



## Utilización del Gen 18S, como marcador genético para la identificación molecular de diatomeas epilíticas

Manuel Patricio CLAVIJO-CEVALLOS <sup>\*1</sup>, Salomé Estefanía MISHQUE-CEVALLOS <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga, Ecuador.

\*E-mail: manuel.clavijo@utc.edu.ec

Enviado el: 18/06/2024; Aceptado el: 13/12/2024; Publicado el: 28/12/2024.

**RESUMEN:** El presente proyecto tuvo como objetivo principal evaluar el uso potencial del gen 18SV4 como código de barras de ADN en diatomeas epilíticas del Ecuador, evaluando y comprobando su capacidad de discriminación entre las especies y la factibilidad de usar cebadores universales. Para ello fue necesario analizar las secuencias de diatomeas epilíticas de diferentes orígenes, por medio de su alineamiento determinando la región que presenta variabilidad interespecífica, y las zonas flanqueantes que permitieron su amplificación en todas las especies. Se establecieron cultivos de diatomeas en el medio CHU # 10, para poder realizar los análisis moleculares, extracción de ADN y amplificación por PCR. Se trabajó con cultivo mixto de algas verdes y diatomeas en el que se observaron por microscopía cuatro especies de diatomeas, que fueron identificadas con el uso de guías taxonómicas. Se extrajo el ADN del cultivo por dos métodos: Protocolo de Kit de aislamiento de ADN Power Soil y el Protocolo de extracción buffer, se establecieron las condiciones para la amplificación por PCR y finalmente se realizó una DGGE que permitió separar las bandas de ADN de 3 de las 4 especies presentes en el cultivo: *Gomphonema langenula*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula cataracta-rheni* y *Nitzchia acidoclinata*.

**Palabras clave:** diatomeas epilíticas; gen 18SV4; código de barras; cebadores universales.

## Use of the Gen 18S, as a genetic marker for the molecular identification of epilithic diatoms

**ABSTRACT:** The task presented was based on evaluating the potential use of the 18SV4 gene as a DNA barcode in the epilithic diatoms of Ecuador, evaluating and verifying its ability to differentiate between species and the feasibility of using universal primers. For this, it was necessary to analyze the sequences of epilithic diatoms of different origins by analyzing their alignment, which determined the regions that presented interspecific variability and the flanking zones that allowed their amplification in all species. Diatomaceous cultures were established in the CHU # 10 culture medium to perform molecular analyses, DNA extraction and PCR amplification. A pure culture could not be obtained, so the work was carried out with a mixed culture of green algae and diatoms, in which four species of diatoms were observed under a microscope and identified using taxonomic guides. The DNA of the specific culture was extracted using two methods: The Powersoil DNA isolation kit and the extraction buffer method. PCR established the conditions for the amplification. Finally, a DGGE was made that allowed the separation of the DNA bands of 3 of the 4 species present in the crop: *Gomphonema langenula*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula cataracta-rheni* and *Nitzchia acidoclinata*.

**Keywords:** epithelial diatoms; 18SV4 gene; barcode; universal primers.

### 1. INTRODUCION

Las diatomeas son algas unicelulares de diferentes tipos de clorofila y gran contenido de óxido de silicio. Su tamaño varía entre la quinta parte de un grano de sal hasta un 1 mm, mientras que su estructura es simétrica. Estas algas microscópicas se adaptan y expanden en cualquier cuerpo de agua o superficie en condiciones de humedad (MARTÍNEZ et al., 2024). Asimismo, las diatomeas son algas microscópicas capaces de absorber cerca de la mitad de dióxido de carbono en el medio acuático y generan una quinta parte del oxígeno que se respira (ÓLAFSSON, 2019).

Las diatomeas se conocen como excelentes bioindicadores de calidad de agua debido a que estos se basan en el análisis de la variación de la comunidad de organismos que viven en los ambientes fluviales frente a alguna

perturbación (PÉREZ, 2019). El estudio de las comunidades de diatomeas es importante para determinar la calidad de agua y evaluar a evolución del ambiente. Estas se encuentran en hábitats diversas, desde mares salados hasta lugares extremadamente secos (ECURED, 2019). En Ecuador, las diatomeas son utilizadas como bioindicadores para evaluar y monitorear la calidad de los cursos de agua, especialmente para determinar la calidad de agua en grandes depósitos (AREVALO, 2018).

Debido a que las diatomeas pueden ser utilizadas como bioindicadores en procesos contaminantes su identificación precisa está basada principalmente en las características morfológicas de las frústulas de sílice para lo que se requiere una gran experiencia, habilidad en microscopía y el uso de

guías taxonómicas especializadas. Sin embargo, el uso de herramientas moleculares puede ayudar a reducir la complejidad del proceso de identificación. Para poder desarrollar y aplicar técnicas de identificación y cuantificación basadas en herramientas moleculares es necesario conocer las especies de diatomeas presentes en los sistemas acuáticos de Ecuador y obtener sus secuencias de referencia, creando una base de datos que esté disponible para todos los investigadores. En Europa existen varias iniciativas al respecto, como la base R: Systdiatom desarrollada por el INRA (Instituto Nacional Francés de Investigación en Agricultura) (RIMET et al., 2014), en la que se incluyen el nombre de las especies, fotos, puntos de muestreo, y las secuencias de referencia.

En el caso de diatomeas se han propuesto varios marcadores de ADN como candidatos para la identificación de especies, entre ellos la región hipervariable V4 del gen 18SrRNA y el gen de la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfatocarboxilasaoxigenasa (rbcL) (PAWLOWSKI et al., 2016). El principal limitante en la aplicación de estos marcadores es la falta de secuencias de referencia de diatomeas epilíticas, especialmente en el caso de Ecuador. En este sentido, se desarrolló la investigación con el objetivo de establecer la metodología para la identificación de diatomeas epilíticas basada en marcadores genéticos.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Metodología

Para este estudio, se empleó como referencia las secuencias en formato FASTA, recuperadas de la base de datos de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Posteriormente, mediante el programa UNIPROGEN se llevó a cabo un análisis y alineamiento para establecer una homología posicional. Una vez identificado el punto de muestreo, se llevó a cabo el siguiente proceso: se seleccionó una piedra de 15 a 20 cm con un sustrato de color pardo en su superficie, indicativo de la notable presencia de diatomeas epilíticas; la piedra seleccionada fue lavada con cuidado en agua destilada para eliminar cualquier rastro de residuo de tierra; la superficie de la roca se raspó con la ayuda de un cepillo de cerdas suaves, permitiendo que el sustrato de color pardo cayera en una fuente, finalmente, se recolectó 300 mL de muestra en un frasco estéril.

