



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y**  
**CIENCIAS DEL MAR**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE**  
**INGENIERÍA PESQUERA**



**TESIS DE PREGRADO**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE**  
***Chaetoceros spp.* EN GEOTEXTILES INSTALADOS**  
**EN EL CANAL DE MAREA**  
**PUERTO RICO, TUMBES 2014**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO**  
**PESQUERO**

**PRESENTADO POR:**

**Br. Jhonny Gerson Mendoza Preciado,**

**TUMBES, PERÚ**

**2016**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y**  
**CIENCIAS DEL MAR**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE**  
**INGENIERÍA PESQUERA**



**TESIS DE PREGRADO**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE**  
 ***CHAETOCEROS* SPP. EN GEOTEXTILES**  
 **INSTALADOS EN EL CANAL DE MAREA**  
 **PUERTO RICO, TUMBES 2014**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO**  
**PESQUERO**

**PRESENTADO POR:**

**Br. Jhonny Gerson Mendoza Preciado**

**TUMBES, PERÚ**

**2016**

**RESPONSABLES**

**Br. JHONNY GERSON MENDOZA PRECIADO**

---

**EJECUTOR**

**Mg. MARCO ANTONIO ZAPATA CRUZ**

---

**ASESOR**

## **JURADO DICTAMINADOR**

Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLON

---

PRESIDENTE

DR. LEOCADIO MALCA ACUÑA

---

SECRETARIO

ING. TESSY PERALTA ORTIZ

---

VOCAL

## **AGRADECIMIENTO**

A DIOS, por su amor infinito, cuidado, fortaleza y la dicha de la vida.

Agradezco a mis familiares: Mendoza Preciado.

El apoyo a mis compañeros de estudios: quienes demostraron su colaboración desinteresada con el desarrollo de las diferentes actividades realizadas para la ejecución y culminación de la presente tesis.

A mi asesor: Mg. Marco Antonio Zapata Cruz y a los miembros del jurado calificador: Dr. Auberto Hidalgo, Dr. Leocadio Malca y Mg. Tessy Peralta Ortiz por sus observaciones y recomendaciones realizadas para mejorar el presente trabajo de investigación.

La valiosa colaboración brindada por docentes y amigos durante nuestra formación profesional: Mg. Marco A. Zapata Cruz, Mg. Jorge Carrasco Casariego, Ing. John Sandoval Ramayoni, Mg. Braulio Morán Ávila, Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, MSc. César E. Poma Sánchez, Dr. David E. Saldarriaga Yacila, Mg. Martin Amaya Ayala, Dr. Adan Alvarado Bernuy, Dr. Teodoro E. Seminario Chirinos, Dr. Leocadio Malca Acuña quienes con sus valiosas enseñanzas y su acertada orientación ayudaron considerablemente a nuestra formación profesional.

## **DEDICATORIA**

A DIOS; por su cuidado y fortaleza en nuestro diario vivir y la dicha de estar con vida.

A ustedes Juan Mendoza Dios y Delia Preciado Carrillo, quienes me brindaron, su amor, su confianza y su apoyo moral para salir adelante.

A mis abuelos Mardoqueo Mendoza, quien vive en mi memoria, Genoveva Carrillo y Teodomiro Preciado con quienes aún puedo compartir la felicidad de llegar a ser un profesional.

Jhonny Gerson Mendoza Preciado.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO .....	i
DEDICATORIA.....	ii
TABLA DE CONTENIDO .....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT .....	viii
<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>2</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.1 Material biológico.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.2 Materiales de campo.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.3 Materiales de laboratorio.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.4 Equipos.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.5 Reactivos:.....</b>	<b>8</b>
<b>3.1.6 Material de oficina.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2 Métodos.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2.1 Ubicación del lugar de ejecución.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2.2 Acondicionamiento de laboratorio.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.3 Preparación del medio de cultivo.....</b>	<b>9</b>

3.2.4	<i>Preparación del buffer de lisis CTAB (NaCl, Tris, EDTA, CTAB).</i>	10
3.2.5	<i>Preparación del buffer set (sucrosa, TRISHCLY)</i>	11
3.2.6	<i>Extracción de ADN de acuerdo al protocolo de sedimento marino.</i>	11
3.2.7	<i>Amplificación por PCR.</i>	11
3.2.8	<i>Migración en electroforesis.</i>	12
3.2.9	<i>Caracterización molecular de diatomeas.</i>	12
3.2.10	<i>Secuenciación y clasificación taxonómica.</i>	12
3.2.11	<i>Obtención de las muestras (cepas).</i>	13
3.2.12	<i>Extracción y tratamiento de las muestras.</i>	13
3.2.13	<i>Aislamiento y purificación de chaetoceros</i>	14
3.2.14	<i>Conservación de las cepas de chaetoceros.</i>	15
3.2.15	<i>Caracterización molecular de bacterias</i>	15
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	17
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	20
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	22
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	23
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	24



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Programa de Amplificación para los Primers .....	12
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Ubicación del lugar donde se desarrollaron las etapas del trabajo de laboratorio de la tesis. fuente: Google Earth 2016.....	9
<i>Figura 2:</i> Ubicación del lugar donde se colocaron los sustratos artificiales para la fijación de las cepas de las microalgas. fuente: Google Earth 2016.....	13
<i>Figura 3:</i> Extracción y tratamiento de las cepas de microalgas fijadas en los sustratos artificiales ubicados en el canal de marea de Puerto Rico de Puerto Pizarro).....	14
<i>Figura 4:</i> Aislamiento y purificación de las cepas de microalgas que se mantuvieron en tratamiento suspendidas en baldes plásticos en los ambientes del laboratorio de Microcultivos.....	15
<i>Figura 5:</i> Conservación de las cepas de <i>chaetoceros</i> aisladas y purificación en los ambientes del laboratorio de Microcultivos).....	15
<i>Figura 6:</i> Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas en desarrollo a nivel de Clase sobre los geotextiles que fueron colocados en el canal de marea de Puerto Rico, Puerto Pizarro.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

<i>Figura 7:</i> Metagenómica de muestras. Amplificación que expresa la migración de ADN genómico, en muestras extraídas en los sustratos que fueron colocados en el canal de marea de Puerto Rico, Puerto Pizarro.....	18
<i>Figura 8:</i> Metagenómica de muestras. Amplificación que expresa la migración de ADN genómico, en muestras extraídas en sustratos que fueron colocados en el canal de marea de Puerto Rico, Puerto Pizarro. ....	18
<i>Figura 9:</i> Amplificación de las diatomeas aisladas en los sustratos artificiales que fueron colocados en el canal de marea de Puerto Rico, Puerto Pizarro.....	19
<i>Figura 10:</i> Amplificación de las diatomeas aisladas en los sustratos artificiales que fueron colocados en el canal de marea de Puerto Rico, Puerto Pizarro.....	19

Aislamiento y caracterización de *chaetoceros* spp. en geotextiles instalados en el canal de marea Puerto Rico, Tumbes 2014.

