

UNIVERSIDAD DEL MAR

Campus Puerto Ángel



AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, TOXICIDAD Y CONDICIONES
AMBIENTALES ASOCIADAS A LAS ESPECIES DEL GÉNERO
Pseudo-nitzschia EN LA BAHÍA DE PUERTO ÁNGEL, OAXACA Y
SITIOS ALEDAÑOS

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

Licenciado en Biología Marina

Presenta:

Gustavo Oviedo Piamonte

Dirigido por:

Dra. Ivonne S. Santiago Morales

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, México, Septiembre de 2016.

RESUMEN

Pseudo-nitzschia es un género de diatomea marina que incluye algunas especies capaces de producir la potente neurotoxina ácido domoico (AD). Esta neurotoxina puede afectar a diferentes organismos de la red trófica, como aves y mamíferos marinos e inclusive a humanos. En el Estado de Oaxaca la información sobre la presencia de este género es escasa. En el presente estudio se evaluaron las características de crecimiento de cepas de *Pseudo-nitzschia*, aisladas de muestras provenientes de la región. Se caracterizaron, las condiciones ambientales asociadas a la presencia del género *Pseudo-nitzschia* en la Bahía de Puerto Ángel y sitios aledaños así como su capacidad de producción de AD en cultivo. Las cepas fueron identificadas morfológicamente a través del uso de microscopía óptica y micrografías obtenidas en Microscopio Electrónico de Transmisión (MET, o TEM, en inglés). La identificación molecular se realizó mediante el marcador genético del espaciador interno transcrito ITS (ITS1, 5.8S, e ITS2) del ADNr codificado en el núcleo. La estructura secundaria del ITS2 de todas las especies fue modelada para observar la variabilidad genética. Finalmente se evaluó la capacidad de producción de AD en cultivo (HPLC-UV). Durante el periodo de estudio se registró una proliferación de especies de *Pseudo-nitzschia* que se asoció a una limitación por fosfatos y bajas temperaturas. Mediante características morfológicas se identificó a *P. cuspidata* (**Pn3**), *P. brasiliiana* (**Pn5**) y *P. dolorosa* (**Pn7**) mientras que por técnicas moleculares se identificaron dos cepas de *P. brasiliiana* (**Pn1** y **Pn6**) así como a *P. dolorosa* (**Pn2**) y *P. decipiens* (**Pn4**). La presencia de algunos Cambios de Base Compensatorias (CBC's) y Cambios de Base semi-compensatorias (CBSC's) en las cepas **Pn2**, **Pn3**, **Pn4** y **Pn6** indican que podrían tratarse de especies con genotipos diferentes. La presencia en la zona de cepas con potencial tóxico, como *P. brasiliiana* (**Pn5**) productora de AD y *P. cuspidata* identificada en otros estudios como potencialmente tóxica, aunado al registro de una proliferación del género *Pseudo-nitzschia* representa un riesgo para el área de estudio. Por lo que se sugiere ampliar el monitoreo e incluir ensayos de compatibilidad sexual y fisiológicos para complementar los resultados del presente trabajo.

Palabras clave: *Pseudo-nitzschia*, Oaxaca, Ácido Domoico, ITS2, MET, Técnicas moleculares.

ABSTRACT

Pseudo-nitzschia is a genus of marine diatom including some species able to produce the potent neurotoxin domoic acid (DA). This neurotoxin can affect different organisms of the food chain like birds, marine mammals, and even humans. In the State of Oaxaca information on the presence of this genus is scarce. In the present study the growth characteristics of *Pseudo-nitzschia* strains isolated from the region were evaluated. Environmental conditions associated with the presence of the genus *Pseudo-nitzschia* at the Bay of Puerto Angel and neighboring sites as well as its capacity to produce DA in culture were characterized. The strains were morphologically identified through the use of optical microscopy and micrographs obtained from Transmission Electron Microscopy (TEM). The molecular identification was performed by the genetic marker internal transcribed spacer ITS (ITS1, 5.8S, and ITS2) rDNA encoded in the nucleus. ITS2 secondary structure of all species was modeled to observe genetic variability. Finally, the capacity to produce DA in each culture was tested (HPLC-UV). During the period of study a proliferation of *Pseudo-nitzschia* species that was associated with phosphate limitation and low temperatures was register. *P. cuspidata* (**Pn3**), *P. brasiliiana* (**Pn5**), and *P. dolorosa* (**Pn7**) were identified by their morphological characteristics while two strains of *P. brasiliiana* (**Pn1** and **Pn6**), *P. dolorosa* (**Pn2**), and *P. decipiens* (**Pn4**) were identified by molecular techniques. The presence of some Compensatory Base Changes (CBC's) and Semi-compensatory Base Changes (HCBC's) in the strains **Pn2**, **Pn3**, **Pn4** and **Pn6**, indicate that they could be species with different genotypes. The presence of toxic potential strains in the area, like *P. brasiliiana* (**Pn5**) a domoic acid producer and *P. cuspidata* identified in other studies as potentially toxic, together with a *Pseudo-nitzschia* proliferation record represent a risk for the study area. Therefore the research suggests expanding the monitoring and including sexual compatibility and physiological tests to complement the results of this work.