Para determinar el medio de cultivo más favorable al estudio, se empleó una lista de medios mencionados previamente en el documento (ANDERSEN et al., 2005). Las diatomeas epilíticas se sembraron en medios tanto líquidos como sólidos. Los cultivos se mantuvieron en un entorno iluminado continuamente durante 8 días. En los días 1, 2, 4, 6 y 8 se llevaron a cabo procedimientos de limpieza que consistieron en tomar 4 mL de muestra de cultivo líquido de diatomeas y centrifugarlos a 3000 rpm por 7 minutos, el procedimiento se repitió 4 veces. Utilizando una pipeta Pasteur, se retiraron las algas verdes de la superficie, ya que las diatomeas, al tener un cuerpo cubierto de sílice, permanecían en el fondo. Posteriormente, se observó la disminución de las algas verdes mediante un microscopio, y se sembraron en el medio de cultivo para su posterior observación bajo un microscopio invertido.

### 2.2. Métodos

Para la extracción del DNA se compararon dos métodos:

Se siguió el Protocolo de extracción buffer detallado por Edwards et al. (1991), donde se extrajo 1 mL de cada uno de los dos cultivos líquidos y se colocó aquella muestra en un tubo Eppendorf para luego someterlo a una centrifugación de 3 minutos a 4000 rpm. Posteriormente, se añadió 400  $\mu$ L de tampón de extracción y se centrifugó a 13.000 rpm durante 7 minutos para separar las proteínas, enzimas, etc. Se recogieron 350  $\mu$ L del sobrenadante y se transfirió ello a un nuevo tubo Eppendorf. Acto seguido, se añadió 300  $\mu$ L de isopropanol, y se mezcló por inversión del tubo. Tras un reposo de 2 minutos a baja temperatura, se centrifugó a 13000 rpm durante 7 minutos. Se eliminó el excedente por inversión del tubo, teniendo cuidado de no perturbar el pellet. Posteriormente, se agregó 500  $\mu$ L de Etanol al 70 %, evitando desprender el pellet, y se centrifugó a 13000 rpm durante 7 minutos. Consiguiente se eliminó el Etanol mediante inversión del tubo. Finalmente, se incorporó 50  $\mu$ L de agua esterilizada, permitiendo que el ADN se suspendiera a temperatura ambiente durante un lapso de 5 minutos.

Por otro lado, se tomó en cuenta el Protocolo de Kit de aislamiento de ADN PowerSoil, en el cual se agregó 1 mL de la muestra tomada previamente en los tubos Powerbead y se homogeneizó durante 3 segundos. Luego, se añadió 60  $\mu$ L de solución C1 y se homogenizó brevemente. Los tubos se fijaron de forma horizontal sobre la almohadilla del vortex con cinta adhesiva y se homogenizaron a máxima velocidad durante 10 minutos. Debido a que la solución C1 contiene SDS y otros agentes disruptores, el proceso de lisis celular es fácilmente adaptable.

Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 10.000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente, mientras ello el sobrenadante se transfirió a los tubos de 2 mL suministrados por el kit. Se añadieron 250  $\mu$ L de solución C2, que contiene agentes que precipitan cualquier material orgánico e inorgánico que no sea ADN, y se homogeneizaron los tubos por 5 segundos. Luego, las muestras se incubaron a una temperatura de 4°C durante 5 minutos, tras ello los tubos se centrifugaron a 10.000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Evitando el pellet, se transfirió 600  $\mu$ L de sobrenadante a otro tubo de 2 mL.

A continuación, se agregó 200  $\mu$ L de solución de C3 y se homogeneizó brevemente. Los tubos se incubaron a 4°C durante 5 minutos y se centrifugaron a 10.000 g durante un minuto a temperatura ambiente. Se transfirieron 750  $\mu$ L de sobrenadante a un nuevo tuvo de 2 mL. Luego, se añadió 1.2 mL de solución C4 y se homogeneizó durante 5 segundos. Debido a que la solución final tiene una alta concentración de sales, se facilita la unión del ADN a la membrana de sílice en el siguiente paso.

Consiguiente, se cargó 675  $\mu$ L en un filtro de centrifugación y se centrifugó a 10.000 g durante un minuto a temperatura ambiente. Se descartó además el sobrenadante que atravesó el filtro o membrana y se añadió otros 6  $\mu$ L de sobrenadante al filtro para centrifugarlo a 10.000 g durante un minuto a temperatura ambiente. El sobrenadante restante se cargó en el filtro y se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores.

Posteriormente, se añadió 500  $\mu$ L de solución C5 para lavar el ADN unido a la membrana y centrifugó a 10.000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Con mucho cuidado, el filtro se colocó en un nuevo tubo de 2 mL y se añadió 100  $\mu$ L de solución C6 a centro del filtro para diluir el ADN, seguido de una centrifugación a 10.000 g durante 30

segundos a temperatura ambiente. Finalmente, se descartó el filtro y el ADN en el tubo estaba listo para ser utilizado en los procesos siguientes.

Para la cuantificación de ADN extraído se empleó el fluorómetro Qubit 2.0. Primero, se preparó una solución 1:200 con el fluorocrometro y el buffer de medida. Se tomó 190  $\mu$ L de la solución y se mezcló con 10  $\mu$ L de la muestra a medir. Después de un reposo de 2 minutos, se procedió a la respectiva medición, obteniendo la concentración de ADN en la muestra, esta expresada en ng mL<sup>-1</sup>. En la amplificación de los genes candidatos mediante PCR se siguió el protocolo del kit Go Taq® Green Máster Mix. Las reacciones para la PCR contenían: 25  $\mu$ L Taq Green Máster Mix 2X, 1  $\mu$ L de Primer A (0,2  $\mu$ M), 1  $\mu$ L Primer B (0,2  $\mu$ M), 22  $\mu$ L Agua libre de nucleasas y 1  $\mu$ L ADN, ultimando un volumen de 50  $\mu$ L.

