

UNIVERSIDAD DEL MAR

Campus Puerto Ángel



**“CRECIMIENTO Y METABOLISMO DE *Fischerella* sp.
(Stigonematales:Cyanobacteria) ENCAPSULADA CON ALGINATO
DE *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh 1820”**

TESIS

Que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA

Presenta:

ESMERALDA ALONSO SANTOS

Directora de tesis: Dra. Ma. Nieves Trujillo Tapia

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2015.

RESUMEN

Las cianobacterias son organismos procariotes, con una amplia diversidad morfológica y versatilidad metabólica que les ha permitido adaptarse a diversos ambientes, su capacidad para fijar nitrógeno, hacen de ellas microorganismos con potencial biológico para su uso como biofertilizantes y mejoradores de suelos. El alginato es un biopolímero de origen natural. Por sus características de gelificación y porosidad, ha sido aprovechado para el encapsulado de diversos microorganismos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el crecimiento en biomasa de *Fischerella* sp. en vida libre y encapsulada en alginato obtenido del alga gigante *Macrocystis pyrifera*.

La cinética de crecimiento en biomasa en vida libre y encapsulada de *Fischerella* sp. se realizó utilizando cuatro tratamientos que fueron: medio completo BG11N (T1), BG11M sin carbonato de sodio (T2), BG11°N sin nitrógeno y con carbonato de sodio (T3) y BG11°M sin nitrógeno y sin carbonato de sodio (T4), distribuidos al azar en bioreactores de 500 ml. El tiempo de la cinética fue de ocho semanas. Las perlas se elaboraron mediante el método tradicional por goteo con una solución de alginato al 1% con un inóculo de 1% (v/v) de células de *Fischerella* sp. con una densidad óptica de 0.07 (675 nm) en una solución de CaCl₂ al 10%. La evaluación del crecimiento de la cianobacteria se realizó por medio de la determinación del peso seco de la biomasa obtenida. El metabolismo se evaluó por medio de la extracción y cuantificación de amonio NH₄⁺, clorofila "a" y carotenoides totales, carbohidratos y ficobiliproteínas (ficocianinas, aloficocianinas y ficoeritrinas).

El crecimiento de *Fischerella* sp. fue mejor en el T1 con un incremento 2.5 veces mayor de peso seco respecto a los demás tratamientos. La producción de amonio fue mayor en el T1 (16.93 µg mL⁻¹) en vida libre y se incrementó en el encapsulado fue el T3 (45.28 µg mL⁻¹). El metabolismo de la cianobacteria en vida libre fue mayor en medio completo (T1) con las concentraciones de clorofila (4.12 µg mL⁻¹), carotenos (0.84 µg mL⁻¹), ficocianinas (0.039 µg mL⁻¹), aloficocianinas (0.006 µg mL⁻¹), ficoeritrinas (0.041 µg mL⁻¹) y carbohidratos (120.79 µg mL⁻¹). El metabolismo en el encapsulado mostró valores de clorofila (1.52 µg mL⁻¹), carotenos (0.323 µg mL⁻¹), ficocianinas (0.073 µg mL⁻¹), aloficocianinas (0.010 µg mL⁻¹), ficoeritrinas (0.091 µg mL⁻¹) y carbohidratos (126.16 µg mL⁻¹). Se concluye que el T1 es el mejor para el crecimiento y metabolismo primario de la cianobacteria *Fischerella* sp. en vida libre y el T3 para la cianobacteria encapsulada.

DEDICATORIA

A mi madre **Clara Santos Abad.**

A mi padre **Ignacio Alonso Mojica.**

Por su apoyo incondicional, por sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una mejor persona día con día, por ser el mejor ejemplo de perseverancia y constancia que los caracteriza y que me han infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante pero sobre todo por el gran amor que siempre me han brindado. Los amo.

....Por ustedes y para ustedes!!!

Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia no podrá comprender los errores que guían poco a poco a la virtud (Anónimo).