Key words: *Pseudo-nitzschia*, Oaxaca, Domoic Acid, ITS2, TEM, Molecular techniques.

Para Manu por alegrar aquellos días de juventud. Una larga caminata, pescar y horas de diversión nadando. Pero sobre todo por ser un gran maestro y amigo. Gracias una vez más hermano, por toda la felicidad que me brindaste cuando eramos niños.

A mis padres Arnulfo Oviedo Pinzón y Timotea Piamonte Larrinzar, por ser mi más grande ejemplo. Por todos los sacrificios que han hecho por mí y cada uno de mis hermanos. Estoy seguro que no fué fácil educar a diez hijos, pero quiero decirles que han hecho un gran trabajo. Gracias por toda la confianza, el apoyo y el amor que nos dan.

Mangüy ikon teat Dios.

A Miguel Ángel (Migue), Ketzaly (Kety), Francisco (Chico), Gabriel (Gabo), Lorena, Alondra (Ganso), Iker (Enano) y Chochito... porque han sido un motor para mí, por ser motivo y razón de ser y porque me alientan a querer cambiar aunque sea una pequeña fracción de este mundo. Jamás olviden que ustedes son las semillas de esperanza en la tierra. Dentro de ustedes arde con intensidad la llama que alumbrará a las siguientes generaciones. Creo en ustedes y mi deber es ser un ejemplo para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecer a mi maestra; la Dra. Ivonne S. Santiago Morales, por reclutarme para la realización del servicio social y aceptarme como su pupilo para la realización de este trabajo. Estoy seguro de que la volví loca más veces de las que se puede admitir, pero doy gracias por sus exigencias para que el trabajo saliera bien. Por apretar pero sin asfixiar. En fin; ha sido un privilegio para mí trabajar con usted, por todas las facilidades que nos da y sobre todo por las lecciones que he aprendido con usted. Como decimos los Ikoots –*Mangüy ik teat Dios Ivonne-*

Al proyecto “Calidad sanitaria, aislamiento e identificación de *Salmonella* sp. en muestras de ostión”. Proyecto financiado por la Universidad del mar con Clave de la unidad Programática (CUP): 2IR1201. Las muestras para la realización de este trabajo se obtuvieron de este proyecto.

Al proyecto “Variación estacional y potencial tóxico de especies del género *Pseudo-nitzschia* en la costa de Oaxaca” perteneciente a la convocatoria CONACyT-CB-2012-01.

Al proyecto 255733 “Actualización y Ampliación de la infraestructura para fortalecer la línea de investigación sobre Toxicología Ambiental relacionada a Florecimientos Algales Nocivos” perteneciente a la convocatoria CONACyT-INFR2015.

A los miembros del comité revisor: M. en C. Yolanda Huante, al M. en C. Saúl Serrano, a la Dra. Sonia Quijano y al Dr. Ernesto García. Gracias por dedicar su tiempo a la revisión del manuscrito, sus comentarios y valiosas sugerencias ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al Dr. Aramis Olivos Ortiz del CEUNIVO en la Universidad de Colima, por la ayuda con el análisis de nutrientes y por facilitar los datos empleados en este trabajo.

A la Dra. Sonia Quijano-Scheggia por aceptarme como estudiante durante mis estancias en la Universidad de Colima. Gracias por entrenarme en la parte de técnicas moleculares, por compartir sus papers conmigo y por sus consejos y sugerencias.