Para el proceso de Electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo en gel de agarosa al 1% (p/v). En principio, se disolvió 2 g de agarosa en 200 mL de TAE 1X y se incorporó 6  $\mu$ L de Bromuro de Etidio al gel para visualizar las bandas de ácido nucleico bajo luz ultravioleta. Después de solidificar el gel, se colocó en la cubeta de electroforesis y se cargaron 10  $\mu$ L de cada muestra más 1  $\mu$ L de buffer de carga. La electroforesis se realizó a un voltaje constante (110 V) en un lapso de 1 hora, seguido de la visualización de los fragmentos bajo luz ultravioleta en el transiluminador Enduro.

En la Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) se empleó el siguiente procedimiento: se lavaron los cristales con agua y jabón y además se colocó la goma amarilla alrededor del cristal con esquinas circulares, asegurando la coincidencia de las muecas de la goma con las esquinas del cristal. A continuación, se ubicaron los separadores a ambos lados del cristal, quedando completamente pegados a la goma. Adicional, se colocó el otro cristal encima y se apretó, sujetándolos con pinzas (pinzas para cristales): tres en la base y tres en cada lado para colocar la estructura en forma vertical. Luego se llenó la cubeta de gradiente con agua y se puso en marcha la bomba para llenar los cristales hasta que rebosaran. Adicional, se secó bien el interior de los cristales con papel filtro. A continuación, se realizó el gradiente del gel 40% (Low) y 60% (High) para un volumen de 13 mL. Se preparó persulfato de amonio al 10% colocando 1g de APS en 1 ml de agua destilada y se comprobó el funcionamiento de la bomba peristáltica y del agitador con los imanes. Es importante preparar todo lo antes mencionado correctamente, ya que el APS y el TEMED son polimerizantes, entonces, se debe comprobar que las válvulas de gradiente y de la cubeta estén cerradas (posición vertical y perpendicular respectivamente).

Una vez llenado la cubeta y, con las válvulas cerradas, se realizaron las mezclas en la cubeta. Después de abrir las válvulas, se colocó la aguja entre los cristales para que la mezcla cayera. Una vez lleno el espacio entre los cristales, se retiró la aguja y se pasó agua caliente por el sistema de gradiente. Luego, se colocó el peine formador de pocillos y se esperó 30 minutos hasta que el gel polimerizó. Posterior, se retiró el peine, se limpiaron los cristales y pocillos, y se llenó la cubeta con TAE 1x. Acto seguido se procedió a llenar la cubeta de DGGE con 21 L de TAE 1x. Una vez que el gel estuvo listo, se calentó la cubeta hasta alcanzar los 60°C (equivalente a 54°C en el equipo). Mientras tanto, se montó el gel en el soporte sin las pinzas, retirando la parte inferior de la goma amarilla para que esté en contacto con el buffer, y se aseguró con las pinzas de soporte. Luego, se apagó todos

los elementos del baño, y se colocó el gel en la cubeta de modo que las conexiones de soporte quedaran a la derecha. Después, con la ayuda de una pipeta con TAE 1x de la cubeta se limpió con cuidado cada pocillo de gel utilizado. Para cargar las muestras, se agregó 1  $\mu$ L de loading buffer 6x a 1  $\mu$ L de marcador molecular de 1kb. Una vez cargadas, se conectó el gel a la fuente y se llenó con TAE 1x. Se encendió nuevamente el calentador y se esperó hasta que alcanzara una temperatura de 60°C. Consiguiente, se encendió la fuente de alimentación y se la programó a 120v durante 3 horas. Por consiguiente, para la visualización de las bandas, se apagó la fuente de alimentación y el calentador, esperando a que la temperatura llegue a 0°C. Luego, se retiró el gel, escurriendo bien el TAE, y se apartó el soporte. Para separar los cristales, cada uno se lavó con agua destilada, permitiendo así que se deslicen con facilidad. Asimismo, la tinción se llevó a cabo colocando el cristal plano con el gel en una bandeja con 40  $\mu$ L de bromuro de etidio en una concentración de 10 mg/mL durante 1 hora. Para eliminar el exceso de tinte, se dejó el gel en agua destilada durante 20 minutos. Finalmente se observó el gel en el transiluminador Enduro.

### 3. RESULTS

Para la obtención de diatomeas epilíticas, se recolectaron muestras en un área no contaminada ubicada en el nacimiento del río Cutuchi, dentro del Parque Nacional Cotopaxi. Se seleccionó aquel punto en específico con la expectativa de encontrar mayor abundancia de especies de diatomeas respecto a las áreas afectas por la contaminación del río. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Punto de muestreo.

Table 1. Sampling point.

Ubicación		Coordenadas (UTM)	Elevación
Provincia	Cantón	X: 777413 E	3564m
Cotopaxi	Latacunga	Y: 9928892 N	

#### 3.1. Toma de muestras de diatomeas en la fase de campo

La Figura 1 representa los exoesqueletos de cuatro especies de diatomeas identificadas en la investigación mediante el proceso de microscopía en las muestras de cultivo. La identificación de estas especies se llevó a cabo utilizando guías de estudio previamente seleccionadas, donde se consideraron criterios como el tamaño, las estrías, el rafe y la morfología de las diatomeas.

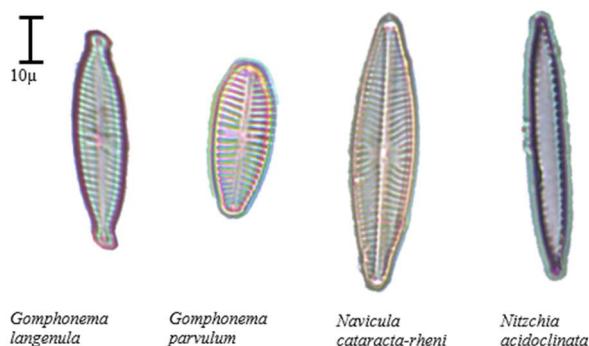


Figura 1. Especies de diatomeas identificadas.

Figure 1. Diatom species identified.

Entre las diatomeas identificadas, las especies de *Gomphonema langenula* y *Nitzchia acidoclinata* poseen cuerpos más rectos y patrones internos más densos, mientras que las especies de *Gomphonema parvulum* y *Navicula cataracta-rheni* presentan cuerpos ligeramente curvados y patrones internos más densos. Cada diatomea se diferencia de otra debido a que sus paredes celulares presentan una variedad de formas y patrones complejos dados por la adaptación de supervivencia de cada especie un hábitat específico.

