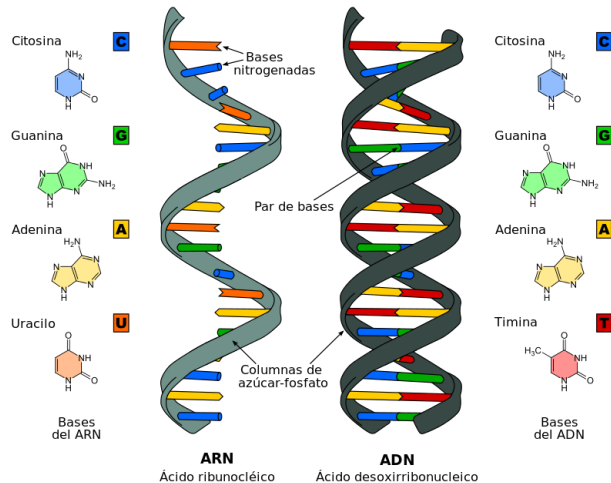
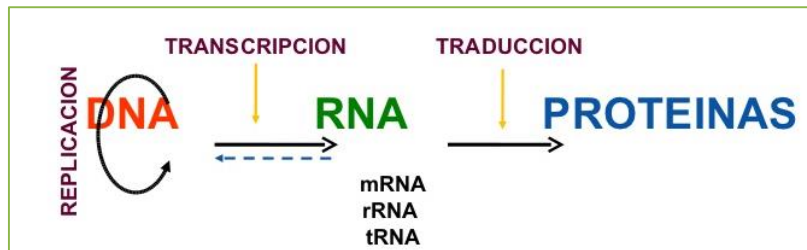
Caja de mand.



ANTECEDENTES

TÉCNICA DE BIOLOGÍA MOLECULAR

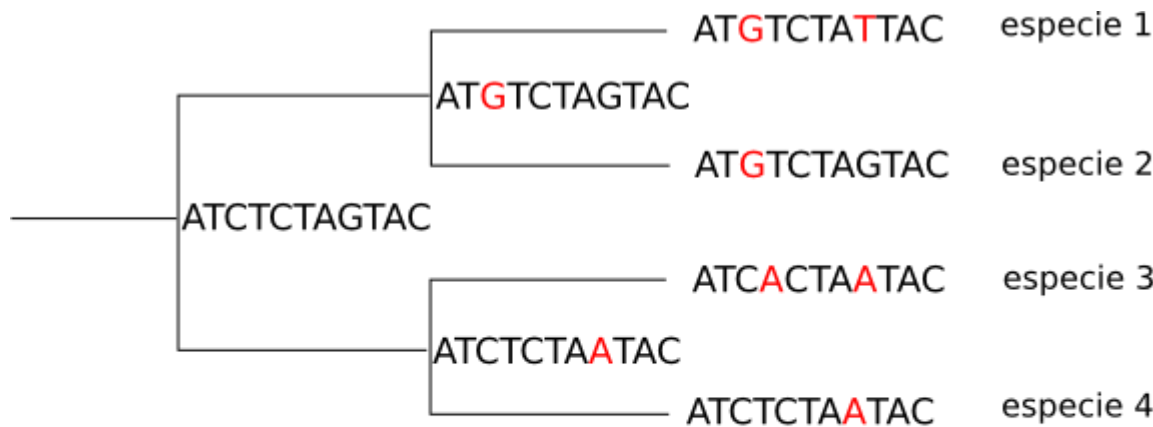
- Siguiendo el dogma de la biología molecular.



Ramírez-Pacheco, 2013

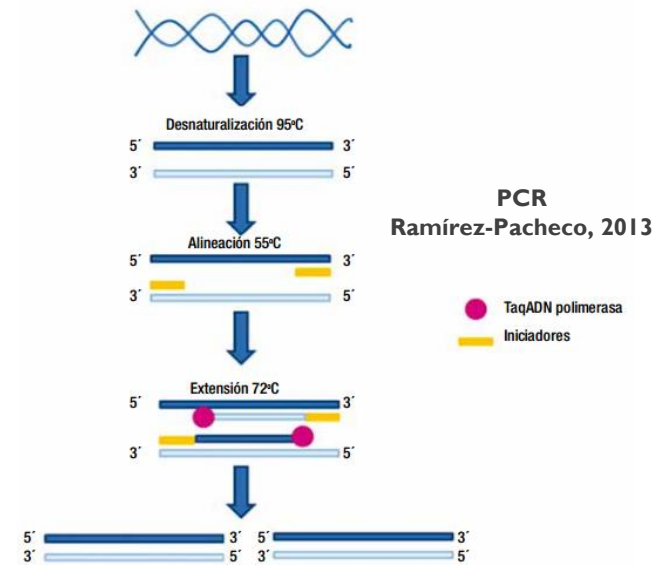
GATTTAAAGCGCGTATTA
GACAGATACAGATTTTAA
GTAGACATAGGACATATG
CGCGTCAGATTATGCCCTT
AAAGCGCCCCGTAGACG
GACAGATACAGATTTAGG
GCTCAGATTCAGATATGC
TGCCGATTTAGCATAGGG
GACGATTCGATTCGGTTA