Br. Jhonny Gerson Mendoza Preciado<sup>1</sup>  
Mg. Marco Antonio Zapata Cruz<sup>2</sup>

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo el aislamiento y caracterización de *chaetoceros* spp. endesarrollo sobre geotextiles del canal de marea Puerto Rico, Tumbes y aislar cepas de estas diatomeas. **Se realizó la caracterización molecularmente**, logrando una extracción de muestras completas, se seleccionó un mix de muestras de los sustratos artificiales, los que fueron colocadas en tubos de ensayo y luego fueron refrigeradas por 30 días. Y luego se extrajo su ADN con el fin **de realizar un prueba de PCR metagenómica**. La cual dio resultados negativa lo que se esperaba identificar porque la prueba identificó otras especies como bacterias **y algunas diatomeas**. Al realizar la caracterización de las microalgas fijadas en los geotextiles a nivel metagenómico dirigido al 23S resultando que el grupo prominente pertenecían a las algas verdes (70,7%) dominadas por algas unicelulares Prasinophyceae (50,4%), Trebouxiophyceae (6,8%), Pedinophyceae (4,6%) y en menor proporción por macroalgas verdes mesostigmatophyceae (8,9%). Le siguen en importancia las algas rojas Florideophyceae (13,0%), las flageladas (Euglenida 5,6%), y otras no identificadas de (10,7%) según se pudo observar (figura 6).

Palabras clave: *Chaetoceros* spp, aislamiento, caracterización y geotextil.

Tesis presentada para obtener el título profesional de Ingeniero Pesquero  
Universidad Nacional de Tumbes  
Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar  
Escuela Académica Profesional de Ingeniería Pesquera  
Calle Los Ceibos S/N Puerto Pizarro, Tumbes-Perú  
e-mail: Jhonny\_1639@hotmail.com, mzapata53@gmail.com  
Aisolation and characterization of *Chaetoceros*spp., geotextiles installed on the Tideway  
Puerto Rico, Tumbes 2014.

<sup>1</sup>Estudiante de la Escuela de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes

<sup>2</sup>Profesor Principal de la Escuela de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes.

Br. Jhonny Gerson Mendoza Preciado<sup>1</sup>  
Mg. Marco Antonio Zapata Cruz<sup>2</sup>

## ABSTRACT

The present study aimed at the isolation and characterization of *chaetoceros* spp. Under development on geotextiles of the tidal channel Puerto Rico, Tumbes and isolate strains of these diatoms. The molecular characterization was performed, obtaining a complete sample extraction, a mix of samples of the artificial substrates were selected, which were placed in test tubes and then cooled for a period of time of approximately 30 days. And then his DNA was extracted in order to perform a metagenomic PCR run. Which gave negative results to what was expected to identify because apparently the metagenomic resulted in the identification of other species as bacteria and some diatoms. In order to characterize the microalgae fixed in the geotextiles at a metagenomic level directed to 23S, the prominent group belonged to the green algae (70.7%) dominated by unicellular algae Prasinophyceae (50.4%), Trebouxiophyceae (6.8%), Pedinophyceae (4.6%) and to a lesser extent by green macroalgae mesostigmatophyceae (8.9%). Next are in importance red algae Florideophyceae (13.0%), flagellates (Euglenida 5.6%), and other unidentified (10.7%). (Figure 6).

Key words: Chaetoceros spp, isolation, characterization and geotextile

Thesis presented to obtain the professional title of Fisheries Engineer  
National University of Tumbes  
Engineering Faculty of Fisheries and Marine Sciences  
Academic Professional School of Fisheries Engineering  
Calle Los Ceibos S / N Puerto Pizarro, Tumbes-Peru  
e-mail: Jhonny\_1639@hotmail.com, [mzapata53@gmail.com](mailto:mzapata53@gmail.com)

---

<sup>1</sup>Student at the School of Fisheries Engineering of the National University of Tumbes.

<sup>2</sup>Principal Professor School of Fisheries Engineering of the National University of Tumbes.

## I. INTRODUCCION

Bajo el término de microalga se incluyen aquellos microorganismos unicelulares capaces de llevar a cabo la fotosíntesis. En esta categoría quedan agrupadas las cianobacterias (conocidas tradicionalmente como algas verdeazuladas) junto con algas eucariotas (tradicionalmente algas verdes, rojas y doradas). Las microalgas son en general organismos fotoautótrofos, es decir, obtienen la energía de la luz proveniente del Sol y se desarrollan a partir de materia inorgánica. Sin embargo, algunas especies son capaces de crecer empleando materia orgánica como fuente de energía o de carbono. Según esto, la producción de microalgas se divide en:

- a) Fotoautótrofa: las algas obtienen la energía del Sol y el carbono de compuestos inorgánicos (sales). Son a las que nos referiremos principalmente en este trabajo.
- b) Fotoheterótrofa: obtienen la energía del Sol y emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono.
- c) Mixotrófica: muchas algas son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de manera que la fuente de energía es tanto la luz como la materia orgánica. El carbono lo obtienen por tanto de compuestos orgánicos y de CO<sub>2</sub>. Algunas de estas algas son la *Spirulina platensis* o la *Chlamydomonas reinhardtii*.
- d) Heterótrofa: los compuestos orgánicos proporcionan tanto la energía como la fuente de carbono. Es decir, existen en efecto algas que pueden desarrollarse bajo ausencia de luz, como por ejemplo *Chlorella protothecoides*. La producción fotoautótrofa de algas (para uso distinto al energético) es actualmente la única técnica y económicamente viable a gran escala (Brennan y Owende 2010)

Las posibilidades de producción de fitoplancton bajo condiciones controladas en actividades acuícolas se han incrementado notablemente para suplir la demanda nutricional de organismos (especialmente en estado larvario) de importancia económica. En un

laboratorio de producción masiva de fitoplancton se mantienen los cultivos en las condiciones de luz, temperatura, pH y aireación adecuados para lograr el crecimiento óptimo de las algas. Las microalgas son organismos autótrofos que utilizan la luz solar y los nutrientes presentes en su medio para producir biomasa y oxígeno. Existe una variedad grande de microalgas que en su mayoría son unicelulares, filamentosas(Coll 1991).

## II. ANTECEDENTES

Las diatomeas bentónicas no han sido tan estudiadas, ni utilizadas en maricultura, sin embargo, al igual que las diatomeas planctónicas, poseen grandes cantidades de ácidos grasos, aminoácidos esenciales, vitaminas y proteínas. Ellas serían de gran interés para las especies cultivadas que presenten hábitos bentónicos al menos en alguna fase de su ciclo de vida (Siqueiros 1994).

