

## Calidad ecológica de las salinas tradicionales de Canarias mediante ADN ambiental

**C. Medina-Alcaraz, D. Hernández-Reyes y N. González-Henríquez**

Laboratorio de Biodiversidad Molecular (BioMol). Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. C/Camino de Salvago S/N. 35017 Las Palmas de Gran Canaria. España.

e-mail: carolina.medina106@alu.ulpgc.es

### RESUMEN

Los sistemas biológicos de las salinas son sensibles a los cambios ecológicos, internos y externos, que pueden conducir a problemas graves en la producción y calidad de las sales. La puesta en marcha de un programa de monitoreo regular, de análisis de nutrientes y evaluaciones de las comunidades planctónicas, puede prever la aparición de esos problemas y facilitar su mitigación. Se ha realizado la caracterización de los componentes de la comunidad biológica del agua, salmuera y sales, mediante herramientas moleculares en dos salinas de Gran Canaria, para conocer su composición y establecer un programa de monitorización. Se identificaron dos especies de microalgas de interés comercial, *Dunaliella salina* y *Nannochloropsis gaditana*. Además, se ha realizado un estudio de trazabilidad de *D. salina* en la sal producida en una de las salinas, así como en la sal gourmet elaborada por el Instituto Tecnológico de Canarias (ITC).

**PALABRAS CLAVE:** diversidad genética, salinas, trazabilidad, *Dunaliella*.

## INTRODUCCIÓN

Las salinas pueden considerarse como ecosistemas particulares, donde la intervención humana es necesaria para mantener sus características, preservar el paisaje y proteger el medio ambiente, a la vez que genera beneficios económicos. Las salinas son, por lo tanto, ecosistemas integrados que pueden producir un producto económicamente viable a la vez que desempeñan un papel fundamental en la conservación de la naturaleza y la biodiversidad.

Actualmente en Canarias hay unas pocas salinas que se encuentran protegidas bien sea por su interés arquitectónico, declaradas como Bien de Interés Cultural (BIC), o por su interés natural como Espacio Natural protegido al ser zonas de gran relevancia para la avifauna. Constituyen uno de los mejores modelos de intervención humana, por su diseño, adaptación al medio, valor cultural e histórico, tradiciones, así como por su aportación al medio ambiente y a la riqueza patrimonial de las Islas Canarias.