JUSTIFICACIÓN



A partir de una especie se pueden formar varias, lo que se refleja en la secuencia de nucleótidos (cientos o miles de años)

tiempo



Las técnicas moleculares, sobre todo aquellas basadas en amplificación por PCR y comparación de secuencias, se han incorporado a la caja de herramientas de los estudiosos de las ciencias naturales.

Estudios de la biodiversidad, la evolución, la taxonomía y la conservación de especies.

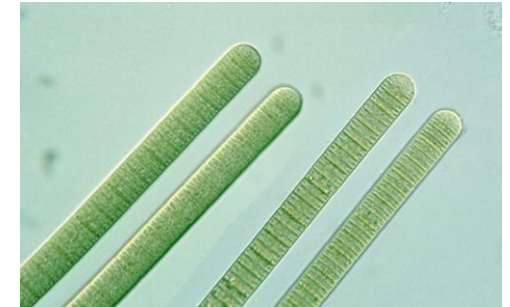
GATTTAAAGCGCGTATTA
GACAGATACAGATTTTAA
GTAGACATAGGACATATG
CGCGTCAGATTATGCCCTT
AAAGCGCCCCGTAGACG
GACAGATACAGATTTAGG
GCTCAGATTCAGATATGC
TGCCGATTTAGCATAGGG
GACGATTCGATTGGTTA

JUSTIFICACIÓN

- La identificación convencional mediante morfología y compatibilidad sexual requiere de estudios especializados y ficólogos expertos.
- La biología molecular y el uso de iniciadores (primers) universales y su posterior análisis filogenético representan herramientas confiables y rápidas para la identificación.



Anabaena sp,
Aphanizomenon sp.



Oscillatoria sp.



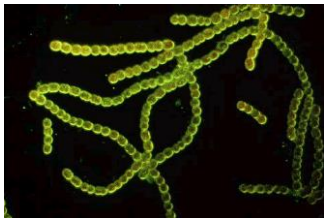
Cylindrospermopsis sp.

Fuente: Roset J, (2001)

JUSTIFICACIÓN

PRIMERS (INICIADORES) UNIVERSALES.

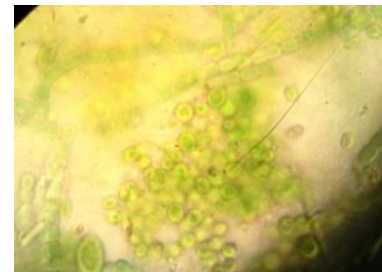
Primers en la región 16s, se han usado para el estudio del grupo de cianobacterias. (Nübel, 1997)



Primers en la región 18s, se han usado para el grupo de Algas verdes. (Hamby, 1988)



Primers en la región 23s, gran rango de amplificación, incorporando desde cianobacterias, algas verdes, algas rojas y algas cafés. (Sherwood, 2007)



Fuente: Maricela Rojo Cruz, 2006

OBJETIVOS

Objetivo general.

- Tipificar mediante técnicas moleculares las microalgas presentes en medios acuosos.

Objetivos particulares.

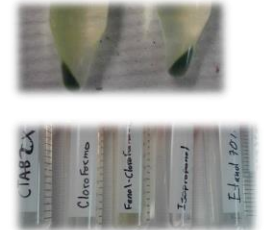
- Estandarizar la metodología de extracción de DNA a partir de muestras de microalgas recolectadas en aguas residuales.
- Amplificar la región 23S ribosomal de las muestras de microalgas.
- Comparar la secuencia de la región amplificada con las depositadas en bases de datos.

