

UNIVERSIDAD DEL MAR

Campus Puerto Ángel



ESPECIES DEL GÉNERO *Pseudo-nitzschia* DE LA ZONA COSTERA PUERTO ESCONDIDO-SANTA ELENA, OAXACA.

TESIS

Como parte de los requisitos para obtener el título profesional de
Licenciada en Biología Marina

Presenta:

María de los Ángeles Horta García

Director

Dra. Ivonne Sandra Santiago Morales

Co-Director

Dr. Ernesto García Mendoza

Puerto Ángel, Oaxaca, 2018

“Las ideas son como las estrellas, no llegarás a tocarlas con las manos, pero como el marinero en el desierto de las aguas, las eliges como guía y si las sigues alcanzarás tu destino”.

Carl Schurz

DEDICATORIA

A mis padres María Concepción y Marco Antonio, quienes me apoyaron incondicionalmente, por sus palabras de aliento, confianza y paciencia en el transcurso de estos años, porque gracias a ustedes soy la persona que soy. A mis hermanos David y Marcos por su apoyo y compañía en tiempos difíciles y otros no tanto.

AGRADECIMIENTOS

Para poder llevar a cabo este trabajo necesité la inestimable ayuda y el apoyo de gran cantidad de gente, espero no olvidarme de nadie.

Gracias por todo Mamá y Papá por darme siempre lo mejor, su amor, confianza y esta bella profesión. Porque han sido un ejemplo a seguir, y por su apoyo durante toda mi vida personal y profesional. Les agradezco de todo corazón que estén a mi lado, los amo. Mami, te agradezco con todo mi corazón que me hayas impulsado y ayudado a estudiar, que siempre te encontraras a mi lado, en las alegrías y tristezas, tú siempre has sido para mí una súper mujer que me ha enseñado a luchar en la vida, eres mi admiración y fortaleza. Ahora que culmino este maravilloso ciclo te doy las gracias porque todo es la culminación de tus esfuerzos. Papi, te agradezco todos los esfuerzos realizados, la ayuda que siempre me has brindado, la disponibilidad que has mostrado para ayudarme y escucharme, porque desde niña me has enseñado la honradez, la honestidad, la perseverancia, el valor de la amistad y el amor por la familia, ahora que culmino el camino profesional es también tú culminación de todos los esfuerzos que hiciste.

A mí Directora, la Dra. Ivonne Santiago por tenerme paciencia, por su apoyo en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de este escrito, sino también en el transcurso de mi carrera, sé que sin su ayuda esto no se habría conseguido, además de todas las oportunidades y consejos que me ha brindado en el transcurso de mi carrera y en mi formación personal, gracias a sus conocimientos me he adentrado en el campo de la investigación. Gracias por ser mi mentora y amiga.

Al Dr. Ernesto García por recibirme en el laboratorio de Biología Algal en CICESE para la realización de mis estancias, así como apoyarme como Co-director de esta tesis, por el tiempo invertido en ella, gracias.

A la Universidad del Mar por albergarme y permitir desarrollarme como estudiante, a su personal académico y estudiantes que de una u otra forma interactuaron conmigo y me dieron un ambiente amable para dedicarme a mis estudios.

A mis sinodales la Dra. Sonia Quijano Scheggia, M.C. Yolanda Huante González, Dra. Genoveva Cerdaneres Ladrón de Guevara por su apoyo y atenciones que tuvieron conmigo, así como por sus aportaciones, sugerencias y revisiones que tuvieron a bien mejorar el manuscrito de esta tesis. Agradezco su buena disposición.

A los proyectos: CONACyT-CB2012 (No. 178145) e INFR-2015 (No. 255733), que permitieron el desarrollo del presente trabajo.

A la Red temática sobre Florecimientos Algales Nocivos (RedFAN) por su apoyo en el transcurso de mi licenciatura.

Al CICESE por permitirme el uso de sus instalaciones durante mis estancias profesionales.

Al Dr. Ricardo Cruz López por compartir sus conocimientos conmigo, por el tiempo brindado durante mi estancia en CICESE.

A Jeni, Mony y Luz por ser más que amigas, por esa hermandad brindada, por estar en las buenas y en las malas, por creer en mí y por apoyarme un sinfín de ocasiones, por hacer estos cinco años tan amenos y divertidos.

A mis amigos y compañeros Marco, Bell, Karen, Amauri, Martha, Scarlet, Paco, Ibrahim, Isaac, Itzahí y Julio muchas gracias por estar conmigo en todo este tiempo donde he vivido momentos felices y tristes, por hacer más llevadero el largo camino, gracias por su amistad y compañerismo.

A Cinthya, Vicky y Carmen por enseñarme que la distancia no es impedimento para la amistad, por su apoyo en momentos difíciles, pero sobretodo por aquellos momentos en los que me impulsaron a ser mejor.

A ti que comenzaste este sueño conmigo y a pesar de que nuestros caminos se bifurcaron muy temprano siempre has estado a mi lado, alentándome a la distancia, apoyándome y sacándome una sonrisa para poder continuar.