### 3.2. Procesamiento de muestras de diatomeas en la fase de laboratorio.

#### 3.2.1. Determinación del método de extracción

La Figura 2 comprueba la extracción de ADN mediante el proceso de electroforesis en gel de agarosa. Se evidencia que el método de extracción utilizando un buffer es más práctico y efectivo para la extracción de mayor cantidad de ADN según su tamaño, como se observa en la banda más pronunciada, en contraste con el método basado en el uso del kit, donde la banda es menos visible.

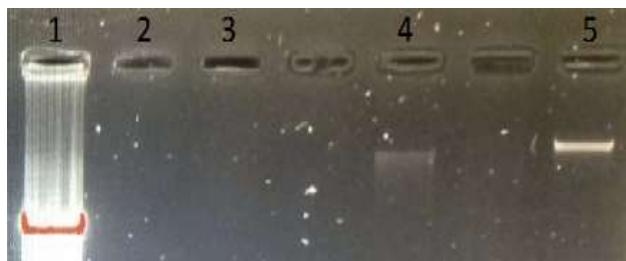


Figura 2. Comprobación de los dos métodos de extracción de ADN en gel de agarosa. Marcador de peso molecular (1), muestras de ADN extraídas con el kit (2 y 3) y muestras de ADN de la extracción con buffer (4 y 5).

Figure 2. Testing of the two agarose gel DNA extraction methods. Molecular weight marker (1), DNA samples extracted with the kit (2 and 3) and DNA samples from the buffer extraction (4 and 5).

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación del gen 18SrRNA.  
Table 2. PCR conditions for the amplification of the 18SrRNA gene.

Fase	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización	95 °C	3 minutos	1
Amplificación	Desnaturalización	95 °C	30 segundos
	Anillamiento	50 °C	45 segundos
	Elongación	72 °C	1 minuto
Elongación Final	72 °C	5 minutos	1

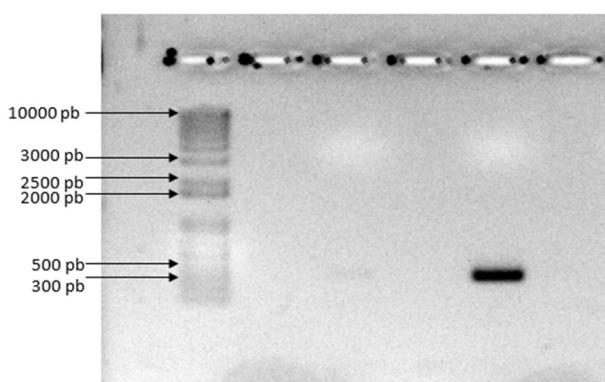


Figura 3. Resultado de PCR en gel de Agarosa.  
Figure 3. Agarose gel PCR result.

De acuerdo con la Figura 2, el marcador del peso molecular muestra bandas mucho más claras y definidas, lo que era esperado ya que estos marcadores se forman mediante los fragmentos de ADN de tamaños conocidos y se utilizan como referencia para en la electroforesis. Las muestras 2 y 3, que fueron realizadas con el método del kit, no muestran bandas visibles o son relativamente débiles ante el análisis. Esto a su vez puede indicar una baja concentración de ADN o la ausencia del mismo, lo que sugiere que el método logró extraer el ADN satisfactoriamente. Así también, las muestras 4 y 5, extraídas también con el buffer, muestran bandas claramente visibles, lo que indica la efectividad del método sobre la concentración de ADN.

Es importante mencionar que la velocidad de migración de las moléculas de ADN en el gel depende del tamaño de sus fragmentos. Las moléculas con fragmentos de menor tamaño se mueven con mayor facilidad a través de los poros de la matriz de agarosa, mientras que los fragmentos grandes se enfrentan a mayor resistencia y por ende migran lentamente (LABORATORIO DE GENÓMICA VIRAL Y HUMANA, 2020).

#### 3.2.2. Amplificación mediante PCR

Una vez obtenido el ADN, se llevó a cabo la amplificación de la región seleccionada mediante el uso de un termociclador. Las condiciones de reacción empleadas en el termociclador para la amplificación del gen 18S (Tabla 2). El resultado de la amplificación se muestra en la Figura 3, ahí se observa que las bandas tienen un tamaño de amplificación de 400 pb, indicando que los cebadores utilizados (DIV4 for & DIV4rev3) Apothéloz et al. (2017) and Visco et al. (2015) indican que la amplificación fue la indicada, además se determinó que las condiciones mostradas en la Tabla 2 y los ciclos propuestos para la PCR fueron los apropiados a la metodología planteada, por tanto podrán ser utilizados en futuras investigaciones.

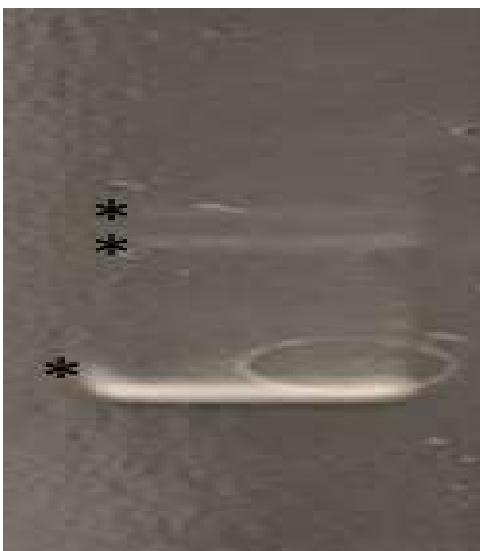
De acuerdo con la Figura 3, a la izquierda del gel, se pueden observar los marcadores de peso molecular que indican que el tamaño de los fragmentos de ADN en pares base (pb), con marcas para 10000 pb en la parte superior, seguido por 3000 pb, 2500 pb, 2000 pb, 500 pb y 300 pb en la parte inferior. Las líneas oscuras verticales en el gel representan las bandas de tamaño específico de ADN separadas. En el lado derecho del gel, se observa una sola banda oscura predominante, lo que indica una alta concentración de fragmentos de ADN de tamaño particular.

### 3.3. Separación de bandas por medio de Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)

El resultado de la amplificación mediante PRC se consiguió a partir de una muestra de cultivo que contenía

diversas especies de diatomeas con capacidad para formar secuencias correspondientes a la región 18S. A fin de diferenciar las secuencias resultantes, se llevó a cabo el proceso de electroforesis en gel de gradiente de desnaturización (DGGE). Esta técnica facilitó la separación de los productos de amplificación acorde a los criterios de composición respecto a sus bases nucleotidas.