METODOLOGÍA



Recolección

Extracción



Electroforesis en gel

Cuantificación

Amplificación



Electroforesis en gel

Secuenciación LANBAMA



Extracción:

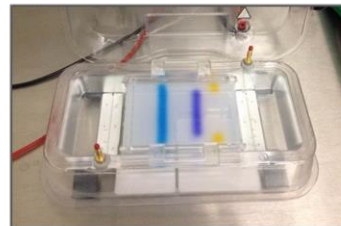
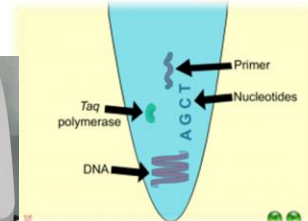
- Centrifugación de muestras para sedimentar las microalgas (10,000 rpm - 2 min)
- Lisis celular (extracción de DNA con buffer CTAB 2X y termoblock a 65°C - 1 h.
- Centrifugación para sedimentar DNA (12,000 rpm – 10 min)

Amplificación

- Termociclador con gradiente de temperatura de 55 a 62 °C. (supermix con anti DNA taq-polimerasa, Mg²⁺, dNTPs, DNA taq-polimerasa, y Primers P23SrV_f y P23SrV_r).

Electroforesis en gel

- Agarosa al 2% (EtBr), productos de amplificación, marcadores de peso molecular y colorantes en cámara a 90V – 60 min.



RESULTADOS

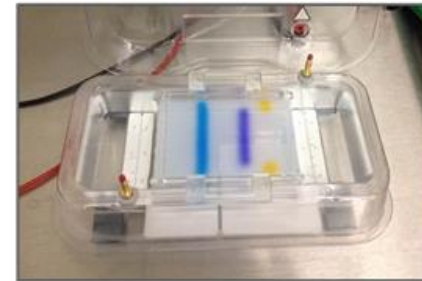


Los resultados de la extracción fueron positivos, con el método de CTAB 2x. La cuantificación se realizó por el método estandarizado de espectrofotometría, a 260 nm para detección de DNA y 280 nm para detección de proteínas. La integridad se verificó por medio de electroforesis en gel.



Resultado de cuantificación

Muestras	OD _{260/280}	Concentración de DNA (ng/μl)
"23-02" 1	1.1	300
"25-03" 2	1.09	460
"23-02 ta"3	1.05	215



Extracción:

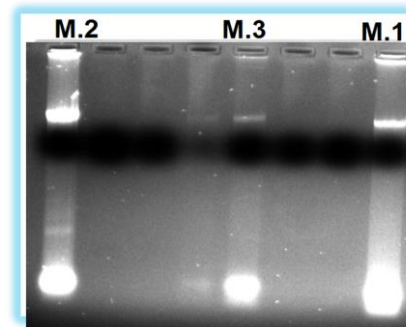
- Centrifugación de muestras para sedimentar las microalgas (10,000 rpm - 2 min)
- Lisis celular (extracción de DNA con buffer CTAB 2X y termoblock a 65°C - 1 h.
- Centrifugación para sedimentar DNA (12,000 rpm – 10 min)

Cuantificación Espectrofotómetro UV-Vis

Electroforesis en gel

- Agarosa al 2%, (EtBr), productos de amplificación, marcadores de peso molecular y colorantes en cámara a 90 V – 60 min.
- Fotodocumentador ENDURO

Resultado de integridad.



RESULTADOS.

Programas de temperaturas.

Programa térmico	Temperatura	Tiempo
I ciclo	94 °C	2.5 minutos
	94 °C	20 segundos
35 ciclos	55-62 °C	20 segundos
	72° C	50 segundos
I ciclo	72° C	6 minutos
	4° C	∞



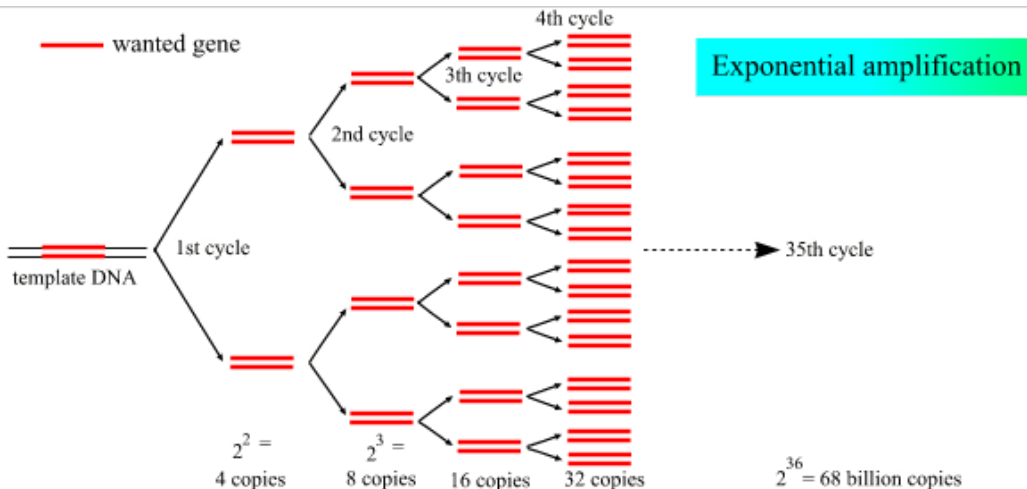
Extracción:

- Centrifugación de muestras para sedimentar las microalgas (10,000 rpm - 2 min)
- Lisis celular (extracción de DNA con buffer CTAB 2X y termoblock a 65°C - 1 h.
- Centrifugación para sedimentar DNA (12,000 rpm – 10 min)

Amplificación

- Termociclador con gradiente de temperatura de 55 a 62 °C. (supermix con anti DNA taq-polimerasa, Mg²⁺, dNTPs, DNA taq-polimerasa, y Primers P23SrV_f y P23SrV_r).

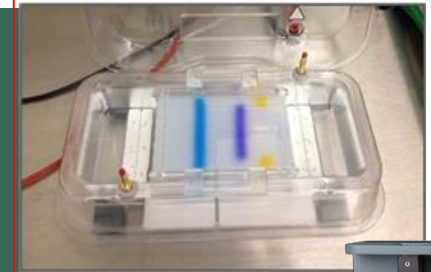
15



RESULTADOS

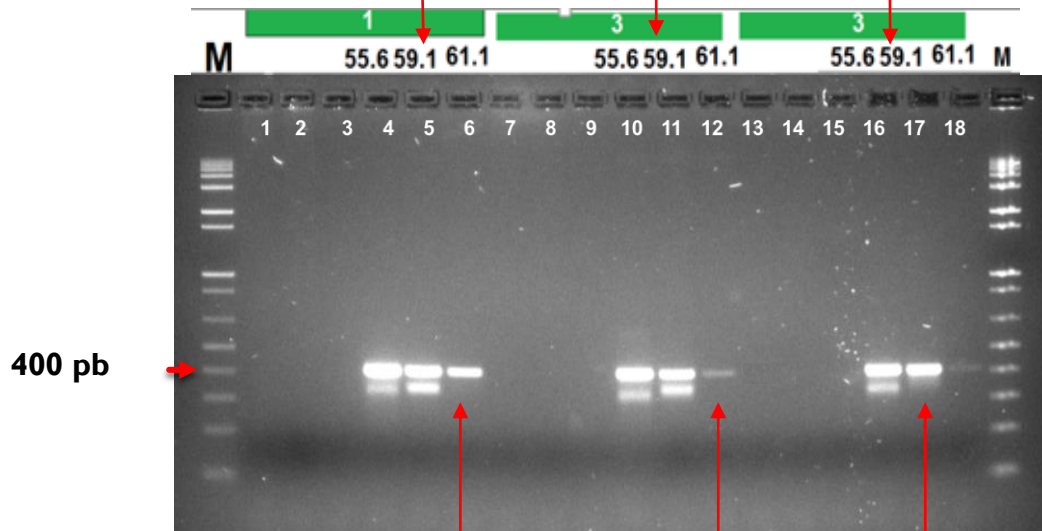
Electroforesis en gel

- Agarosa al 2%, (EtBr), productos de amplificación, marcadores de peso molecular y colorantes en cámara a 90V – 60 min.
- Fotodocumentador ENDURO

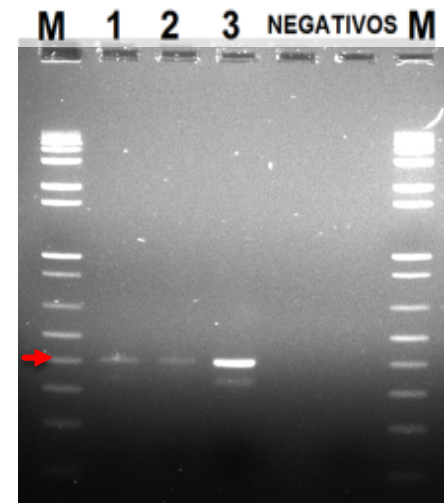


Productos de amplificación de alrededor de 400 pb, similar a lo reportado por Sherwood (2007).