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis Dra. Ma. Nieves Trujillo Tapia que me permitió ser parte del grupo “Cyanobacteria” brindarme su espacio por muchos años, por todos sus consejos, apoyo y por todas las amenas platicas interminables, así como las facilidades para la elaboración de este trabajo.

A los investigadores que conformaron el comité de revisión: Dr. Eustacio Ramírez Fuentes, Dr. Pedro Cervantes Hernández, Dr. Gustavo Hernández Carmona y Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, por sus oportunas observaciones para mejorar el trabajo.

Al Dr. Eustacio Ramirez Fuentes por todos los consejos y el apoyo brindado, por resolver muchas de las dudas a lo largo de este camino, así como las buenas charlas en el laboratorio que hacían más ameno nuestro trabajo.

Al Dr. Pedro Cervantes Hernández por todo su apoyo y asesorías en la parte estadística del trabajo, y por la chispa que lo caracteriza que hicieron más interesantes las clases.

Al Dr. Gustavo Hernández Carmona, por su apoyo, por abrirme las puertas de su laboratorio, brindarme un espacio cálido para aprender las técnicas usadas y por la donación del alginato, así como al equipo de trabajo (M.C. Yoloxochitl Elizabeth, M.C. Dora Luz, Dr. Mauricio Muñoz, Ana, Dania, Miguel, Ara, Valeria y Valerie) del laboratorio de Química de algas CICIMAR-IPN, por el apoyo brindado, las enseñanzas, la diversión y los paseos durante mi estancia en tan maravilloso lugar.

A Gaby Hernández por encaminarme en este maravilloso mundo de las cianobacterias, por toda la paciencia y las enseñanzas.

A Kari, a los delfines (Diego, Victor, Maribel, Jessi, Ada, Caro, Jossio y Doraly) por su compañía y las excelentes platicas, así como a los técnicos de los laboratorios de

ambiental y microbiología, Coral Mirón, Rafa, y Edgar, por la disposición y apoyo en el uso de los equipos y material.

A todas las personas que contribuyeron de manera directa e indirecta para la realización del trabajo.

A mis amigos de generación (Borre, Tavo, Nuevo) y a las niñas hermosas (Karen, Maggie, Maleny y Sairi) por las experiencias compartidas, toda la diversión y ocurrencias pero sobre todo por haberlas conocido, las amo pequeñas, y a ti Karencita por ser la mejor gemela maligna y por ser mi compañera durante este largo pero agradable e inolvidable trayecto de vida.

A todos y cada uno de mis amigos de la universidad, por sus palabras, ánimo, compañía y por su esencia como personas.

A Virgilio, Gonzalo y Armando por todas sus atenciones y enseñanzas, además de su gran amistad.

A mis padres (Clara e Ignacio) por todo el esfuerzo para hacer posible este sueño, y por todo el apoyo en todos los sentidos, sin ustedes no lo habría logrado.

A mis hermanos (Iberth, Edmurth, Yenisey, Benyheuda) por su cariño y apoyo durante todo este tiempo, a mi segunda mamá (Liche) por estar ahí siempre que la necesité y a todos mis sobrinos por regalarme un poco de su inocencia y diversión en cada visita a casa.

A Octavio por todo su cariño, comprensión, consejos y apoyo en todo momento, pero sobre todo por formar parte de mi vida.

A todos ustedes... muchísimas Gracias!!!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	X
GLOSARIO.....	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Generalidades de las cianobacterias	2
2.1.1 Fijación de nitrógeno.....	5
2.1.2 Polisacáridos	6
2.1.3 Pigmentos fotosintéticos	6
2.2 <i>Fischerella</i> sp.....	7
2.3 Alginatos de algas marinas	9
2.3.1 Usos y aplicaciones	10
2.3.2 Composición química.....	10
3. ANTECEDENTES	15
3.1 Crecimiento y metabolismo de cianobacterias con diferentes fuentes de nitrógeno.....	15
3.2 Macro y micro encapsulados de alginato	16
3.3 Encapsulado de cianobacterias	17
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	20
6. OBJETIVOS	20
6.1 General	20