Spiniello (1996), caracterizó cuatro cepas diferentes de diatomeas, utilizando medio agar agar en la siembra y combinando con diluciones sucesivas con el medio Guillar f/2.

Las diatomeas, son muy importantes entre las microalgas, se estima que su producción de biomasa equipara a la realizada en todas las selvas tropicales del mundo (Field *et al.* 1998).

Las microalgas se cultivan como alimento para larvas de crustáceos, moluscos y peces; Álvarez (2003) ha señalado que las microalgas más cultivadas en laboratorio para este fin son las pertenecientes a los géneros de diatomeas: Chaetoceros, Thalassiosira, Skeletonema, etc. y de flageladas: Tetraselmis, Isochrysis, Dunaliella, etc. Su valor nutricional depende de los factores limitantes para su crecimiento como son: la luz, nutrientes, temperatura y el pH (Tzovenis, De Pauw and Sorgeloos 1997). Chu, Phang and Goh (1996) también,han demostrado que la salinidad es un parámetro de importancia en el cultivo de microalgas.

La producción de microalgas está fuertemente relacionada con la cantidad de nitrato, fosfato y sílice disponibles en el medio y la deficiencia de uno de ellos puede ser un factor limitante (Fernández 1999).

Los microorganismos que forman parte del perifiton son fácilmente disponibles y abundantemente consumidos, siendo componente primordial de la cadena trófica. Su productividad es mayor a la del plancton. Las microalgas son el segundo grupo colonizador después de las bacterias (Romaní y Sabater 1999).

Los *Chaetoceros* son el género más grande de planctónicos marinos, diatomeas con aproximadamente 400 especies descritas. Aunque un gran número de estas descripciones no son válidas. A menudo es muy difícil distinguir entre los diferentes *Chaetoceros* especies. Varios intentos se han hecho para reestructurar este gran género en subgéneros y este trabajo está todavía en curso. Sin embargo, la mayor parte del esfuerzo por describir las especies se han centrado en las zonas boreales, y el género es cosmopolita, por lo que es probable que haya un gran número de especies tropicales aún no descritas. (Bouchard and Anderson 2001).

Dentro de las microalgas bentónicas, las diatomeas son particularmente interesantes. Tienen ciclos de vida cortos, responden rápidamente a los cambios ambientales, lo que las hacen ideales como indicadores de calidad del agua. Las formas de crecimiento sésil sobre el sustrato no les permiten evitar los contaminantes, y por lo tanto toleran el ambiente o fallecen (Hauer and Lamberti 1996; Hering et al. 2006; Wunsam, Cattaneo and Bourassa 2002). Por esta razón son consideradas como testigos más confiables de los procesos ocurridos en el sistema a comparación del plancton (Andreu and Camacho 2002).

Las diatomeas están conformadas por 290 géneros y 12 000 especies (Dawes 1991; Round et al. 1990 citados en Spiniello 1996) son cosmopolitas y se hallan formando parte del fitoplancton, fitobentos y fitoperifiton (Spiniello 1996).

López *et al* (2004). Reportaron que en laboratorios productores de postlarvas de peneidos del noroeste de México se cultivan las especies *Chaetoceros muelleri*, *C. calcitrans*, *Isochrysis* sp, *Tetraselmis suecica*, *T. chui* y *Dunaliella tertiolecta*. La producción de microalgas para la alimentación de las larvas de langostino en los laboratorios comerciales del noroeste de México está basada en un número reducido de especies. Las más importantes son las diatomeas céntricas *Chaetoceros* spp., con una concentración media cercana a  $1 \times 10^6$  cél.ml<sup>-1</sup> y con una producción de biomasa orgánica altamente variable en cada laboratorio.

El perifitones una comunidad compleja compuesta por bacterias, hongos, algas, protozoarios, nematodos, crustáceos y detritus que están adheridos a un sustrato sumergido, que puede ser orgánico o inorgánico, vivo o muerto. El perifiton juega un papel central en la fijación de carbono y el reciclaje de los nutrientes dentro de los ecosistemas acuáticos, se comporta como un excelente bioindicador de cambios ambientales y de la calidad del agua. (Azim and Wahab 2005)

Sánchez *et al.*(2009). Existen pocos trabajos que se hayan realizado acerca de determinar las especies de microalgas que constituyen el perifiton de sustratos artificiales, existen un número mayor de trabajos en los cuales sólo se ha determinado el efecto del perifiton de los sustratos sobre el crecimiento y supervivencia de langostinos, pero no determinan las especies que los constituyen. Algunos trabajos realizados al respecto se mencionan a continuación: Coutteauand Sorgeloos (1992) manifestaron que el número de especies de microalgas que se utilizan como alimento vivo para fines de acuicultura es muy limitado, y Duerr, Molnar and Sato (1998) reportaron que los géneros usados con mayor frecuencia son las diatomeas *Chaetoceros* y *Thalassiosira*, la haptofita *Isochrysis*, la eustigmatofita *Nannochloropsis* y la prasinofita *Tetraselmis*.



En el trabajo realizado sobre la metagenómica que reveló los aspectos taxonómicos y potenciales vías metabólicas de la microbiología de sedimentos de manglares. La extracción de ADN de las muestras de sedimentos y la aplicación directa de la pirosecuenciación dio como resultado aproximadamente 215 Mb de datos de cuatro áreas distintas de manglares (BrMgv01 a 04) en Brasil. Los enfoques taxonómicos aplicados revelaron la dominancia de Deltaproteobacteria y Gammaproteobacteria en las muestras. Paired análisis estadístico mostró mayores proporciones de grupos taxonómicos específicos en cada conjunto de datos. La reconstrucción metabólica indicó la posible aparición de procesos modulados por las condiciones prevalentes encontradas en los sedimentos de manglar. (Andreote, F. D. and D. Chaves 2010)

El reciente surgimiento de los enfoques de códigos de barras, junto con los de la próxima generación de secuenciación (NGS) ha planteado nuevas perspectivas para el estudio de las comunidades ambientales. En este marco, probamos la posibilidad de obtener inventarios precisos de comunidades de diatomeas de resultados de pirosecuencia con una biblioteca de referencia de ADN disponible. Se utilizaron tres marcadores moleculares dirigidos a los genomas nucleares, cloroplastos y mitocondriales (ADNr SSU, rbcL y cox1) y tres muestras de una comunidad simulada compuesta de 30 cepas de diatomeas pertenecientes a 21 especies. En el objetivo de detectar sesgos metodológicos, una muestra se constituyó directamente a partir de los cultivos agrupados, mientras que las otras consistieron en productos de PCR agrupados. Las lecturas de NGS obtenidas por pirosecuenciación (Roche 454) se compararon primero con una biblioteca de referencia de ADN que incluía las secuencias de todas las especies utilizadas para constituir la comunidad simulada, y en segundo lugar a una biblioteca de referencia de ADN completa con una mayor cobertura taxonómica. Una asignación taxonómica estricta dio inventarios que fueron comparados con el real. Se detectaron sesgos debido a la extracción de ADN y la amplificación por