Temperaturas de polimerización



400 pb



Carriles 1, 2 y 3: muestras.
Carriles 4 y 5: controles negativos.
M = marcadores de peso molecular

A **61.1°C** se observa una sola banda cercana a 400 pb.
Los pozos 1, 2, 3 - 7, 8, 9 - 13, 14 y 15 son controles negativos.
Pb= pares de bases



RESULTADOS

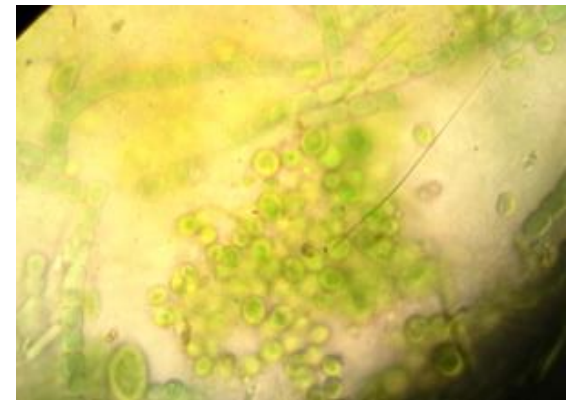


SEQUENCING

- Se envió el producto de amplificación al LANBAMA (IPCyT),

Ejemplo de la secuenciación de unos de los productos de amplificación:

```
TTCACTGGGGAATGGAGATCGGGCTTTTCTTGCGCAGTCTAGGT
GGGAGGCGTTGAAGGTTTCCTTCCGGGGAAATTGGAGCCATCA
GTGAGAGACCACTCTGGGAAGGCTAGAATTCTAATGGTGTTCCT
TCTATCAGGACACTTGACAGTTTCAGATTGACAGTTTATCTGGGG
CGGATGCCTCATAAAAAGTAACTGAGGCGTGCAAAGGTTCCCTC
AGTCTGGACGGAAATCAGACATTGAGTGTAAGGCAAAAGGGA
GCTTGACTGCAAGACCTACAAGTCGAGCAGGAACGAAAGTTGG
CCTTAGTGATCCGACGATGCCGTGTGGAAGGGTCGTCGCTCAA
CGGATAAAAGTTACTCTAGGGATAACAGGCTGAAA
```



Los resultados obtenidos del análisis de secuenciación fueron analizados mediante la herramienta BLAST de nucleótidos de la base de datos mundial de NCBI.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Mychonastes homosphaera strain CAUP H6502 chloroplast, complete genome	660	1320	96%	0.0	99%	KT199249.1
☐	Mychonastes jurisii culture-collection SAG:37.98 chloroplast, complete genome	660	1320	96%	0.0	99%	KT625411.1
☐	Scenedesmus sp. AS-F-7-1 plastid partial 23S rRNA gene, strain AS-F-7-1	542	542	97%	3e-150	93%	HE717104.1
☐	Acutodesmus obliquus strain SA1 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	532	532	97%	2e-147	92%	KC733763.1
☐	Chromochloris zofingiensis strain UTEX 56 chloroplast, complete genome	527	1054	96%	7e-146	92%	KT199251.1
☐	Uncultured Bracteacoccus clone HM1 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	523	523	94%	9e-145	93%	JX877604.1
☐	Pseudomuriella schumacherensis strain SAG 2137 chloroplast, complete genome	521	1043	95%	3e-144	92%	KT199256.1
☐	Uncultured Chlorococcum clone HM2 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	521	521	94%	3e-144	93%	JX877605.1
☐	Bracteacoccus minor strain UTEX 66 chloroplast, complete genome	520	1040	94%	1e-143	93%	KT199253.1
☐	Bracteacoccus giganteus culture-collection UTEX:1251 chloroplast, complete genome	520	1040	94%	1e-143	93%	KT625421.1
☐	Bracteacoccus aerius strain UTEX 1250 chloroplast, complete genome	514	1028	94%	5e-142	92%	KT199254.1
☐	Scenedesmus obliquus strain UTEX 393 chloroplast, complete genome	514	1028	97%	5e-142	91%	DQ396875.1
☐	Chlamydomonas starrii chloroplast large subunit ribosomal RNA (rrnL) gene	514	514	97%	5e-142	91%	L43504.1
☐	Chloroplast Chlamydomonas starrii rrnL gene, exon 1	514	514	97%	5e-142	91%	X68889.1
☐	Scenedesmus sp. FSP 3 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid	512	512	95%	2e-141	92%	GU939613.1
☐	Chlorotetraedron incus strain SAG 43.81 chloroplast, complete genome	508	1017	97%	3e-140	91%	KT199252.1
☐	Chlorococcum echinozygotum clone DA1 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid	508	508	97%	3e-140	91%	JX839832.1
☐	Chlamydomonas zebra chloroplast large subunit ribosomal RNA (rrnL) gene	508	508	97%	3e-140	91%	L43356.1
☐	Chlamydomonas ivengarii chloroplast large subunit ribosomal RNA (rrnL) gene	508	508	97%	3e-140	91%	L43354.1
☐	Chloroplast Chlamydomonas zebra rrnL gene, exon 1	508	508	97%	3e-140	91%	X68919.1
☐	Chloroplast Chlamydomonas ivengarii rrnL gene, exon 1	508	508	97%	3e-140	91%	X68885.1