La Figura 4, presenta el resultado de la DGGE, donde se observa la presencia de tres bandas distintas. La ausencia de la cuarta banda correspondiente a una de las especies de diatomeas identificadas puede deberse a al parecido entre tamaños en los fragmentos de ADN o a la carencia del ADN en dicha especie, reprimiendo así la unión entre cebadores e interrumpiendo el proceso de amplificación.



**Nota:** Las bandas se muestran en asteriscos

Figura 4. Resultado de la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante.

Figure 4. Result of denaturing gradient gel electrophoresis.

### 3.4. Metodología óptima

Tras la ejecución de los experimentos en la investigación se identificó la metodología óptima para la utilización del gen 18S como marcador genético, tal se detalla a continuación:

1. Inicialmente, se desarrolló el alineamiento de las series de diatomeas epilíticas existentes en el banco de datos de NCBL.
2. En el proceso de crecimiento de las diatomeas epilíticas se deberá utilizar un medio de cultivo CHU#10.
3. El cultivo de trabajo deberá ser mixto e incluir algas verdes y diatomeas epilépticas.
4. El proceso de extracción de ADN se efectuó utilizando el método de extracción Buffer, y la validación de la extracción se llevó a cabo mediante la electroforesis en gel de agarosa durante 2 horas a una velocidad promedio de 100 volteos.
5. Posterior a la amplificación, se determinó las condiciones de PCR (Tabla 2), y además se verificó el resultado de la aplicación de la electroforesis en gel de agarosa en la muestra.
6. Finalmente, para la efectividad en el proceso de separación de bandas se utilizó la electroforesis en gel gradiente desnaturizante (DGGE) durante un periodo de 3 horas a una velocidad de 120 volteos.

## 4. DISCUSSION

En la identificación de diatomeas por microscopia de la muestra de cultivo del río Cutuchi predominan cuatro especies como *Gomphonema langenula*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula cataracta-rheni* y *Nitzchia acido-clinata*. En otros estudios similares, como el realizado en el cantón Salcedo, también se identificó cinco especies predominantes de diatomeas asociadas a la calidad de agua en el río Yanayacu: *Encyonema lange-bertalotti*, *Gomphonema pumilum* var. *rigidum*, *Gomphonema parvulum*, *Gomphonema rhombicum*, *Hantzschia bacillariophyta* (MAIQUIZA; TONATO, 2020). Igualmente, la presencia de la *Gomphonema parvulum* también se cuantifica en abundancia en el estudio de calidad de agua del río Pumacunchi, Cotopaxi (PEÑAFIEL; QUICALIQUIN, 2019). La presencia de la especie *Gomphonema parvulum* en los casos sugiere su adaptabilidad a diferentes entornos acuáticos de la provincia de Cotopaxi. Esta adaptación podría relacionarse con las características de la especie para tolerar variaciones en las condiciones de agua, su versatilidad ecológica y su posible potencial como indicador de calidad de agua en la región.

Al comparar los estudios realizados en el punto medio del río Yanayacu en el cantón Salcedo y el río Pumacunchi en la parroquia de Guaytacama, se distinguen diferentes características significativas tanto en sus factores ambientales, como en sus condiciones de calidad del agua. No obstante, ambos sitios presentan un Índice Trófico de calidad del Agua (ITCA) similar, el río Pumacunchi revela una calidad de agua considerablemente peor, con una calificación de "Muy mala" y un Índice de Calidad de Agua de 11.80, en comparación con el río Yanayacu, que tiene una calificación de "Mala" con un Índice de Calidad de Agua de 41.57. Esta postura se atribuye a dos causas, en principio a la época de estudio (época lluviosa) y en segundo, a las diferentes fuentes de contaminación que cada río recibe (PEÑAFIEL; QUICALIQUIN, 2019; MAIQUIZA; TONATO, 2020). En el caso de río Yanayacu sus principales fuentes contaminantes son vertidos ganaderas y agrícolas, mientras que el río Pumacunchi recibe descargas de aguas residuales industriales, domésticas y urbanas.

Igualmente, las composiciones de las diatomeas encontradas en cada estudio difieren entre los dos sitios, lo que indica posibles variaciones en las condiciones ambientales. Las diatomeas epilíticas encontradas en cada muestra son sensibles a una variedad de factores ambientales, como el pH, la turbidez, la temperatura del medio o la disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto, estas diferencias resaltan la sensibilidad de las diatomeas *Encyonema lange-bertalotti*, *Gomphonema pumilum* var. *rigidum*, *Gomphonema parvulum*, *Gomphonema rhombicum* y *Hantzschia bacillariophyta*, a las condiciones ambientales específicas de cada sitio, lo que a su vez sugiere la adaptabilidad de las mismas a factores similares en ecosistemas acuáticos de la provincia de Cotopaxi.

Debido a que las diatomeas epilíticas funcionan como bioindicadores indispensables en los ecosistemas acuáticos, su importancia ecológica radica en su capacidad para detectar cambios en la calidad de agua en ríos y cursos fluviales. Esto debido a su sensibilidad a diversos factores ambientales, como su adaptabilidad a la salinidad y temperatura, su tolerancia al pH, sus patrones de hábitat y su profundidad a diferentes cuerpos de agua (CASTRO, 2024).

Por tanto, la importancia biológica de las microalgas *Gomphonema langenula* y *Gomphonema parvulum* radica en su papel como indicadores de calidad de agua, y además en su contribución con la productividad primaria y las redes tróficas de un medio acuático (DIATOMS OF NORTH AMÉRICA, 2021). Así entonces, esta clase de diatomeas responden a las variaciones de los nutrientes clave del agua, especialmente el fósforo. Estas especies son sensibles a la contaminación y suelen encontrarse en aguas limpias o bien oxigenadas. Aunque también algunas especies de este género se comportan como organismos heterotróficos en aguas con exceso de materia orgánica (COLEGIO SAN AGUSTIN, 2019). Entonces, en la presente investigación la presencia de estas especies en el agua del río Cutuchi, dentro del Parque Nacional Cotopaxi sugieren que el agua está relativamente libre de contaminantes y sus niveles de oxígeno son adecuados para mantener la vida acuática.