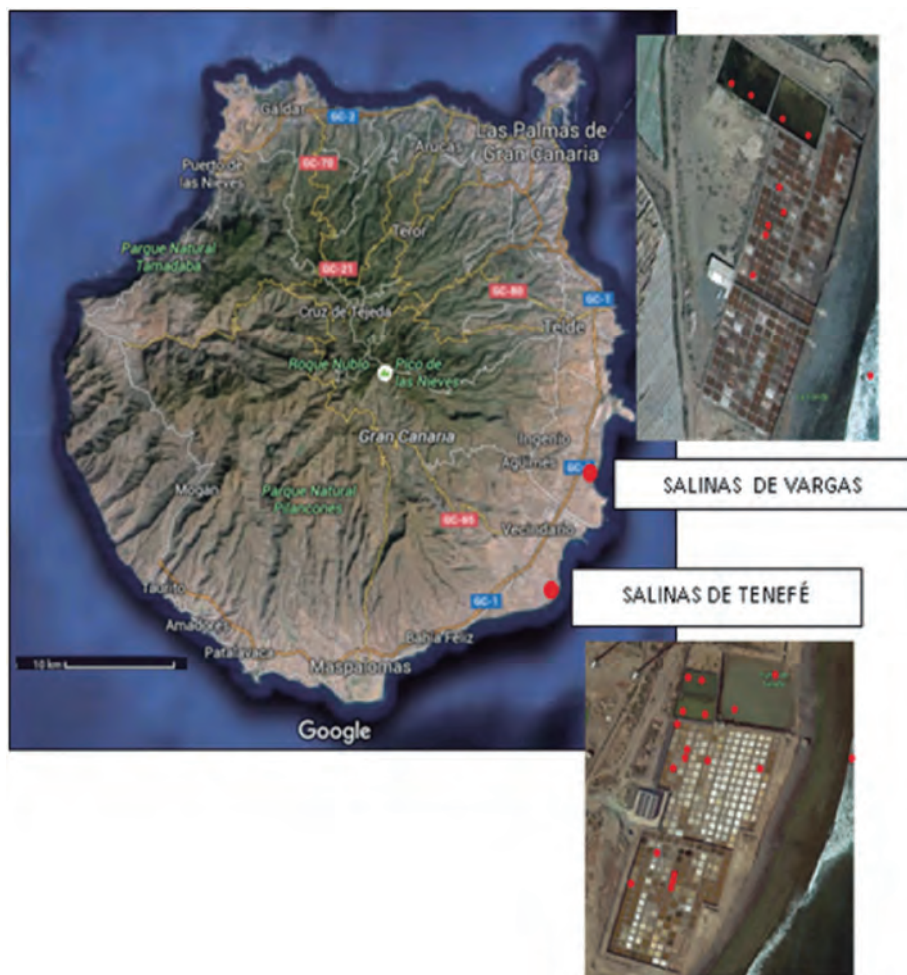
Las salinas tienen un alto valor ecológico, con una composición de la comunidad planctónica que cambia gradualmente con la salinidad. Los sistemas biológicos de las salinas son sensibles a los cambios ecológicos, internos y externos, que pueden conducir a problemas graves. Por lo tanto, el conocimiento sobre la variabilidad de los factores ecológicos es necesario para poder mantener o aumentar la producción de sal y mejorar su calidad. Se pueden anticipar problemas en las salinas (por ejemplo, desarrollo de placas y producción de limos), mediante la puesta en marcha de un programa de monitoreo regular, con análisis de nutrientes y evaluación de las comunidades planctónicas.

En este estudio se ha realizado una caracterización de los componentes de la comunidad biológica del agua, salmuera y sales de dos salinas en Gran Canaria, mediante un sistema de identificación molecular rápida y eficaz. Paralelamente, se realizó un estudio de trazabilidad con la sal producida en una de las salinas y la sal rosa atomizada del Instituto Tecnológico de Canarias (ITC).

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Localización:** las muestras fueron tomadas en diferentes zonas (reservorio de entrada, evaporadores, cristalizadores) de dos salinas de Gran Canaria (Fig. 1). Un total de 17

muestras en las salinas de Tenefé (Santa Lucía de Tirajana), y 10 muestras en las salinas de Bocacangrejo (Playa Vargas, Agüimes).



**Figura 1.-** Mapa y localización de las salinas con los puntos de muestreo.

**Preparación de las muestras:** se filtraron mediante filtros Whatman de nitrato de celulosa de  $0,45\ \mu\text{m}$  y/o centrifugación para la obtención del pellet, congelándose hasta la extracción del ADN. Las muestras de los evaporadores y las de agua de mar fueron prefiltradas con un tamiz de  $0,1\ \text{mm}$ .

**Extracción de ADN:** se probaron distintos tipos de protocolos, el método químico: por extracción con cloroformo modificado por V. Thuillier *et al.* (Altermatt *et al.*, 2015) y varios kits comerciales: E.Z.N.A Tissue DNA Kit, E.Z.N.A Mollusc DNA Kit, E.Z.N.A Water DNA Kit, QUIAGEN AllPrep DNA/RNA Mini Handbook y QUIAGEN DNeasy Plant Mini Kit, NORGEN Soil DNA Isolation Plus Kit, EURX GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit.