Al Dr. Yuri Okolodkov (Laboratorio de Botánica Marina y Planctología, Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías de la Universidad Veracruzana) y a Manuel E. Martínez-Cruz (Instituto Tecnológico de Boca del Río) quienes nos ayudaron con el procesamiento de las muestras para Microscopía Electrónica.

A Luis F. Jiménez-García y Reyna Lara-Martínez (Facultad de Ciencias, Depto. Biología Celular. UNAM) por el apoyo en la toma de fotografías en Microscopio Electrónico de Transmisión.

A mis maestros de buceo y amigos: Heladio Espíndola “el Capitán”, a Andrés Pacheco “el Potro” y al Prof. Saúl Serrano. Me siento honrado de haber buceado con ustedes. Aprendí mucho en esas salidas de campo. Gracias por su valiosa ayuda en la obtención de muestras y por enseñarme a conocer el mar desde adentro.

Al Sr. Sixto, porque hizo amenas las salidas de campo y por asumir la importante labor de transportarnos.

Al señor Celso porque siempre está dispuesto a ayudar. Por las charlas, las botanas y las clases de abrir ostiones y callos.

A los Laboratorios de Investigación Química y Biología y al Laboratorio de Genética y Microbiología, en especial a Edgar, Irene y Susana quienes siempre se portaron amables y accesibles conmigo.

Al camarada Luis Enrique por su valiosa ayuda con el cartel durante aquella odisea en Metepec.

Al Prof. Joseph Stanley Peretto por la revisión del resumen en inglés.

A todo el equipo LARVATRON: Sarah, Caro, Kike, Sadot, Andehui, Caro (posgrado), Miriam, Ángeles, Bob, Marco, Bany, Irene, Blanca y Victoria. Ustedes hacen que el Labo funcione jóvenes, pero recuerden que trabajar demasiado no es sano.

A mis tías Aurelia, Margarita, Rosa y Adela, porque son un ejemplo de trabajo y esfuerzo para mí. Durante todo este tiempo me han apoyado con sus palabras de motivación y me han enseñado que por difícil que parezcan las cosas nunca debo rendirme. Siempre las tengo presentes.

A mis hermanos: Vero, Carlos, Poncho, Anita, Mari, Juani, Lupita y Migue por el apoyo, la confianza y paciencia durante este largo trayecto. Siento mucho mis ausencias y todas las molestias que les he causado. Gracias por existir y estar ahí siempre que los he necesitado.

A Margarita Mejía –Mago- por su ayuda con la elaboración del mapa y por acompañarme buena parte del camino.

A Maleni por esa alegría y optimismo al parecer inagotables.

A las amables personas de Puerto Ángel quienes nunca me negaron su ayuda cuando más lo necesité, especialmente a Doña Flor y Naul, a Doña Luz y familia y Don Pino.

También quiero agradecer y dedicar unas líneas especiales a mis amigos...

José gran compañero y amigo desde los comienzos. Te agradezco las clases de música, las lecciones filosóficas y las largas horas de charla. Estoy seguro que algunas amistades son tan fuertes que incluso pueden trascender la vida.

Robert que puedo decirte a ti; gracias no es suficiente y no hay palabras para expresarte mi gratitud. Han sido tantas las aventuras que la lista es extensa. He aprendido mucho de ti y espero seguir haciéndolo. Te aseguro amigo mío que nuestra amistad será casi una leyenda.

Eliseo creo que he sido afortunado en conocerte. Gracias por compartir esa filosofía hacia el mar, la fuerza y por ser mi hermano de espada. Yo también quiero ser de esos tíos excepcionales que regalan cosas raras (como una cabeza encogida)...ahhhh Ricky quisiera vivir otros cien años tan solo para prolongar tu recuerdo.

Los Guanajuatos Raúl y Jessica por los maratones de películas y porque sé que aunque no es suya la frase me enseñaron que “Más vale perder el tiempo con los amigos que a los amigos con el tiempo”.

Marifer eres una persona súper, te agradezco la compañía y por la humanidad que muestras para ayudar a los demás. Gracias por ser honesta y sincera conmigo.

Hugo y Jasibe porque siempre estaré en deuda con ustedes por su incondicional ayuda con el accidente en bici.

A Saraho mi joven *Padawan*. Ha sido agradable compartir tantas cosas en común contigo. De lo único que me arrepiento es de no haberte conocido antes. Gracias por amotinarte conmigo y por ser mi mejor aprendiz.