Por otro lado, la importancia biológica de la especie *Navicula cataracta-rheni* está en su capacidad de absorción de nutrientes como nitrógeno, fosforo o silicio del agua. Este proceso ayuda a mantener el equilibrio de nutrientes en un ecosistema acuático, y eso a su vez contribuye a la producción del oxígeno necesario para la respiración de distintos organismos acuáticos (SAGNET et al., 2022). Por ende, la aparición de estas especies en el agua de río Cutuchi, dentro del Parque Nacional Cotopaxi indica un ecosistema acuático saludable con una ciclación efectiva de nutrientes y una producción adecuada de oxígeno disuelto, lo que favorece a la supervivencia de la vida del ecosistema.

La importancia biológica de la especie *Nitzchia acidoclinat* radica en su capacidad para fortalecer el florecimiento de algas y en la producción de ácido domoico (neurotoxina) (GUILLÉN, 2022). Además, al actuar como bioindicador de contaminación suele presentarse en aguas con cargas de gran cantidad de materia orgánica. Sin embargo, su presencia en grandes cantidades puede indicar problemas de calidad de agua (SANTILLÁN; GUERRERO, 2018). Por lo tanto, la presencia de la especie *Nitzchia acidoclinat* en la muestra del río Cutuchi indica posibles problemas de contaminación en un área específica. Entonces, para estudios futuros es necesario tomar en cuenta factores ambientales y antropogénicos en la evaluación de calidad de agua del río.

Durante el proceso de extracción de ADN se compararon dos métodos: método de extracción de buffer y el método basado en el kit, siendo el primero el más efectivo puesto que extrajo una mayor cantidad de ADN, como se evidencia por la banda más visible en el gel de agarosa. Sin embargo, hay que destacar que la eficiencia de un método dependerá en su totalidad de diferentes factores o características de una especie. Gallego et al. (2019) demostraron en su estudio que la extracción del ADN puede variar dependiendo del tipo de muestra y los materiales disponibles, incluyendo aquellos que se pueden encontrar en la vida cotidiana. Por ejemplo, Betancurt et al. (2018) en su estudio comparó seis métodos de extracción de ADN en tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé), y encontró que los métodos que demostraron un mayor rendimiento en sus resultados fueron los que se obtuvieron por el kit y el método de Doyle. La variabilidad de la extracción de ADN entre microorganismos depende por completo de los factores relacionados con las características específicas de las muestras, las condiciones de

almacenamiento, el entorno o el método de extracción utilizado.

Existen varios factores que podrían influir en el rendimiento del ADN, entre los más frecuentes esta la edad de la muestra, las condiciones de almacenamiento, las técnicas de lisis celular, la genética, los factores ambientales y los factores epigenéticos. Debido a que el ADN puede degradarse con el tiempo, en especial en condiciones desfavorables de almacenamiento, muestras más antiguas pueden tener una menor cantidad y calidad de ADN extraído (SANDOVAL et al. 2019). Entonces, las condiciones de almacenamiento inadecuadas en parámetros como la temperatura, humedad, luz o períodos de tiempo afectan directa o indirectamente a la degradación de ADN, lo que resulta en un rendimiento reducido durante el proceso de extracción (HUERTA; CENTENO, 2020).

Por otro lado, las afectaciones al rendimiento del ADN durante las técnicas de lisis celular puedan darse por diferentes factores. Primero, la lisis incompleta de células vegetales, fúngicas y bacterianas, con paredes celulares poco resistentes pueden resultar en la pérdida del ADN. Segundo, la elección inadecuada del método utilizado en la lisis puede afectar a la ruptura de las membranas celulares y la liberación del ADN. Tercero, la preparación inadecuada de las etapas de pre-incubación y la post-purificación puede generar contaminantes dañinos frente a la pureza del ADN extraído. Por último, el uso incorrecto de detergentes iónicos puede desnaturalizar el ADN y producir su degradación (PARADA, 2020; SANCHO et al., 2022).

Así también, la degradación del ADN puede darse tanto por factores ambientales como factores epigenéticos. El primero se refiere directamente a las condiciones medioambientales, como la contaminación química o la exposición a radiación ultravioleta. Y el segundo, se refiere a factores como la metilación de ADN o las modificaciones de histonas, procesos que pueden afectar a la eficacia de las técnicas de extracción, la accesibilidad y estabilidad del ADN (GÁLVEZ, 2021).

Los resultados de la Tabla 2 demuestran que una exitosa amplificación por PCR del gen 18S. Las condiciones empleadas, incluyendo la fase de desnaturación de 95°C, la amplificación y la elongación, resultaron en bandas de amplificación de 400 pares de bases (Figura 3), lo que indica que los cebadores utilizados fueron adecuados. Un estudio realizado por Lee et al. (2021) demuestra que en ciertos casos la amplificación en la región del gen 18S rRNA puede ser desafiante en muestras ambientales debido a la presencia de eucariotas dominantes como dinoflagelados. Debido a que en la investigación no existieron inconvenientes en la ampliación por PCR para el gen 18S, se valida la eficacia de los cebadores y de las condiciones del PCR utilizadas. Esto sugiere que la metodología aplicada es sólida para muestras y condiciones ambientales en hábitats acuáticos, suelos, sedimentos o inclusive ambientes extremos.

La utilización de la técnica DGGE para separar fragmentos de ADN basándose en su secuencia de nucleótidos mediante PCR (Fideli, 2020), ha logrado identificar tres bandas separadas de las cuatro especies identificadas. Esto podría deberse a que los fragmentos de ADN de algunas especies eran del mismo tamaño o que el ADN no era suficiente para permitir su ampliación. Debido a que la técnica DGGE es una forma indirecta de separación de fragmentos de ADN con secuencias iguales o muy

similares, existen ocasiones donde el DGGE no separa las bandas de acuerdo con las especies, sino que se basa en la secuencia de nucleótidos y el punto de desnaturalización de los fragmentos de ADN (PÉREZ, 2015). Por otro lado, Abellan et al. (2021) resalta en su estudio que la cantidad insuficiente de ADN en una especie puede limitar su amplificación, por lo que no se producirán suficientes copias de sus fragmentos detectables. Esto sugiere dos puntos, uno es que los fragmentos de ADN de una de las cuatro especies eran del mismo tamaño, composición de nucleótidos y punto de desnaturalización, por tanto, no se separaron en el gel de agarosa. Y el otro, es que una especie no tenía suficiente ADN como para producir copias suficientes de fragmento para ser detectado por el gel.