**Amplificación:** los genes y espaciadores seleccionados para la amplificación de las muestras de ADN mediante PCR fueron de dos tipos, nucleares (ITS, 18S y 28S) y mitocondriales (COI y 16S), utilizando cebadores universales y específicos, para Cianobacterias (Kumar *et al.*, 2009); *Dunaliella* (Sathasivam *et al.*, 2012; Olmos-Soto *et al.*, 2002), *Artemia salina* (Muñoz *et al.*, 2008), ya que no había estudios previos de las especies de organismos de la cadena trófica en estos ecosistemas. Los productos de PCR que mostraron múltiples bandas se sometieron a un método alternativo a la secuenciación para la identificación de especies, la PCR-RFLP, se realizó *in silico* mediante el programa *on line* Restriction Mapper, el cual encuentra los sitios de escisión de las secuencias de ADN con diferentes endonucleasas de restricción mostrando los puntos de corte exactos, proporcionado una imagen de bandas de los cortes digeridos.

Los productos de PCR fueron purificados con el kit ExoSAP-It (Affimetrix) y la reacción de secuenciación se realizó con el kit BigDye v3.1 y X-terminator (Thermo Fisher Scientific). La secuenciación se llevó a cabo con el equipo ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific).

Los electroferogramas de las secuencias brutas fueron tratadas y alineadas para su edición mediante softwares especializados: Sequencing Analysis v6.x (Applied) y BioEdit (Hall 1999). Posteriormente las secuencias fueron comparadas mediante BLAST con las bases de datos NCBI y BOLD SYSTEMS para la identificación de las especies.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

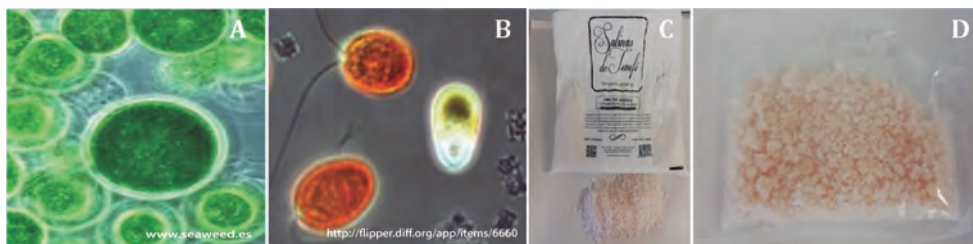
Extracción de ADN: el método químico obtuvo mejores resultados, ya que presentaba mayores concentraciones de ADN, pero contenía productos que inhibieron el funcionamiento de la enzima Taq Polimerasa, por lo que se decidió utilizar el ADN obtenido con algunos kits comerciales (E.Z.N.A. Tissue DNA Kit, E.Z.N.A. Mollusc DNA Kit y NORGEN Soil DNA Isolation Plus Kit). Amplificación y secuenciación: de los 34 cebadores probados en este estudio, 25 amplificaron adecuadamente (Tabla I).