Y desde luego a

Nangaj ndek kos nej ajaw meawan leaw sandiem, aton angueüy leaw sasaj. Nej üech mien wüex ximeats meawan leaw sarangan sajngoton mien sakiüb xi xide Manu. Malüy nde xiüm mi yow. Malüy iliün mijlüy wüex alekuw xi kual akiüb mi kual nejiw pa majrokoj tiül ik ante xi sarang...

Nunca sabré como hubieran sido las cosas sin el apoyo de todos ustedes, así que como dijo el gran Gustavo Cerati...

Gracias totales!!

ÍNDICE

Contenido	Página
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Identificación de especies del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	5
2.2. Factores que afectan el crecimiento en especies del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	9
2.3. Factores que afectan la producción de AD en <i>Pseudo-nitzschia</i>	11
2.4. Estudios sobre el género <i>Pseudo-nitzschia</i> en México	12
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS	16
5.1. General	16
5.2. Particulares	16
6. ÁREA DE ESTUDIO	17
6.1. Ubicación geográfica	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS	20
7.1. Obtención de muestras	20
7.2. Aislamiento y cultivo de cepas de <i>Pseudo-nitzschia</i>	20
7.3. Análisis de la comunidad fitoplanctónica	21
7.4. Análisis de nutrientes	21
7.5. Identificación de especies del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	22
7.5.1. Características morfométricas	22
7.5.2. Técnicas moleculares	23
7.5.2.1. Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación	23
7.5.2.2. Alineamiento y análisis filogenético	24
7.5.2.3. Análisis de la estructura secundaria del ITS2	24
7.6. Cuantificación de Ácido Domoico	25
8. RESULTADOS	26
8.1. Variables fisicoquímicas	26
8.1.1. Temperatura	26
8.1.2. Oxígeno disuelto	27
8.1.3. Salinidad y pH	27
8.2. Aislamiento y cultivo de cepas de <i>Pseudo-nitzschia</i>	27
8.3. Análisis de la comunidad fitoplanctónica	29
8.4. Análisis de nutrientes	30
8.5. Características morfométricas	31
8.6. Alineamiento y análisis filogenético	36
8.7. Estructura secundaria del ITS2	38
8.8. Cuantificación de Ácido Domoico	44

9.	DISCUSIÓN	45
	9.1. Variables fisicoquímicas	45
	9.2. Nutrientes y razones de nutrientes	46
	9.3. Análisis de la comunidad fitoplanctónica	48
	9.4. Crecimiento celular	50
	9.5. Características morfométricas	52
	9.6. Alineamiento y análisis filogenético	53
	9.7. Estructura secundaria del ITS2	54
	9.8. Cuantificación de Ácido Domoico	56
10.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
	REFERENCIAS	61
	ANEXOS	79
	ANEXO A.- Datos morfométricos de especies del género <i>Pseudo-nitzschia</i> .	79
	ANEXO B.- Cepas de <i>Pseudo-nitzschia</i> usadas en el análisis filogenético. Se muestra el origen, la designación de la cepa, el número de acceso en el Genbank y la referencia.	96
	ANEXO C.- Lista de especies del fitoplancton presentes durante el periodo de estudio.	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Área de Estudio durante el periodo de noviembre 2011 a marzo 2013.	19
2	Características morfométricas y ultraestructurales de las especies de <i>Pseudo-nitzschia</i> . A) Amplitud y L) Longitud Valvar. E) Estrías, F) Fíbulas, I) Interestrías, P) Poroides y en el recuadro inferior derecho un poroide simple. (Foto: Yuri Okolodkov).	22
3	Variación de la temperatura superficial del mar (TSM, °C) en Puerto Ángel, La Mina y La Tijera durante el periodo comprendido entre noviembre de 2011 y marzo de 2013.	26
4	Variación del oxígeno disuelto en aguas superficiales en Puerto Ángel, La Mina y La Tijera durante el periodo comprendido entre noviembre de 2011 y marzo de 2013.	27
5	Crecimiento poblacional de cepas de <i>Pseudo-nitzschia</i> aisladas en la zona de Estudio. La línea representa el ajuste al modelo de Gompertz.	28
6	<i>Pseudo-nitzschia cuspidata</i> . Cepa Pn3 . Micrografías de luz. (A) Células en vivo mostrando el traslape celular. Micrografías TEM. (B) Forma de las puntas valvares. (C) Fíbulas, estrías y líneas de poroides. (D) Parte media de la célula mostrando la presencia del nódulo central. (E) Patrón de formación de los poroides. (Foto A: Ivonne Santiago. Fotos B, C, D y E: Yuri Okolodkov).	32
7	<i>Pseudo-nitzschia brasiliiana</i> . Cepa Pn5 . Micrografías de luz. (A) Células en vivo mostrando el traslape celular. Micrografías TEM. (B) Forma de las puntas valvares. (C) Fíbulas, estrías y poroides. (D) Líneas de Poroides. (E) Patrón de formación de los poroides. (Foto A: Ivonne Santiago. Fotos B, C, D y E: Yuri Okolodkov).	33
8	<i>Pseudo-nitzschia dolorosa</i> . Cepa Pn7 . Micrografías de luz. (A) Células en vivo mostrando el traslape celular. Micrografías TEM. (B) Forma de las puntas valvares. (C) Fíbulas, estrías y líneas de poroides. (D) Parte media de la célula mostrando la presencia del nódulo central. (E) Patrón de formación de los poroides. (Foto A: Ivonne Santiago. Fotos B, C, D y E: Yuri Okolodkov).	34
9	Árbol filogenético del vecino más cercano (Neighbor-Joining) del análisis del ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr con los valores de remuestreo (Bootstrap) de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood), máxima parsimonia (Maximum Parsimony) e inferencia bayesiana (Bayesian Inference). El árbol es enraizado. Las ramas en negritas indican un valor del 100 % en todos los análisis. Las letras en negritas indican las cepas del presente estudio.	37
10	Estructura secundaria del ITS2 del ADNr de <i>Pseudo-nitzschia brasiliiana</i> . La estructura general representa a la cepa Pn1 del	39