Los resultados obtenidos del análisis de secuenciación fueron analizados mediante la herramienta BLAST de nucleótidos de la base de datos mundial de NCBI.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 100[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☒	Monoraphidium sp. KML6 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	340	340	91%	1e-89	84%	KF805722.1
☒	Mychonastes homosphaera strain CAUP H6502 chloroplast, complete genome	339	678	92%	4e-89	83%	KT199249.1
☒	Mychonastes jurisii culture-collection SAG:37.98 chloroplast, complete genome	333	667	92%	2e-87	83%	KT625411.1
☒	Chromochloris zofingiensis strain UTEX 56 chloroplast, complete genome	327	655	91%	8e-86	83%	KT199251.1
☒	Ankistrodesmus sp. 1 AS-2014 voucher ARS06762 0000 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	316	316	87%	2e-82	83%	KM676721.1
☒	Pleodorina starrii plastid, complete genome	316	633	91%	2e-82	83%	JX977846.1
☒	Gonium pectorale chloroplast DNA, complete genome, isolate: K3-F3-4	316	633	91%	2e-82	83%	AP012494.1
☒	Chlamydomonas reinhardtii strain CC-503 cw92 mt+ 23S ribosomal RNA (rrnL) gene, partial sequence; chloroplast	311	311	91%	8e-81	82%	FJ436973.1
☒	Chlamydomonas reinhardtii strain CC-2290 S1 D2 mt- 23S ribosomal RNA (rrnL) gene, partial sequence; chloroplast	311	311	91%	8e-81	82%	FJ436972.1
☒	Chlamydomonas reinhardtii strain CC-503 cw92 mt+ chloroplast, complete genome	311	622	91%	8e-81	82%	FJ423446.1
☒	TPA: Chlamydomonas reinhardtii chloroplast, complete genome	311	622	91%	8e-81	82%	BK000554.2
☒	Chlamydomonas zebra chloroplast large subunit ribosomal RNA (rrnL) gene	311	311	91%	8e-81	82%	L43356.1
☒	Chloroplast Chlamydomonas zebra rrnL gene, exon 1	311	311	91%	8e-81	82%	X68919.1
☒	Chloroplast Chlamydomonas gelatinosa rrnL gene	311	311	91%	8e-81	82%	Z15151.1
☒	C. reinhardtii plastid DNA for 7S, 3S and 23S rRNA	311	311	91%	8e-81	82%	X16686.1
☒	Pseudomuriella schumacherensis strain SAG 2137 chloroplast, complete genome	305	611	91%	4e-79	82%	KT199256.1
☒	Chlamydomonas reinhardtii 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	305	305	91%	4e-79	82%	JX877624.1
☒	Scenedesmus sp. AS-F-7-1 plastid partial 23S rRNA gene, strain AS-F-7-1	305	305	91%	4e-79	82%	HE717104.1
☒	Volvox carteri f. nagariensis strain UTEX 2908 plastid, partial genome	305	611	91%	4e-79	82%	GU084820.1
☒	Chlamydomonas reinhardtii strain TMCC8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	300	300	91%	2e-77	82%	KP259886.1
☒	Ankistrodesmus stipitatus chloroplast large-subunit ribosomal RNA (rrnL), site-specific DNA endonuclease I-AstI gene	300	300	92%	2e-77	82%	L42984.1
☒	Ankistrodesmus sp. GMM1 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	300	300	92%	2e-77	82%	L42984.1