PCR que dio lugar a la detección de falsos negativos. Por el contrario, los errores de pirosecuenciación parecían generar falsos positivos, especialmente en el caso de especies estrechamente relacionadas. La cobertura taxonómica de las bibliotecas de referencia de ADN parece ser el factor más importante, junto con el polimorfismo marcador que es esencial para identificar taxones a nivel de especie. RbcL ofrece un alto poder de resolución junto con una gran biblioteca de referencia de ADN. A pesar de que necesitan mayor optimización, la pirosecuenciación es adecuada para identificar conjuntos de diatomeas y puede encontrar aplicaciones en el campo del biomonitoreo de agua dulce. (Kermarrec et al. 2013).

Vera, T. (2010) Señala que se aisló 6 cepas de diatomeas bentónicas, 5 con diluciones sucesivas y siembra en medio sólido y una por captura con micropipeta y siembra en agar. Cabe destacar que el aislamiento fue destinado a obtener cepas de diatomeas bentónicas, por lo que, se seleccionaron únicamente aquellos pocillos, (microplacas - diluciones) y aquellas colonias (siembra en agar) que presentaron este tipo de diatomeas. Durante el proceso de aislamiento, algunas diatomeas, crecieron únicamente en agar, pero con mínimo crecimiento. Considerando que uno de los objetivos planteados fue el de obtener cepas de diatomeas de interés con los medios comerciales existentes; ante tales circunstancias, este tipo de microalgas no fueron consideradas. Obtuvo cultivos de seis cepas de diatomeas aisladas, con carga bacteriana entre  $10^2$  a  $10^4$  UFC/mL y aplicando peróxido de hidrógeno (30 ppm) por 1 hora la redujo a 1 (10 - 100 UFC/mL), sin dañarse su viabilidad, las células crecieron óptimamente; por el contrario, los tratamientos con concentraciones superiores a 30 ppm no registraron crecimiento bacteriano, pero en la mayoría de los casos la viabilidad de la cepa se vio afectada.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 *Material biológico.***

Cepa de *Chaetoceros* spp.

##### ***Materiales de campo.***

2 m Fibra geotextil.

##### **3.1.2 *Materiales de laboratorio.***

- a. 20 Baldes plásticos de 10 L transparentes con tapa
- b. 36 Manguera plástica de 5 mm de diámetro.
- c. 24 Válvulas de conexión para manguera plástica de 5 mm.
- b. 36 Té, crucetas, uniones.
- c. 24 Piedras difusoras de 2 pulgadas.
- d. 10 Matraces de 250 ml, 500 ml y 100 ml.
- e. 10 Beacker de 500 ml.
- f. 10 Cajas de láminas porta objeto.
- g. 10 Cajas de láminas cubre objeto.
- h. 7 Pipetas Pasteur con punta sesgada de 01 ml.
- i. 8 Tapones de algodón.
- j. 10 Cintas masking.
- k. 5 Plumones tinta indeleble.
- l. 10 Pliegos papel aluminio.
- m. 5 Cajas Petri.
- n. 24 Filtros cónicos de 1 micrómetro y 5 micrómetros.

##### **3.1.3 *Equipos.***

- a. 1 Autoclave.
- b. 2 Microscopio compuesto.
- c. 1 Refractómetro.
- d. 1 Equipo multiusos.
- e. 4 Aireadores.
- f. 1 Estufa con rango de 120 °C a 150 °C.
- g. 1 Balanza analítica de 0,1 mg a 210 g.
- h. 3 Mechero bunsen.

#### **3.1.4 Reactivos:**

- a. 300 g de Agar agar.
- b. 1 L de medio Guillard F/2.
- c. 300 g de Bacto agar.

#### **3.1.5 Material de oficina.**

- a. 1 Millar de papel bond tamaño A-4 de 75g.
- b. 1 Memoria USB de 4 Gb.
- c. 1 Libreta de laboratorio.
- d. 3 Unidades de lapiceros. (Rojo, Azul y Negro).
- e. 5 CDS.

### **3.2 Métodos**

#### **3.2.1 Ubicación del lugar de ejecución.**

El canal de marea Puerto Rico, Tumbes 2014. Las diferentes etapas del trabajo fueron realizadas en los laboratorios de Microcultivos y Biología molecular de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicada entre las coordenadas geográficas. 03° 30' 18.45'' S, 80° 23' 35.81'' W. (Figura: 1), la etapa de colocación de los geotextiles, estos fueron ubicados en zonas colindante a la facultad.



Figura 1 Ubicación del lugar donde se desarrollaron las etapas del trabajo de laboratorio de la tesis. Fuente: Google Earth 2016

### 3.2.2 *Acondicionamiento de laboratorio*

El aislamiento y caracterización de *Chaetoceros sp.* se realizó en los laboratorios antes mencionados. Se limpió y desinfectó con hipoclorito de sodio al 5%. Para el caso de materiales de vidrio como probetas, tubos de ensayo, matraces etc. fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio en 50 ppm por 10 minutos, después se realizó un secado a temperatura ambiente, luego se envolvieron con papel kraft y se esterilizaron en seco en estufa a 150°C durante 1 hora.

### 3.2.3 *Preparación del medio de cultivo.*

**Agar-Agar.** Se preparó 23,5 g de agar agar en un litro de agua destilada purificada, luego se calentó a fuego lento y agitado suavemente hasta su completa disolución y ebullición durante 180 seg Para luego ser esterilizado en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Se dejó enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y luego se realizó una siembra de muestras en placas Petri estériles.

**Medio Guillard F/2 modificado.** Se preparó en un litro de agua destilada se preparó la solución de nitrato de sodio, disolviendo 150 g  $\text{NaNO}_3$ ; para el caso de solución de fosfatos se disolvió 10 g/L de fosfato de sodio monobásico, y para el caso de diatomeas, se empleó

una solución de silicatos con 60 g/L de metasilicato de sodio nona hidratada. El fierroFe-EDTA, se disolvió 5 g en 900 ml de agua destilada y se le añadió 1 ml de cada una de las soluciones primarias de los metales trazas, los cuales se prepararon de la siguiente forma: Sulfato cúprico pentahidratado, 0,98 g/ 100 ml; Sulfato de Zinc heptahidratado, 2,2 g / 100 ml, Cloruro de cobalto hexahidratado 1,0 g/ 100 ml; Cloruro manganoso tetrahidratado, 18 g/100 ml y molibdato de sodio, 0,63 g/100 ml, las vitaminas se prepararon de la siguiente manera: la solución de Biotina se hizo pesando 0,1 g de Biotina cristalizada, aforada a un litro de agua destilada. La solución de cianocobalina (B<sub>12</sub>) se disolvió 0.1 g/L de agua destilada. La solución de Tiamina (B<sub>1</sub>) pesando 20 mg en 100 ml de agua destilada. Para el caso de la Biotina y la (B<sub>12</sub>) se preparó tomando 10 ml de cada una de ellas, aforadas a un litro.