**Tabla I.-** Cebadores que amplificaron las muestras de salmuera y agua de las salinas.

| <b>Cebadores</b> | <b>Secuencia</b>                        | <b>Tipo</b>                   | <b>Bibliografía</b>         |
|------------------|-----------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 16Sar-5'         | 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3               | U. 16S: Moluscos y crustáceos | Palumbi, 1998               |
| 16Sbr-3'         | 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'            | U. 16S: Moluscos y crustáceos | Palumbi, 1998               |
| Euk A            | 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'             | U. 16S: Microalgas            | Medlin <i>et al.</i> , 1988 |
| Euk B            | 5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'            | U. 16S: Microalgas            | Medlin <i>et al.</i> , 1988 |
| LCO              | 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'         | U. COI: Invertebrados         | Folmer <i>et al.</i> , 1994 |
| HCO              | 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'        | U. COI: Invertebrados         | Folmer <i>et al.</i> , 1994 |
| 18S D            | 5'-CACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTG-3'       | U. 18S: Eucariotas            | Hillis & Dixon, 1991        |
| 28S Z            | 5'-AGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGAC-3'        | U. 28S: Eucariotas            | Hillis & Dixon, 1991        |
| CYA106F          | 5'-CGG ACG GGTGAG TAA CGC GTG A-3'      | E. 16S: Cianobacterias        | Kumar <i>et al.</i> , 2009  |
| CYA359F          | 5'-GGG GAA TYTTCC GCA ATG GG-3'         | E. 16S: Cianobacterias        | Kumar <i>et al.</i> , 2009  |
| CYA781MIX        | 5'-GAC TAC WGG GGT ATC TAA TCC CWT T-3' | E. 16S: Cianobacterias        | Kumar <i>et al.</i> , 2009  |
| CYA781Ra         | 5'-GAC TACTGG GGT ATC TAA TCC CAT T-3'  | E. 16S: Cianobacterias        | Kumar <i>et al.</i> , 2009  |
| CYA781Rb         | 5'-GACTAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T-3'  | E. 16S: Cianobacterias        | Kumar <i>et al.</i> , 2009  |
| EUK-516R         | 5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3'                  | U. 18S: Eucariotas            | Amann <i>et al.</i> , 1990  |
| EUK 82F          | 5'-GAAACTGCGAATGGCTC-3'                 | U. 18S: Microalgas            | Elwood & Sogin 1985         |
| 18S-42F          | 5'-CTCAARGAYTAAGCCATGCA-3'              | U. 18S: Eucariotas            | Slapeta & López-García 2005 |
| 18S- 1498R       | 5'-CACCTACGGAAACCTTGTTA-3'              | U. 18S: Microalgas            | Slapeta & López-García 2005 |
| 1/2COI_Fol-F     | 5'-ATT CTA CGA ATC ACA AGG ATA TTG G-3' | E. COI: Artemia               | Muñoz <i>et al.</i> , 2008  |
| 1/2COI_Fol-R     | 5'-TAC ACT TCA GGA TGG CCA AAAAAT CA-3' | E. COI: Artemia               | Muñoz <i>et al.</i> , 2008  |

| Cebadores | Secuencia                   | Tipo               | Bibliografía                 |
|-----------|-----------------------------|--------------------|------------------------------|
| ITS2F     | 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'  | U. ITS: Plantas    | Chen <i>et al.</i> , 2010    |
| ITS3R     | 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3' | U. ITS: Plantas    | Chen <i>et al.</i> , 2010    |
| MA2       | 5'-CTTCTGCAGGTTCAACC-3'     | U. 18S: Dunaliella | Schubart 2009                |
| NS1 F     | 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'   | U. 18S: Microalgas | Hoshino & Morimoto 2008      |
| NS8 F     | 5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'   | U. 18S: Microalgas | Liu, D. 2011                 |
| DSs F     | 5'-GCAGGAGAGCTAATAGGA-3'    | U. 18S: Dunaliella | Olmos <i>et al.</i> , 2000   |
| ITS-F1    | 5'-GAAGTCGTAACAAGGTTTCC-3'  | U. ITS: Plantas    | Timmins <i>et al.</i> , 2009 |
| ITS-R1    | 5'-TCCTGGTTAGTTTCTTTTCC-3'  | U. ITS: Plantas    | Timmins <i>et al.</i> , 2009 |
| AB1       | 5'-AATCTATCAATAACCACA-3'    | E. ITS: Dunaliella | Hejazi <i>et al.</i> , 2010  |
| AB2       | 5'-TTTCATTCGCCATTACTA-3'    | E. ITS: Dunaliella | Hejazi <i>et al.</i> , 2010  |

Los 25 extractos de ADN amplificados proporcionaron 15 secuencias, las cuales determinaron la presencia de algas de la familia Bangiophyceae en los evaporadores, y 3 especies de microalgas unicelulares verdes en los cristalizadores: *Nannochloropsis gaditana*, y *Dunaliella tertiolecta*/D. *salina* (Fig. 2).