Los resultados obtenidos del análisis de secuenciación fueron analizados mediante la herramienta BLAST de nucleótidos de la base de datos mundial de NCBI.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Monoraphidium sp. KM6 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	340	340	91%	1e-89	84%	KF805722.1
☐	Mychonastes homosphaera strain CAUP H6502 chloroplast, complete genome	339	678	92%	4e-89	83%	KT199249.1
☐	Mychonastes jurisii culture-collection SAG:37.98 chloroplast, complete genome	333	667	92%	2e-87	83%	KT625411.1
☐	Chromochloris zofingiensis strain UTEX 56 chloroplast, complete genome	327	655	91%	8e-86	83%	KT199251.1
☐	Ankistrodesmus sp. 1 AS-2014 voucher ARS06762 00002 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	316	316	87%	2e-82	83%	KM676721.1
☐	Pleodorina starrii plastid, complete genome	316	633	91%	2e-82	83%	JX977846.1
☐	Gonium pectorale chloroplast DNA, complete genome, isolate: K2-F3-4	316	633	91%	2e-82	83%	AP012494.1
☐	Chlamydomonas reinhardtii strain CC-503 cw92 mt- 23S ribosomal RNA (rrnL) gene, partial sequence; chloroplast	311	311	91%	8e-81	82%	FJ436973.1
☐	Chlamydomonas reinhardtii strain CC-2290 S1 D2 mt- 23S ribosomal RNA (rrnL) gene, partial sequence; chloroplast	311	311	91%	8e-81	82%	FJ436972.1
☐	Chlamydomonas reinhardtii strain CC-503 cw92 mt+ chloroplast, complete genome	311	622	91%	8e-81	82%	FJ423446.1
☐	TPA: Chlamydomonas reinhardtii chloroplast, complete genome	311	622	91%	8e-81	82%	BK000554.2
☐	Chlamydomonas zebra chloroplast large subunit ribosomal RNA (rrnL) gene	311	311	91%	8e-81	82%	L43356.1
☐	Chloroplast Chlamydomonas zebra rrnL gene, exon 1	311	311	91%	8e-81	82%	X68919.1
☐	Chloroplast Chlamydomonas gelatinosa rrnL gene	311	311	91%	8e-81	82%	Z15151.1
☐	C. reinhardtii plastid DNA for 7S, 3S and 23S rRNA	311	311	91%	8e-81	82%	X16686.1
☐	Pseudomuriella schumacherensis strain SAG 2137 chloroplast, complete genome	305	611	91%	4e-79	82%	KT199256.1
☐	Chlamydomonas reinhardtii 23S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	305	305	91%	4e-79	82%	JX877624.1
☐	Scenedesmus sp. AS-F-7-1 plastid partial 23S rRNA gene, strain AS-F-7-1	305	305	91%	4e-79	82%	HE717104.1
☐	Volvox carteri f. naqariensis strain UTEX 2908 plastid, partial genome	305	611	91%	4e-79	82%	GU084820.1
☐	Chlamydomonas reinhardtii strain TMCC8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	300	300	91%	2e-77	82%	KP259886.1

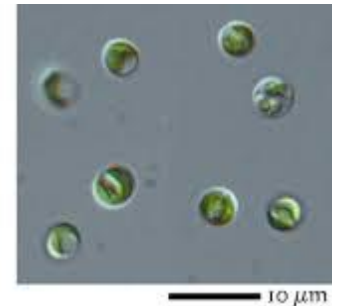
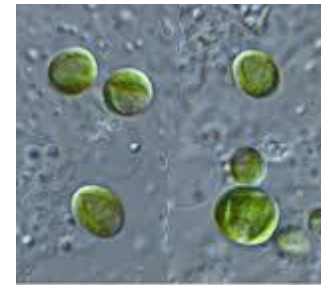
RESULTADOS

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS:



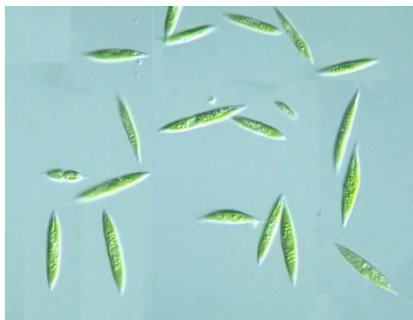
Mychonastes homosphaera (99 %)

23/febrero/2016 (raspado)



Mychonastes jurissi (83%)

25/marzo/2016 (raspado)



Monoraphidium sp (84 %)

23/febrero/2016 (tanque de almacenamiento)



CONCLUSIONES .