**AGAR TSA**(Medio tripticaseína de soya): crecimiento los *chaetoceros*.

Procedimiento:

- a) Se pesó la cantidad de 1 g /100 ml de agua esteril.
- b) se agregaron 2,0 g de NaCl por cada 100ml de agua.
- c) Se disolvió el medio en agua destilada en un matraz y fue calentado en el termo agitador hasta el punto de ebullición para que se disuelva completamente (deber quedar cristalino).
- d) Se controló el pH a  $7,3 \pm 0,2$
- e) Se esterilizo en autoclave a 120°C por 15 minutos.
- f) Se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45°C, y posteriormente se realizó la siembra.

#### **3.2.4 Preparación del buffer de lisis CTAB (NaCl, Tris, EDTA, CTAB).**

En un tubo falcón de 50 ml se diluyo 4,09 g de NaCl en 25 ml de agua destilada a 64 °C seguidamente se le adiciono 0,37 g de EDTA, 0,61 de tris y 1,0 g de CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio), estos reactivos se diluyeron de manera homogénea, luego se enrazó hasta un volumen total de 50 ml, dicha solución se mantuvo en refrigeración a -20 °C hasta ser usada en la extracción del ADN.

### ***3.2.5 Preparación del buffer set (sucrosa, TRISHCLY)***

Se colocó en un tubo falcón 45 ml se diluyo 9 g de sucrosa y 2,25 de TRISHCL y se adiciono EDTA y se enraso´ con agua destilada.

### ***3.2.6 Extracción de ADN de acuerdo al protocolo de sedimento marino.***

Se colocó 1mg de la muestra en un tubo de centrifugación de 1,5 ml que contenía 1ml de búfer SET(20% de sucrosa, 50 mM de Tris Hcly 50 Mm EDTA ph8), se llevó a congelación por una hora y se procedió a macerar, posteriormente se agito vigorosamente en vortex y se adiciono 38 µL de lisosyma (20 mg/ml) y 5 µL de Proteinasa K y 100 µL de SDS 10% (W/V en buffer Set). Las muestras se pusieron a incubar a 60°C por 30 minutos. Posteriormente se llevó a centrifugar a 10 000 g por 10 minutos.

El sobrenadante extraído fue transferido a un nuevo tubo y se le agregó un volumen igual de fenol cloroformo y alcohol isoamil (25:24:1) y se llevó a centrifugación a 10 000 rpm x 5 minutos. Debido a la cantidad de materia orgánica presente en la muestra se realizó un segundo lavado con cloroformo alcohol isoamil (24:1). El sobrenadante fue precipitado con isopropanol y/o (500 µLEtanol al 95% con 0,1vol de acetato de sodio 3M ph 5,2), y sedejó toda la noche en incubación a -4°C posteriormente el ADN fue recuperado por centrifugación a 14 000 g por 10 minutos. Se procedió a lavar con etanol al 70

% y se centrifugó(10 000 rpm)durante 5 minutos. Y dejó secar por 10 minutos a temperatura ambiente, luego fue resuspendido en 30 µL de T.E a pH 8.

### **3.2.7 Amplificación por PCR.**

Se emplearon los primers p23SrV-f1 y p23SrV-r1de 400 - 450 pb citado por (Sherwood and Presting2007).

Por cada reacción de PCR se realizó un programa de Amplificación para los Primers, con las condiciones indicadas en la tabla 1

**Tabla 1: Programa de Amplificación para los Primers**

<b>PROCESO/PRIMERS</b>	<b>p23SrV-f1 / p23SrV-r1</b>
Desnaturalización inicial	94 °C - 4 minutos
Número de ciclos	35
Desnaturalización	94°C - 45 segundos
Hibridación	58°C – 60 segundos
Polimerización	72°C - 2 minutos
Polimerización Final	72°C - 10 minutos
Conservación	04°C – 24 horas

### **3.2.8 Migración en electroforesis.**

La migración de los amplicones (15 µL) se realizó en gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron las bandas con luz ultra violeta. se comprobó los amplicones correctos, estos fueron enviados a secuenciar en la empresa Humanizing Genomics. Macrogen. Dela ciudad de New York. Estados Unidos de América.

### **3.2.9 Caracterización molecular de microalgas.**

Se identificaron con la técnica de reacción de la cadena polimerasa (PCR). Para la caracterización molecular de cepas de diatomeas aisladas del perifiton, se utilizaron protocolos y kits de amplificaciones de ADN ribosomal comerciales.

### **3.2.10 Secuenciación y clasificación taxonómica.**

Los amplicones seleccionados fueron enviados al laboratorio de Humanizing Genomics. Macrogen. En New York. Estados Unidos de América. El análisis y comparación de las



secuencias nucleotídicas obtenidas con las secuencias disponibles en los bancos genómicos se realizó con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponible online en el sitio National Center for Biotechnology Information (NCBI).

### ***3.2.11 Obtención de las muestras (cepas).***

Con el fin de lograr la fijación de diatomeas bentónicas. Se utilizaron sustratos artificiales (fibra geotextil), los que fueron ubicados en dos puntos diferentes en el canal de marea de Puerto Rico, de Puerto Pizarro, en las coordenadas geográficas: el primer punto en 3°30'27,90''S y 80°23'49,66''O y el segundo punto en 3°30'25,47''S y 80°23'49,18''O. como se observa en la (Figura: 2).



**Figura 2: Ubicación de los sustratos artificiales para la fijación de cepas de microalgas. Fuente: Google Earth 2016**

### ***3.2.12 Extracción y tratamiento de las muestras.***

Después de haber colocado los sustratos en el canal de marea, se recogieron mensualmente muestras del geotextil realizándose cortes de 3 cm<sup>2</sup> suspendidos en baldes plásticos con 500 ml de agua marina filtrada y nutrida con el mismo medio antes descrito, manteniéndose con aireación constante, luz artificial y temperatura ambiente. (Figura: 3). Se seleccionó una combinación de muestras

de los geotextiles, y se colocaron en tubos de ensayo y refrigeradas por 30 días, luego se extrajo su ADN con el fin de realizar una corrida PCR.