**Figura 2.-** Especies confirmadas y sales utilizadas para la trazabilidad de *Dunaliella salina*: (A) *Nannochloropsis gaditana*. (B) *Dunaliella salina*. (C) Sal salinas de Tenefé. (D) Sal gourmet atomizada. Fotos Carolina Medina.



## CT7.1\_SI (B1)F /Salina de Tenefé.

GCCCTGGAGGGGAACGGCATGGAACATTGCTAAAACCCCATGTGCCCTTGGGTGAAAAAGAGAAAG  
 TAAGTCATACTGATTATCTCTGCCTGAAGAGAAGCTCGCGGCTGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGG  
 CCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTC  
 CAGACTCTACGGGAGGACAGCAGTGAGGAATTTCTGCAATGGGCGAAAGCCTGACAGAGCAATACC  
 GCGTGGGGGATGAAGACTTACTGAGTTGTAAACCTCGGTACCCTAAGGAAGAAGATATGACGGTACTT  
 AGGGTGGAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGGGGATGCAAGTGTATCC  
 GGATTACTGGGCGTAAAGCGTCTGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTACTGTTAAATCTTGAGGCTCAACCT  
 CAAATCTGCAGTAGAACTAGGAGACTTGAGTATAGTAGGGGTAGAGGGAATTTCCAGTGGAGCGGT  
 GAAATGCGTAGATATTGGAAAGAACCCGATGGCGAAGGCACTCTACTGGGCTATTACTGACACTCAG  
 AGACGAAAGTAGGGGGGAGCAAATGGGATATCCCCCCTTGTAAACA

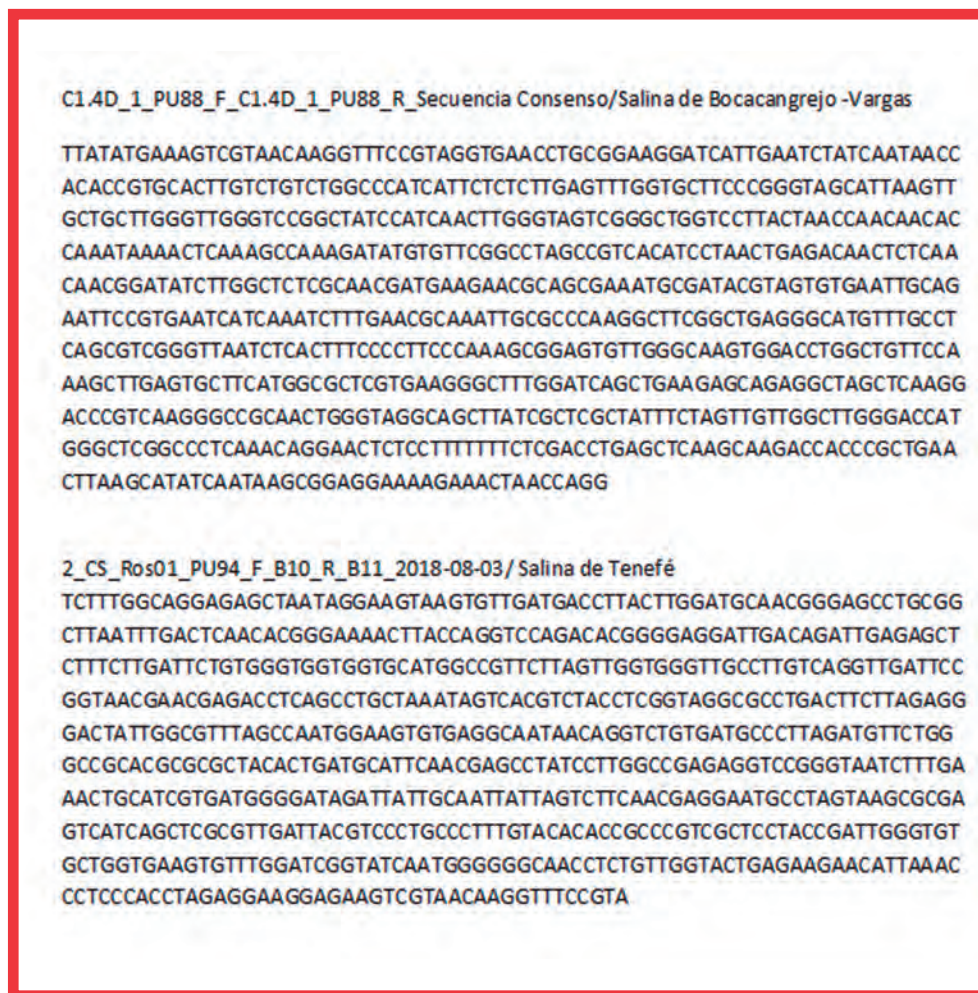
## CT1.5\_PU84\_F\_R\_Secuencia Consenso /Salina de Bocacangrejo -Vargas

TCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATTCGCCTTTAGGAGGGGGATAACGGATGGAAACATTGCTA  
 AAACCCCATGTGCCCTCGGGTGAAGAGAGAAAGTAAGTCATACTGATTATCTCTGCCTGAAGAGAA  
 GCTCGCGGCTGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAG  
 AGGACGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATT  
 TTCTGCAATGGGCGAAAGCCTGACAGAGCAATACCGGTGGGGGATGAAGACTTACTGAGTTGTAAAC  
 CTCGGTACCCTAAGGAAGAAGATATGACGGTACTTAGGGTGAAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGC  
 AGCCGCGGTAAGACGGGGGATGCAAGTGTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGCGTCTGCAGGTGGT  
 TTCTTAAGTCTACTGTTAAATCTTGAGGCTCAACCTCAAATCTGCAGTAGAACTAGGAGACTTGAGTAT  
 AGTAGGGGTAGAGGGAATTTCCAGTGGAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGAAAGAACCCGATGGC  
 GAAGGCACTCTACTGGGCTATTACTGACACTCAGAGACGAAAGCTAGGGGAGCAAATGGGGATTAGA  
 TAC

**Figura 3.-** Secuencias consenso de *Nannochloropsis gaditana*.

Se confirmó la presencia de *Nannochloropsis gaditana* (Fig. 3) con los primers CYA106F\_CYA781RMIX, y de *Dunaliella salina* con los Internals transcript sequence ITS-F1\_R1. (Fig. 4).

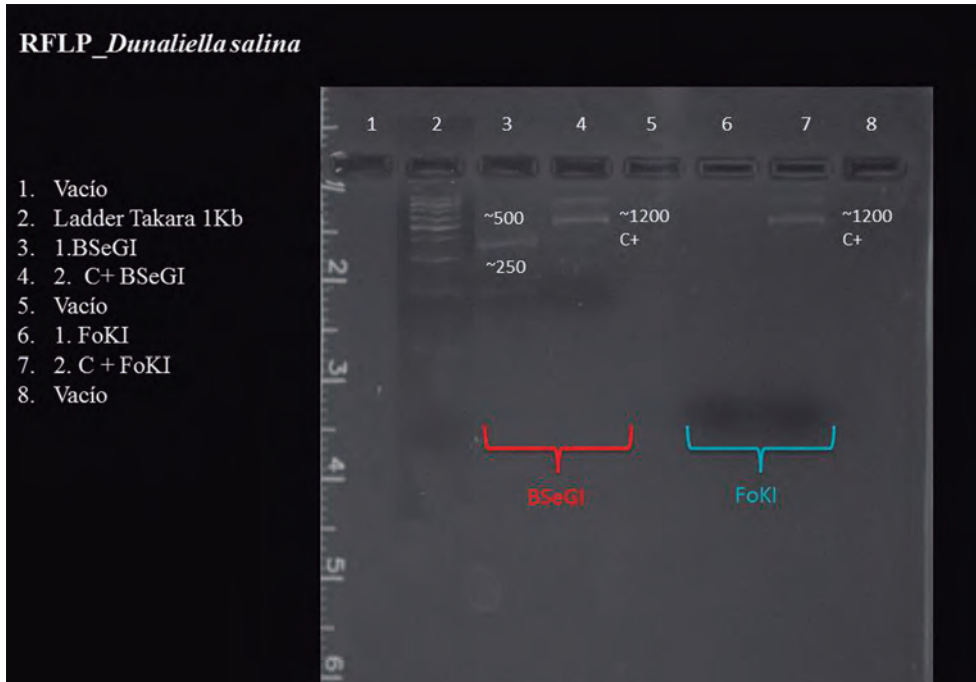
La amplificación y secuenciación con los marcadores ITS, DSs1-MA2, para la trazabilidad de la sal rosa (ITC), mostraron que la especie que se encuentra dentro de los cristales de la sal es *Dunaliella salina* (Fig. 4).