La ausencia de una banda de diatomeas en la DGGE se puede atribuir tanto a la similitud de tamaño como al bajo contenido de ADN. La DGGE separa fragmentos de ADN de tamaño similar e incluso superpone unas entre otras limitando su visibilidad en bandas separadas, y asimismo, una banda no es perceptible si el contenido de ADN de una especie de diatomea es muy bajo (KROEMER, 2019).

En consecuencia, ambas situaciones recaen en la ausencia de ADN en el gel de DGGE, sin embargo, otros factores causantes de la condición puede ser los errores técnicos en el uso de cebadores o la ineficiencia de la PCR. En el primer caso, los cebadores son secuencias cortas de ADN utilizados principalmente al inicio de la reacción de la PCR. Si los cebadores no se unen al ADN de la diatomea correctamente, la PCR puede no amplificar el ADN de tal especie, lo que resulta en su ausencia en una banda en el gel. Y en el segundo caso, es de considerar que la PCR es una técnica sensible frente a otros factores, incluyendo la calidad del ADN, la concentración entre reactivos o la temperatura de reacción. Si la PCR no se realiza de forma correcta, no existirá una amplificación suficiente del ADN para la visualización de bandas (KROEMER, 2019).

Dicho ello, la ausencia de una banda de diatomeas en la DGGE puede deberse a los factores antes mencionados, o a una combinación de estos. Por tanto, al interpretar los resultados de las bandas tras la DGGE, es importante considerar no solo la similitud de tamaño y el bajo contenido de ADN, sino también aspectos como la eficiencia de la extracción de ADN, la amplificación por PCR y la sensibilidad de la técnica utilizada.

## 5. CONCLUSIONES

A través de la microscopía de la muestra del cultivo, se logró identificar cuatro especies de diatomeas. Esta identificación se basó en características como el tamaño, las estrías, el rafe y la forma de los esqueletos de las diatomeas. Este hallazgo contribuye al conocimiento existente de las diatomeas epilíticas en el área de estudio.

Se demostró que el método de extracción de ADN con buffer es más eficaz en comparación con el método basado en el kit, como se evidencia en la electroforesis en gel de agarosa. Además, se logró la amplificación exitosa de la región del gen 18S, utilizando los cebadores DIV4 for & DIV4rev3. Los resultados de la amplificación, visualizados en un gel de agarosa, indican que las condiciones y los ciclos de la PCR fueron adecuados y podrían utilizarse en futuras investigaciones.

La electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) permitió la diferenciación de las secuencias de

ADN obtenidas de un cultivo mixto de diatomeas y algas verdes. Aunque solo se observaron tres bandas en lugar de cuatro, esto podría deberse a que los fragmentos de ADN de algunas especies eran del mismo tamaño o a que el ADN de una de las especies era insuficiente para permitir la amplificación.

## 6. REFERENCIAS

- ABELLAN-SCHNEYDER, I.; SCHUSSER, A. J.; NEUHAUS, K. ddPCR allows 16S rRNA gene amplicon sequencing of very small DNA amounts from low-biomass samples. **BMC Microbiology**, v. 21, e349, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02391-z>.
- ANDERSEN, R.; BERGES, J.; HARRISON, P.; WATANABE, M. M. Appendix A - recipes for freshwater and seawater media. In: **Algal culture techniques**. 1 ed. London: Elsevier Academic Publisher, 2005. p. 429-538.
- APOTHÉLOZ-PERRET-GENTIL, L.; CORDONIER, A.; STRAUB, F.; ISELI, J.; ESLING, P.; PAWLOWSKI, J. Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 6, p. 1231-1242, 2017. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12668>
- ARÉVALO, P. **Diatomeas epilíticas como bioindicadores de eutrofización en la microcuenca del río “Guano”, provincia de Chimborazo, Ecuador.** 57f. Final Course Project [Master en Gestión Ambiental] - Universidad Internacional SEK, Chimborazo, Ecuador. 2018.
- BETANCURT-OLVERA, M.; PEREZ-LAINEZ, M. D.; NIETO-ANGEL, R.; BARRIENTOS-PRIEGO, A. F.; GARCÍA-MATEOS, M. del R.; CORONA-TORRES, T. Comparación de seis métodos de extracción de ADN en tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé). **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 41, n. 1, p. 75-79, 2017. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.1.75-79>
- CASTRO ERAZO, P. A. **Uso de diatomeas epífitas de la laguna Limoncocha, provincia de Sucumbíos, Ecuador como bioindicadores de calidad de agua.** 51f. Final Course Project [Master en Ingeniero en Biotecnología] - Universidad Internacional SEK, Chimborazo, Ecuador, 2024.
- COLEGIO SAN AGUSTÍN. **Bacillariophyceae (Diatomea) como indicador biológico y su relación con la calidad del agua del Río Reque: ¿Cuál es la relación entre la presencia del indicador biológico Bacillariophyceae (Diatomea) y la calidad del agua del Río Reque?** 2019. Disponible en: <https://repositorio.agustinos.pe/items/74396602-0fb4-4b40-958c-d79e90ad8b11>. Consultado el 16 Dec. 2024.
- DIATOMS OF NORTH AMERICA. **Guide to Gomphonema lagenula | Species.** 2021. Disponible en: <https://diatoms.org/species/gomphonema-lagenula/guide>. Consultado el 16 Dec. 2024.
- ECURED. **Diatomeas.** 2019. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Diatomeas>
- EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 6, e1349, 1991. <https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>