**Figura 3:** Extracción y tratamiento de las cepas de microalgas fijadas en los sustratos artificiales.

### ***3.2.13 Aislamiento y purificación de Cepas***

3.2.14 Se realizó utilizando técnicas: diluciones sucesivas, aislamiento en placas y aislamiento con micropipeta. Se utilizó el medio Guillard f/2 para realizar las diluciones sucesivas y aislamiento con micropipeta. El aislamiento en placas se realizará con el mismo medio, solidificado con bacto-agar a razón de 20 g/L. Los cultivos se desarrollaron a temperatura ambiente e iluminación constante, y fue purificado a través de siembras clonales sucesivas para eliminar potenciales contaminadores o contaminantes (ciliados, microalgas, etc.). Se utilizó peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y antibióticos (oxitetraciclina) para eliminar las bacterias asociadas a las

microalgas que fueron aisladas (Figura: 4).



**Figura 4:** Aislamiento y purificación de las cepas de microalgas

### ***3.2.15 Conservación de las cepas.***

Se aislaron y conservaron en tubos de ensayo en refrigeración a 4 °C. (Figura 5).



**Figura 5.** Conservación de las cepas y del medio Guillard f/2

### ***3.2.16 Caracterización molecular de bacterias***

La identificación del ADN de las bacterias encontradas en el perifiton, se procedió al igual que con microalgas, utilizando la técnica de reacción de la cadena polimerasa (PCR) amplificando selectivamente fragmentos de ADN genómicos, protocolo a nivel comercial, para finalmente almacenar a -20 °C y para asegurar la presencia del ADN se realizó la migración del material por electroforesis. La amplificación por PCR se realizó empleando juegos de primers 16S RNA, se migraron los amplicones, las bandas se visualizaron con luz ultra violeta, y una vez que se comprobaron los amplicones correctos (presencia de una sola banda y del tamaño esperado), estos se enviaron a secuenciar igual como se hizo con las microalgas.

#### IV. RESULTADOS

La caracterización de las microalgas a nivel metagenómico dirigido al 23S dio como resultado mayoritario las algas verdes (70,7%) predominando algas unicelulares Prasinophyceae (50,4%), Trebouxiophyceae (6,8%), Pedinophyceae (4,6%) y en inferior porcentaje las macroalgas verdes mesostigmatophyceae (8,9%). y las algas rojas Florideophyceae (13,0%), las flageladas (Euglenida 5,6%), y otras no identificadas (10.7%). (Figura 6).

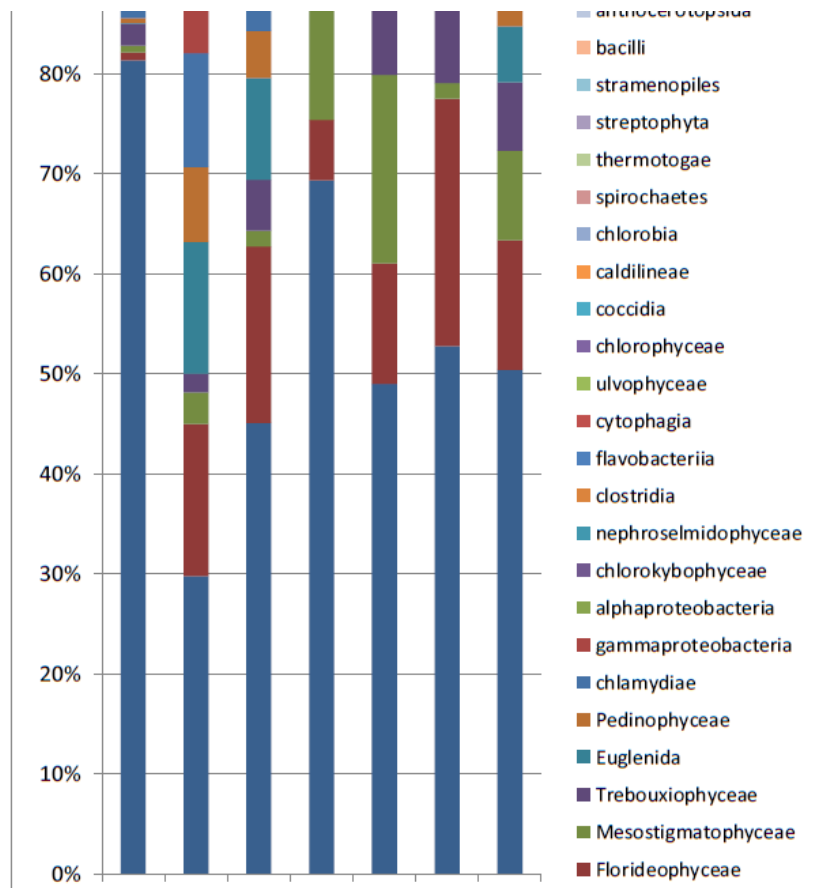
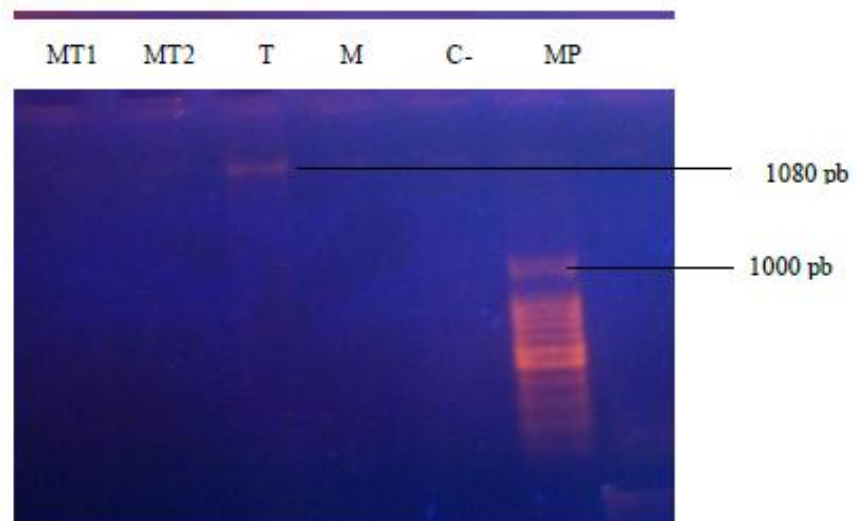


Figura 6. Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas a nivel de Clase.