**Figura 4.-** Secuencias consenso de *Dunaliella salina*.

La RFLP con las enzimas de restricción BseGI y FokI, de los productos de PCR que dieron doble banda de *Dunaliella*, dio como resultado que solo la enzima BseGI proporcionó un patrón de 2 bandas (253b y 477b) que coincidía con la digestión *in silico* de *D. salina* (Fig. 5).





**Figura 5.-** Gel de RFLP enzimas restricción BSeGI y FokI.

## CONCLUSIONES

- ❖ La amplificación y secuenciación, con marcadores universales y específicos, en las muestras de agua de los reservorios de las salinas estudiadas, nos ha permitido reconocer las especies de microalgas presentes en las mismas.
- ❖ La trazabilidad en productos de las salinas puede ser resuelta con las herramientas moleculares RFLP y secuenciación.
- ❖ La presencia de *Dunaliella salina*, en la sal comercial de las salinas y en la sal rosa (ITC) de nueva producción tecnológica, se identificó mediante los Internals transcript sequence (ITS).
- ❖ La Identificación del alga verde *Nannochloropsis gaditana*, fue verificada utilizando iniciadores 16S rDNA derivados de cianobacterias (CYA106F-CYA781R).
- ❖ La técnica de RFLP con la enzima BesGI, proporciona una herramienta rápida para detectar la presencia de *D. salina* en los productos de las salinas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altermatt F., Fronhofer E.A., Garnier A., Giometto A., Hammes F., Klecka J., Legrand D., Mächler E., Massie T.M., Pennekamp F., Plebani M., Pontarp M., Schtickzelle N., Thuillier V. and Petchey O.L. 2017. Big answers from small worlds: a user's guide for protist microcosms as a model system in ecology and evolution. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(2): 218-231.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic acids symposium series*, Vol. 41: 95-98.
- Muñoz J., Gómez Á., Green A.J., Figuerola J., Amat F. and Rico C. 2008. Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca). *Molecular Ecology*, 17(13): 3160-3177.
- National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. NCBI. [www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide).
- Olmos-Soto J., Paniagua-Michel J., Contreras R. and Trujillo L. 2002. Molecular identification of  $\beta$ -carotene hyper-producing strains of *Dunaliella* from saline environments using species-specific oligonucleotides. *Biotechnology letters*, 24(5): 365-369.
- Ratnasingham S. and Hebert P.D.N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes*, 7: 355-364. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- Sathasivam R., Kermanee P., Roytrakul S. and Juntawong N. 2012. Isolation and molecular identification of  $\beta$ -carotene producing strains of *Dunaliella salina* and *Dunaliella bardawil* from salt soil samples by using species-specific primers and internal transcribed spacer (ITS) primers. *African Journal of Biotechnology*, 11(102): 16677-16687.
- Srivastava A.K., Bhargava P., Kumar A., Rai L.C. and Neilan B.A. 2009. Molecular characterization and the effect of salinity on cyanobacterial diversity in the rice fields of Eastern Uttar Pradesh, India. *Saline systems*, 5(1): 4.