6.2 Específicos.....	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1 Determinación de las características de las perlas de alginato.....	21
7.1.1 Preparación de la solución de alginato	21
7.1.2 Viscosidad de la solución de alginato	21
7.1.3 pH	22
7.1.4 Fuerza de gel.....	22
7.3 Crecimiento de <i>Fischerella</i> sp.....	22
7.2.1 Determinación de biomasa a través peso seco (Arredondo & Votolina 2007)	24
7.2.2 Cuantificación de amonio (APHA1992).....	24
7.2.3 Cuantificación de clorofila “a” y carotenoides totales (Sukenik <i>et al.</i> 1989)	25
7.2.4 Extracción y cuantificación de carbohidratos intracelulares (Dubois <i>et al.</i> 1956).....	25
7.2.5 Extracción y cuantificación de ficobiliproteínas por congelación y descongelación reiterada (Siegelman & Kycia 1978)	26
7.3 Encapsulado celular (Bashan, 1986 y Yabur, 2007)	27
7.4 Análisis estadísticos.....	28
8. RESULTADOS Y DISCUSION.....	32
8.1 Caracterización del alginato.....	32
8.2 Crecimiento de <i>Fischerella</i> sp. en vida libre.....	36
8.2.1 Peso celular seco.....	36
8.2.2 Producción de amonio	39
8.2.3 Producción de carbohidratos intracelulares	40
8.2.4 Producción de pigmentos fotosintéticos.....	43
8.2.4.1 Producción de clorofila y carotenos totales	43
8.2.4.2 Producción de ficobiliproteínas.....	46
8.3.1 Peso seco	52
8.3.2 Producción de amonio.	54

8.3.3 Producción de carbohidratos intracelulares	56
8.3.4 Pigmentos fotosintéticos	58
8.3.4.1 Producción de Clorofila “a”	58
8.3.4.2 Producción de carotenos totales	59
8.3.4.3 Producción de ficobiliproteínas	61
9. CONCLUSIONES.....	66
10. RECOMENDACIONES	67
11. BIBLIOGRAFÍA	68
ANEXOS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento típica, en la cual se muestran las diferentes fases marcadas.	3
Figura 2. <i>Fischerella</i> sp. A: Heterocito, B: Células vegetativas (Tomada por Alonso-Santos 2013).	8
Figura 3. Características estructurales del alginato: a) monómeros de alginato, b) conformación de cadena de alginato, c) distribución de bloques (Draget et al. 2005).	11
Figura 4. Proceso de gelificación del alginato: a) Calcio uniéndose en los sitios de bloques G, b) modelo de caja de huevo por la formación de gel de alginato, c) factores y propiedades que influyen en la formación del gel (FMC 2003).	13
Figura 5. Diseño experimental. T1 BG11°N (S/N+C), T2 : BG11°M (S/N-C), T3 : BG11N (C/N+C), T4 : BG11M (C/N-C), R# : réplicas.	23
Figura 6. Cinética de crecimiento del encapsulado de <i>Fischerella</i> sp. T1: BG11°N (S/N + C), T2: BG11°M (S/N - C), T3: BG11N (C/N + C), T4: BG11M (C/N - C), R#: réplicas, C#: control de perlas sin cianobacterias.	28
Figura 7. Modelo radial de clasificación neuronal para validar P(r). Las capas internas están constituidas por n_{ij} neuronas, que posterior a la señal sináptica, fueron activadas (ac). Coeficientes (cn), umbrales (un), pesos (pn).	30
Figura 8. Viscosidad de las soluciones de alginato, ● sin $(\text{NaPO}_3)_6$, ■ con $(\text{NaPO}_3)_6$	33
Figura 9. Variación de la fuerza de gel en función de la concentración de alginato (%) y la concentración de CaCl_2 (%): ● 5%, ■ 10% y ▲ 20%.	34
Figura 10. a) Variación de la fuerza de gel en respuesta a las concentraciones de Cloruro de Calcio (CaCl_2) --- CaCl_2 (5%), --- CaCl_2 (10%), --- CaCl_2 (20%), b) Variación de la fuerza de gel en respuesta a las concentraciones de alginato de calcio --- alginato (1%), --- alginato (2%), --- alginato (3%).	35
Figura 11. Peso seco de <i>Fischerella</i> sp. en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N y △ BG11M	37
Figura 12. Producción de amonio de <i>Fischerella</i> sp. en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N y △ BG11M.	39
Figura 13. Producción de carbohidratos de <i>Fischerella</i> sp. en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N y △ BG11M.	42