**Figura 7:** Amplificación de la migración de ADN genómico, en muestras de sustratos.

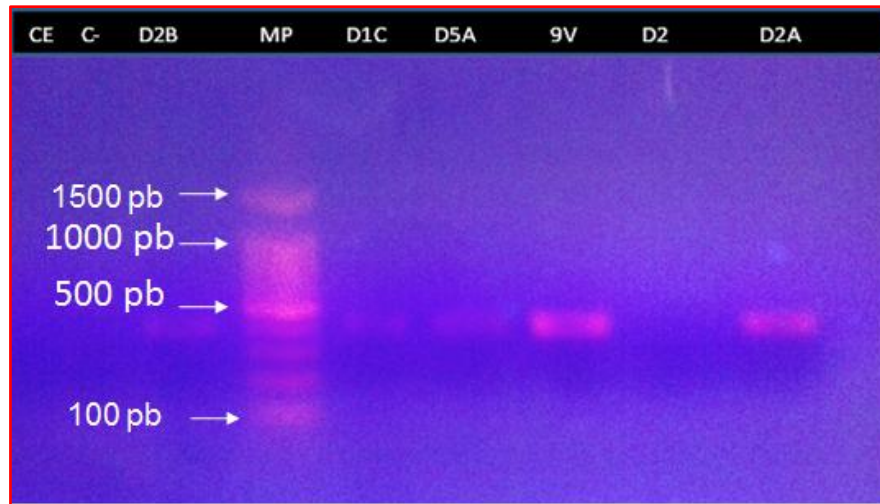


**Figura 8:** Amplificación de la migración de ADN genómico, de muestras en sustratos.

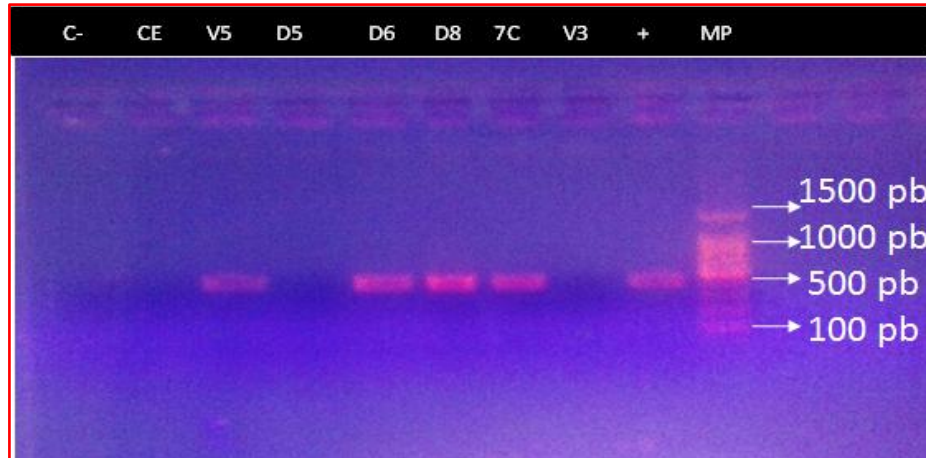
Al realizar la corrida por PCR metagenómica, dio resultados negativos respecto a la presencia de *Chaetoceros sp.* Porque dio como resultado la identificación de otros grupos como bacterias y microalgas verdes y azul verdosas como se observa en la figura 6 **XXX**.

La migración de los amplicones se corroboró por la presencia de una sola banda y del tamaño esperado, estos fueron enviados a secuenciar (Figura: 9 y 10).

La migración de los amplicones se corroboró por la presencia de una sola banda y del tamaño esperado, estos se enviaron a secuenciar.(Figura: 9 y 10).



**Figura 9.** Amplificación de las diatomeas aisladas en los sustratos artificiales, de la primera extracción de la muestra padre (MP)



**Figura 10.** Amplificación y migración de ADN de la segunda extracción de la muestra padre (MP)

## V. DISCUSIÓN

A pesar de que se indica la existencia de diatomeas y otras Microalgas en aguas y sustratos marinos, (Spiniello 1996 y Field *et al.* 1998), por la técnica de metagenómica no se pudo definir la presencia y la obtención de la diatomea *Chaetoceros* en estos ambientes, esto coincide con otros trabajos de autores que plantean la ausencia de un protocolo estandarizado para definir la presencia de diatomeas y el carácter universal del gen 23 S como lo plantea Kermarrec *et al.* (2013).

La aparente ausencia de diatomeas y específicamente *Chaetoceros* en el análisis metagenómico de la comunidad fotosintética también fue comunicado por Evans Wortley and Mann (2007) quienes al utilizar los marcadores moleculares SSU rDNA, *rbcL* and *cox1*, analizaron diatomeas puras mezcladas y amplicones de ADN por NGS, ellos confirmaron casos de falsos negativos y falsos positivos al comparar los resultados por metagenómica.

Al igual que Andreote *et al.* 2013, los resultados resaltan la presencia de una gran diversidad de organismos de la comunidad bacteriana fotosintética 17 OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales), coincidiendo también con Spiniello (1996) por las características de las bacterias y lo cosmopolitas que son las diatomeas, pero, no se confirmó la presencia de *Chaetoceros* por este procedimiento utilizado (metagenómica).



Los procedimientos utilizados para la secuenciación de las microalgas son restringidos a excepción del trabajo de Steven McCanny Ward quienes utilizaron el gen ribosomal plastídico 23 S, al igual que ¿podría usar genes identificados como código de barras de Mc Guillivary y Kaczmarska (2011), para diferenciar y caracterizar diatomeas.

Los procedimientos de caracterización y purificación de las microalgas obtenidas, coincidieron con los resultados obtenidos por Vera (2010) y Diringer et al.(2010)y Spiniello (1996).

## CONCLUSIONES

1. El protocolo de extracción y PCR utilizado y la caracterización de la diatomea *Chaetoceros sp.* no permitió alcanzar los objetivos planteados.
2. la aparente ausencia de diatomeas en los geotextiles colectados, a pesar de su presencia confirmada por las observaciones microscópicas, nos permiten plantear que la metagenómica no facilita discriminar y caracterizar la diatomea *Chaetoceros sp.* de las demás.
3. Se ha establecido un cepario con las primeras diatomeas nativas propias de las comunidades perifitónicas; realizando diluciones constantes y siembra en los medios agar agar y f/2, estas técnicas a pesar de no ser selectivas, contribuyeron favorablemente a su aislamiento pero no para su caracterización molecular.
4. Mediante la aplicación de técnicas moleculares se caracterizaron cuatro cepas de diatomeas: *Cylindrotheca closterium*, *Lithodesmium undulatum*, *Eunotia sp.* y *Asterionella formosa* respectivamente entre las cuales no se encontró *Chaetoceros sp.*
5. Aun no hay acuerdo para utilizar un gen de referencia en la taxonomía de diatomeas y caracterizarlas con precisión.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Utilizar otros genes reconocidos como código de barras, y trabajar por un protocolo estándar y/o específicos que permitan poder discriminar las diatomeas.
2. Se recomienda optimizar los protocolos de extracción y PCR, así como seleccionar marcadores suficientemente polimórfico con buena cobertura taxonómica en los bancos de datos genéticos.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez, H. 2003. *Cultivo de microalgas: Manual de uso para Acuicultura Tropical*.  
Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Andreote, F. D. and D. Chaves 2010. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. PlosOne.Org. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0038600>

Andreu, E. and A. Camacho. 2002. *Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar*. Madrid, España: Ministerio del Medio Ambiente.