- FIDELI, P. Evaluación de diferentes técnicas moleculares para la identificación de *Oenococcus oeni* en mosto y vino. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia, 2020. 44p. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/155482>. Consultado el 16 Dec. 2024.
- GALLEGO, R. E.; MARCOS-MERINO, J. M.; OCHOA DE ALDA, J. G. Extracción de ADN con material cotidiano: diseño, implementación y validación de una intervención activa interdisciplinaria. **Educación Química**, v. 30, n. 1, p. 42-57. 2019. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2019.1.67658>. Consultado el 16 Dec. 2024.
- GÁLVEZ, M. La contaminación y otros efectos ambientales pueden afectar el ADN humano. **Futuro Verde**. 2021. Disponible en: <https://futuroverde.org/2021/06/la-contaminacion-y-otros-efectos-ambientales-pueden-afectar-el-adn-humano/>. Consultado el 16 Dec. 2024.
- GUILLÉN, A. *Nitzschia* sp. **Mundo Microscópico**. 2022. Disponible en: <https://www.biodiversidadvirtual.org/micro/Nitzschia-sp.-img5353.html>. Consultado el 16 Dec. 2024.
- HUERTA, A.; CENTENO, A. Aplicaciones de las técnicas de ADN ambiental al estudio y conservación de los recursos naturales. **MoleQla**, v. 40, p. 6-14, 2019.
- KROEMER, T. Cómo Interpretar Resultados de Electroforesis en Gel de ADN. 2019. Disponible en: <https://goldbio.com/articles/article/Como-Interpretar-Resultados-Electroforesis-Gel-ADN>. Consultado el 16 Dec. 2024.
- LABORATORIO DE GENÓMICA VIRAL Y HUMANA. **Agarose Electrophoresis of Nucleic Acids**. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. 2020. Disponible en: [https://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Mol\\_Agarose\\_SPA.pdf](https://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Mol_Agarose_SPA.pdf). Consultado el 16 Dec. 2024.
- LEE, F. C. H.; MUTHU, V. From 18S to 28S rRNA Gene: An Improved Targeted Sarcocystidae PCR Amplification, Species Identification with Long DNA Sequences. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 4, p. 1388-1393, 2021. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0767>
- MAIQUIZA, K.; TONATO, G. Identificación de Diatomeas Epilíticas asociadas a la Calidad del Agua en el Río Yanayacu, sector San Juan, Cantón Salcedo, Provincia de Cotopaxi, 2020. 99f. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/7103>. Consultado el 16 Dec. 2024.
- MARTÍNEZ, Y.; CAB-SULUB, L.; MONROY, A. Mamíferos y diatomeas, habitantes de los oasis. **Therya ixmana**, v. 3, n. 1, p. 26-27, 2021. [https://doi.org/10.12933/therya\\_ixmana-24-430](https://doi.org/10.12933/therya_ixmana-24-430)
- ÓLAFSSON, A. Las diatomeas marinas sincronizan su hundimiento para encontrar pareja. **Ministerio de Ciencia e Innovación de España**. 2019. Disponible en: <https://bit.ly/35Q1DfN>. Consultado el 16 Dec. 2024.
- PARADA, R. Lisis celular: concepto, proceso, causas y tipos. 2020. Disponible en: <https://www.lifeder.com/lisis-cellular/>. Consultado el 16 Dec. 2024.
- PAWLOWSKI, J.; LEJZEROVICZ, F.; APOTHELOZ-PERRET-GENTIL, L.; CORDONIER, A.; ESLING, P.; PILLET, L.; PAWLOWSKI J. Environmental Monitoring: Inferring the Diatom Index from Next-Generation Sequencing Data. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 13, p. 7597-7605, 2015. <https://doi.org/10.1021/es506158m>
- for change. **European Journal of Protistology**, v. 55, p. 12-25, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.02.003>
- PEÑAFIEL, D.; QUICALIQUIN, N. Identificación de Diatomeas Epilíticas Asociadas al Nivel de Eutrofización del Río Pumacunchi, Provincia de Cotopaxi. 108p. 2019. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/6243>. Consultado el 16 Dec. 2024.
- PÉREZ GIL MARÍA DEL CARMEN. Aplicación de técnicas de biología molecular para la caracterización de la población microbiana en la degradación de compuestos orgánicos volátiles (COV) mediante biofiltros y biofiltros percoladores. Valencia, España: Universidad de Valencia, 2024. 217p. Disponible en: <https://hdl.handle.net/https://hdl.handle.net/10550/45501>. Consultado el 16 Dec. 2024.
- PÉREZ, L. Macroinvertebrados y diatomeas como bioindicadores en el estudio de la calidad de agua del río Actopan en la localidad El Zapotito, en el municipio de Úrsulo Galván, Veracruz. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, CDMX, México. 2022.
- RIMET, F.; TROBAJO, R.; MANN, D. G.; KERMARREC, L.; FRANC, A.; DOMAIZON, I.; BOUCHEZ, A. When is Sampling Complete? The effects of geographical range and marker choice on perceived diversity in *Nitzschia palea* (Bacillariophyta). **Protist**, v. 165, n. 3, p. 245-259, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.03.005>
- SAGNET, D.; VAN DE VIJVER, B.; TUDESQUE, L. *Navicula similecatargacta-rheni* sp. nov. and *N. aquitanonipponica* sp. nov. (Bacillariophyta), two new species from Nouvelle-Aquitaine, Southwestern France-comparison with the related species *N. cataracta-rheni* Lange-Bertalot, *N. cryptotella* Lange-Bertalot and *N. sancti-naumii* Levko et Metzeltin. **Fottea**, v. 22, n. 2, p. 211-227, 2022.
- SANCHO-BLANCO, C.; JIMÉNEZ-ALFARO, E. J.; MOLINA-BRAVO, R.; UMAÑA-CASTRO, R. Incubación, pre-lisis y post-purificación en el rendimiento y pureza de ácidos nucleicos extraídos de sangre de cabras domésticas contenida en tarjetas FTA. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 13, n. 1, p. 311-322, 2022. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i1.5890>
- SANDOVAL, A.; LAGUNES, T. J.; BARRIENTOS, C. Predicción de edad mediante la metilación del ADN. **Revista Mexicana de Medicina Forense**, v. 4, n. 1, p. 43-52, 2019.
- SANTILLÁN, S.; GUERRERO, A. Macroinvertebrados y fitoplancton como bioindicadores de contaminación en la cuenca del río Chicama, Perú. **Revista Tecnología en Marcha**, v. 31, n. 4 p. 97-110, 2018.
- VISCO, J. A.; APOTHELOZ-PERRET-GENTIL, L.; CORDONIER, A.; ESLING, P.; PILLET, L.; PAWLOWSKI J. Environmental Monitoring: Inferring the Diatom Index from Next-Generation Sequencing Data. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 13, p. 7597-7605, 2015. <https://doi.org/10.1021/es506158m>

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a la Universidad Técnica de Cotopaxi por el apoyo para la realización de este trabajo investigativo.

**Authors' contributions:** Todos los autores contribuyeron por igual a la concepción y redacción del manuscrito. Todos los autores revisaron críticamente el manuscrito y aprobaron la versión final.

**Data availability:** The corresponding author can obtain study data by e-mail.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. Supporting entities had no role in the study's design, data collection, analysis, or interpretation, manuscript writing, or decision to publish the results.



**Copyright:** © 2024 by the authors. This article is an Open-Access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons [Attribution-NonCommercial \(CC BY-NC\) license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).