Se logró la estandarización de la extracción del DNA de microalgas, con el buffer de lisis CTAB 2x se obtuvieron los mejores resultados.

La estandarización de la amplificación del gen ribosomal 23S, fue mejor a una temperatura de 61.1 °C para la polimerización.

Se obtuvo el producto de amplificación esperado cercano a 400 pb.

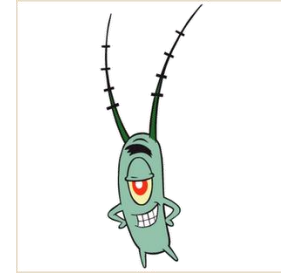
Se lograron identificar molecularmente los genes ribosomales 23S con una alta probabilidad de tres tipos de microalgas predominantes en el tanque de almacenamiento que fueron *Monoraphidium* sp. (flotando en el tanque de almacenamiento), y *Mychonastes homosphaera* y *Mychonastes jurisii* (obtenidas de raspados de una biopelícula sobre una madera que flotaba en el tanque),

Se corroborarán o descartarán las especies o géneros a través de la morfología en el microscopio óptico.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo R J, S Muñoz M J. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión, Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA)
- Alejos V L P, M C Aragón M, A Cornejo R. 2014. Extracción y purificación de ADN. En: Alejos V L P, M C Aragón M, A Cornejo R. (comps.). Herramientas moleculares aplicadas en ecología. INECC-SEMARNAT. Pp. 1-25.
- Alison R. Sherwood 2007. Universal primers amplify A 23S rDNA Plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria, J. Phycol. 43, 605–608.
- Blaire Steven, Sage McCann & Naomi L. Ward. 2012. Pyrosequencing of plastid 23S rRNA genes reveals diverse and dynamic cyanobacterial and algal populations in two eutrophic lakes. FEMS Microbiol Ecol 82: 607-615.
- Espinosa L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L., V. Souza y X. Aguirre (comps.). Ecología molecular. SEMARNAT, INECC, CONABIO, UNAM, D. F., México, pp. 517-526.
- Frederik Leliaertab, Heroen Verbruggenc, Pieter Vanormelingend, Frederique Steena, Juan M. López-Bautistab, Giuseppe C. Zuccarelloe & Olivier De Clercka. 2014. DNA-based species delimitation in algae. European Journal of Phycology, 49:2, 179-196
- Hamby, R. K., Sims, L. E., Issle, L. E. & Zimmer, E. A. 1988. Direct RNA sequencing: optimization of extraction and sequencing techniques for work with higher plants. Plant Mol. Biol. Rep. 6:179–97.
- Hou W, H. Dong, G. Li, J. Yang, M.J. Coolen, X. Liu, S. Wang, H. Jiang, X. Wu, H. Xiao. 2014. Identification of photosynthetic plankton communities using sedimentary ancient DNA and their response to late-Holocene climate change on the Tibetan Plateau. Sci. Rep., 4(6648):1-9.
- Leliaertab F, H Verbruggenc, P Vanormelingend, F Steena, J M. López-Bautista, Giuseppe C. Zuccarelloe & O De Clercka. 2014. DNA-based species delimitation in algae. European Journal of Phycology, 49:2, 179-196.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. & Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 63:3327-32.
- Ramírez-Pacheco, A. 2013. Esquema general de las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fuente, Gaceta Mexicana de Oncología Núm. 12.
- Rojo C.M. 2006. Remoción de algas presentes en aguas naturales mediante el proceso de flotación. Tesis de maestría. UNAM. 71 p.
- Rojo C.M. 2006. Remoción de algas presentes en aguas naturales mediante el proceso de flotación. Tesis de maestría. UNAM. 71 p.
- Roset J, Aguayo S, Muñoz MJ. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión, Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA)
- Sherwood A R. 2007. Universal primers amplify 23S rDNA Plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria, J. Phycol. 43, 605–608.
- Steven B, S McCann & N L Ward. 2012. Pyrosequencing of plastid 23S rRNA genes reveals diverse and dynamic cyanobacterial and algal populations in two eutrophic lakes. FEMS Microbiol Ecol 82: 607-615.

IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS EN AGUAS RESIDUALES TRATADAS POR PCR



GRACIAS POR SU ATENCIÓN