Azim, M. E. and M. A. Wahab. 2005. Periphyton-based pond polyculture. In: *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. Ed. Azim, M. E., M. C. J. Verdegem, A. A. Van Dam, and M. C. M. Beveridge, 207–222. Cambridge, UK: CABI Publishing.

Bouchard, R. W. and J. A. Anderson. 2001. *Description and protocol for two quantitative periphyton samplers used for multihabitat stream sampling*. Kansas, USA: University of Kansas.

Brenan, M., Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 557-577.

- Coll, J. 1991. *Acuicultura marina animal*. 3<sup>ra</sup> edición. Madrid, España: Editorial Mundi-Prensa.
- Coutteau, P. and P. Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusks: an international survey. *Journal of Shellfish Research* 2(11): 467-476.
- Chu, W. L., S. M. Phang and S. H. Goh. 1996. Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow. *J. Appl. Phycol.* 8: 389–396.
- Duerr, E.O., A. Molnar, and V. Sato. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology*. 7: 65-70.
- Fernández, A. 1999. *Manual de diatomeas peruanas*. Trujillo, Perú: Universidad Nacional de Trujillo.
- Field, C. B., M. J. Behrenfeld, J. T. Randerson and P. Falkowski. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*. 281:237-240.
- Hauer, F. R. and Y. G. Lamberti. 1996. *Methods in streams ecology*. New York, USA: Academic Press.

- Hering, D., R. Johnson, S. Kramm, S. Schmutz, K. Szoszkiewicz and P. Verdonschot. 2006. Assessment of European streams with diatoms, macrophytes, macroinvertebrates and fish: A Comparative Metric-based Analysis of Organism Response to Stress. *Freshwater Biology*. 51:1757-1785.
- Kermarrec, L., A. Franc, F. Rimet, P. Chaumeil, J. Humbert, A. Bouchez. 2013. Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: a test for freshwater diatoms. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23590277>.
- López, E., J. Voltolina, N. Soto, L. Ortiz. 2004. Producción y composición de microalgas en laboratorios comerciales del Noroeste de México. Sinaloa-México. *Rev. Científica*. México 3(1): 11-17
- Romani, A. and S. Sabater. 1999. Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of a stream biofilm. *Freshwater Biology*. 41: 729–736.
- Schrader, K. y C. Tucker. 2003. Evaluation of diquat as a potential algicide for controlling the musty-odor-producing cyanobacterium, *Oscillatoria perornata* in catfish aquaculture ponds. *J. Appl. Aquaculture*, 14: 149-154.
- Siqueiros, D. 1994. Asociaciones de Diatomeas Bentónicas Marinas: Análisis de su estructura y aplicación. *Serie Científica* 2(1): 59-71.

Spiniello, P. 1996. Las diatomeas marino costeras de Venezuela. *Caribbean Journal of Science* 32(4): 331-347.

Sánchez, G., D. Sarno, M. Montesor, R. Siano & C. Lange. (2009). Germinación de estados de resistencia de diatomeas y dinoflagelados en sedimentos marinos de dos áreas de surgencia de Chile. *Gayana Botánica*. Chile 66(2): 38-47

Tzovenis, I., N. De Pauw and P. Sorgeloos. 1997. Effect of different light regimes on the docosahexaenoic acid (DHA) content of *Isochrysis aff. galbana* (clone T-ISO). *Aquacult. Int.* 5: 489– 507.

Vera, T. 2010. Utilización de microalgas (diatomeas bentónicas) asociadas al perifiton sobre sustratos artificiales en el sistema de cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) realizado en la estación experimental de la Camaronera Marinazul S.A. Tumbes – Perú. Tesis de Grado. Previo a la obtención del Título de: Biólogo Marino. Universidad Estatal “Península de Santa Elena” Facultad de Ciencias del Mar. Escuela de Biología Marina. Ecuador. (2010) 18

Vera, T. 2010 and Diringer et al. 2010. En cuanto a la identificación de las diatomeas cultivadas, las caracterizaciones obtenidas hasta el nivel de género.

Wunsam, S., A. Cattaneo, and N. Bourassa. 2002. Comparing diatom species, genera and size in biomonitoring: A Case Study from Streams in the Laurentians (Quebec, Canada). *Freshwater Biology*. 47: 325-340.

Turnitin

Google

https://www.turnitin.com/t\_inbox.asp?aid=72770952&lang=es&session-id=b3c1fb236d007364477d906b1965c8e9

Aplicaciones Bookmarks http://feed.snap.do/ MyFreeCams.com - # Cuentas de Google Search-Gol http://www.searchgo... Iniciar sesión Universidad Nacional (3) Facebook

Marco Antonio Zapata Cruz | Información del usuario | Mensajes | Instructor | Español | Comunidad | Ayuda | Cerrar sesión

turnitin

Ejercicios Estudiantes Bibliotecas Calendario Discusión Preferencias

ESTÁS VIENDO: INICIO > AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CHAETOCEROS SPP. EN GEOTEXILES INSTALADOS EN EL CANAL DE MAREA PUERTO RICO, TUMBES 2014 > REVISIÓN



**Acerca de esta página**

Esta es la bandeja de entrada de ejercicios. Para ver un trabajo, haga clic en el título del trabajo. Para ver un Reporte de Similitud, seleccione el icono de Reporte de Similitud del trabajo en la columna de similitud. Un icono atenuado indicará que el Reporte de Similitud no se ha generado todavía.

**revisión**

BANDEJA DE ENTRADA | ESTÁS VIENDO: TRABAJOS NUEVOS ▾

Entregar archivo Editar la configuración del ejercicio | Correo electrónico sin remitentes

<input type="checkbox"/>	AUTOR	TÍTULO	SIMILITUD	ARCHIVO	N° DEL TRABAJO	FECHA
<input type="checkbox"/>	Jhony Gerson Mendoz...	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CHAETOC...	21% 		1010291654	28-sept-2018

Derechos de autor © 1998 – 2018 Turnitin, LLC. Todos los derechos reservados.

Política de privacidad Acuerdo de Privacidad Términos de servicio Cumplimiento de la protección de datos de la UE Protección de Copyright Preguntas legales más frecuentes Centro de Ayuda

03:17 p.m. 28/09/2018