Figura 14. Producción de clorofila “a” de <i>Fischerella</i> sp. en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N y △ BG11M.	44
Figura 15. Producción de carotenos totales de <i>Fischerella</i> sp. en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N y △ BG11M.....	45
Figura 16. Producción de ficocianinas (FC) de <i>Fischerella</i> sp. en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N y △ BG11M.....	47
Figura 17. Producción de aloficocianinas (AFC) de <i>Fischerella</i> sp. en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N y △ BG11M.....	48
Figura 18. Producción de ficoeritrinas (FE) de <i>Fischerella</i> sp. en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N y △ BG11M.....	49
Figura 19. Peso seco (PS) de <i>Fischerella</i> sp. encapsulada en los diferentes medios de cultivo; ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N, △ BG11M y ● control.....	53
Figura 20. Producción de amonio (NH ₄ ⁺) de <i>Fischerella</i> sp. encapsulada en los diferentes medios de cultivo; ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N, △ BG11M y ● control.	55
Figura 21. Producción de carbohidratos de <i>Fischerella</i> sp. encapsulada en los diferentes medios de cultivo; ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N, △ BG11M y ● control.	57
Figura 22. Producción de Clorofila “a” de <i>Fischerella</i> sp. encapsulada en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N, △ BG11M y ● control.	58
Figura 23. Producción de carotenos totales de <i>Fischerella</i> sp. encapsulada en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N, △ BG11M y ● control.	60
Figura 24. Producción de ficocianinas (FC) de <i>Fischerella</i> sp. encapsulada en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N, △ BG11M y ● control.	62
Figura 25. Producción de aloficocianinas (AFC) de <i>Fischerella</i> sp. encapsulada en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N, △ BG11M y ● control.	62
Figura 26. Producción de ficoeritrinas (FE) del encapsulado de <i>Fischerella</i> sp. en los diferentes medios de cultivo, ■ BG11°N, □ BG11°M, ▲ BG11N, △ BG11M y ● control.	63
Figura 27. Curva de calibración de amonio	81
Figura 28. Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos.	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Composición de los bloques monoméricos de alginatos según su fuente de origen.....	12
Tabla II. Coeficientes estimados para validar la P(r) de las concentraciones de alginato y CaCl ₂ . Coeficientes (cn), umbrales (un), Pesos (pn).....	36
Tabla III. Crecimiento y metabolitos evaluados en la cinética de crecimiento de <i>Fischerella</i> sp., Amonio (NH ₄ ⁺), peso seco (PS), Clorofila “a” (Cl “a”), carotenos (CA), ficocianinas (FC), aloficocianinas (AFC), ficoeritrinas (FE) y carbohidratos (CHOS).	51
Tabla IV. Crecimiento y metabolitos evaluados en la cinética de crecimiento del encapsulado de <i>Fischerella</i> sp., peso seco (PS), Amonio (NH ₄ ⁺), Clorofila “a” (Cl “a”), carotenos (CA), Ficocianinas (FC), Aloficocianinas (AFC), Ficoeritrinas (FE) y carbohidratos (CHOS).	65
Tabla V. Preparación de medios BG11°N y BG11°M.	79
Tabla VI. Preparación de medios BG11N y BG11M.	80
Tabla VII. Reactivos para la cuantificación de amonio.	80
Tabla VIII. Concentraciones para la elaboración de la curva de calibración de amonio.	81
Tabla IX. Concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva de calibración de carbohidratos.....	82