- presente estudio. Se muestran además, las principales diferencias respecto a la cepa **Pn6**. Las regiones donde se observaron sitios polimórficos (SNP) se muestran en círculo. Las regiones donde se observaron CBC's se muestran en los rectángulos sombreados y las flechas indican los HCBC's. Los círculos negros indican las regiones donde se observaron inserciones de nucleótidos. Se muestra la numeración de las hélices (I-IV) así como la hélice adicional IIa
- 11 Estructura secundaria del ITS2 del ADNr de *Pseudo-nitzschia dolorosa*. La estructura general representa a la cepa **Pn2** del presente estudio. Las regiones donde se observaron sitios polimórficos (SNP) se muestran en círculo. Las regiones donde se observaron CBC's se muestran en los rectángulos sombreados y las flechas indican los HCBC's. Los círculos negros indican las regiones donde se observaron inserciones de nucleótidos. Se muestra la numeración de las hélices (I-IV) así como la hélice adicional IIa. 41
- 12 Estructura secundaria del ITS2 del ADNr de *Pseudo-nitzschia cuspidata*. La estructura general representa a la cepa **Pn3** del presente estudio. Las regiones donde se observaron sitios polimórficos (SNP) se muestran en círculo. Las regiones donde se observaron CBC's se muestran en los rectángulos sombreados y las flechas indican los HCBC's. Los círculos negros indican las regiones donde se observaron inserciones de nucleótidos. Se muestra la numeración de las hélices (I-IV) así como la hélice adicional IIa. 42
- 13 Estructura secundaria del ITS2 del ADNr de *Pseudo-nitzschia decipiens*. La estructura general representa a la cepa **Pn4** del presente estudio. Las regiones donde se observaron sitios polimórficos (SNP) se muestran en círculo. Las regiones donde se observaron CBC's se muestran en los rectángulos sombreados y las flechas indican los HCBC's. Los círculos negros indican las regiones donde se observaron inserciones de nucleótidos. Se muestra la numeración de las hélices (I-IV) así como la hélice adicional IIa. 43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Parámetros poblacionales de las cepas de <i>Pseudo-nitzschia</i> aisladas.	29
II	Concentraciones de nutrientes durante el periodo de estudio.	31
III	Caracteres morfológicos de las cepas Pn3 , Pn5 y Pn7 . Se muestran los datos morfométricos para <i>P. brasiliana</i> (n=16), <i>P. cuspidata</i> (n=13) y <i>P. dolorosa</i> (n= 16) comparadas con estudios anteriores. Los intervalos representan mínimos y máximos y en cursiva el promedio ± desviación estándar.	35