A todo el equipo LARVATRON, Abraham, Danay, Caro, Caro Cruz, Blanca, Irene, Miriam, Sara, Tavo, Bany, Lili por todos aquellos momentos juntos, por la compañía y apoyo brindado.

Al equipo de trabajo de Biología Algal y FICOTOX por la forma de recibirme y por su apoyo durante mi estancia en CICESE, a Yaireb por todo el apoyo que me brindaste, por salvarme de tantas ocasiones que estuve en colapso, a Michelle y Valeria por enseñarme que una amistad no lleva años en forjarse, mientras sea sincera, a Axel, Ramón, Jenifer, Viridiana y Patricia.

A todos mis maestros y compañeros de la licenciatura, porque sin el apoyo que brindaron en las aulas no sería igual, gracias al compañerismo que me brindaron.

A todos y cada uno de mis familiares, que de una u otra manera celebran mi éxito.

Finalmente a todas aquellas personas que han y están marcando mi vida y que me han permitido ser parte de la suya, aquellos que han separado su camino y los que ahora caminan conmigo, y quienes confiaron en mí de una u otra forma para dejar huella en esta vida, a no pasar desapercibida, y a seguir siendo quien soy ahora.

A todos muchas gracias.

ÍNDICE

Contenido	Página
DEDICATORIAS	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABLAS	XV
RESUMEN	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. <i>Pseudo-nitzschia</i>	19
1.1.1. Morfología y taxonomía	19
1.1.2. Factores que afectan el crecimiento del género <i>Pseudo-nitzschia</i> y ciclo de vida	23
1.1.3. Producción de AD	25
1.1.4. Biosíntesis de AD	26
2. ANTECEDENTES	29
2.1. Identificación del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	29
2.2. Producción de AD y crecimiento de <i>Pseudo-nitzschia</i>	30

2.3. El género <i>Pseudo-nitzschia</i> en México	31
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPOTESIS	34
5. OBJETIVOS	35
5.1. Objetivo general	35
5.2. Objetivos particulares	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1. Área de estudio	36
6.2. Trabajo de campo	37
6.3. Trabajo de laboratorio	37
6.3.1. Cultivo de cepas de <i>Pseudo-nitzschia</i>	37
6.3.2. Identificación de especies del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	38
6.3.2.1. Caracterización morfométrica	38
6.3.2.2. Identificación por Hibridación fluorescente <i>in situ</i> de células completas (FISH-WCH)	38
6.3.3. Crecimiento poblacional	39
6.3.4. Evaluación de concentración de AD	40

7. RESULTADOS	41
7.1. Cultivos de cepas del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	41
7.2. Caracterización morfológica	41
7.2.1. <i>Pseudo-nitzschia brasiliensis</i> Lundholm, Hasle, Fryxell y Hargraves 2002	41
7.2.2. <i>Pseudo-nitzschia americana</i> (Hasle) Fryxell 1993	44
7.2.3. <i>Pseudo-nitzschia cf. roundii</i> Hernández-Becerril 2006	47
7.2.4. <i>Pseudo-nitzschia cf. decipiens</i> Lundholm y Moestrup 2006	50
7.2.5. <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> (H. Takano) H. Takano 1995	53
7.2.6. <i>Pseudo-nitzschia cf. pungens</i> (Grunow y Cleve) Hasle 1993	56
7.3. Identificación molecular	59
7.4. Crecimiento poblacional de cepas aisladas	61
7.4.1. <i>Pseudo-nitzschia brasiliensis</i>	61
7.4.2. <i>Pseudo-nitzschia americana</i>	62
7.4.3. <i>Pseudo-nitzschia cf. roundii</i>	63
7.4.4. <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>	64
7.5. Evaluación de concentración de AD	66

8. DISCUSIONES	67
8.1. Distribución, taxonomía, crecimiento y toxicidad del complejo <i>Pseudo-nitzschia americana</i>	67
8.2. Distribución, taxonomía, crecimiento y toxicidad <i>Pseudo-nitzschia</i> <i>roundii</i>	70
8.3. Distribución, taxonomía, crecimiento y toxicidad <i>Pseudo-nitzschia</i> <i>decipiens</i>	71
8.4. Distribución, taxonomía, crecimiento y toxicidad <i>Pseudo-nitzschia</i> <i>multistriata</i>	72
8.5. Distribución, taxonomía, crecimiento y toxicidad <i>Pseudo-nitzschia</i> <i>pungens</i>	73
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
REFERENCIAS	76
ANEXOS	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Morfología del género <i>Pseudo-nitzschia</i> (caracterizada por TEM). A) Célula completa (escala 5 µm), B) Caracteres ultraestructurales (escala 1 µm): (a) Nódulo central, (b) Fíbulas, (c) Estrías, (d) Interestrías, (e) Poroides.	21
Figura 2. Estructura del himen de los poroides en especies del género <i>Pseudo-nitzschia</i> . (a) Poroides simple; (b-g) Poroides en sectores: (b y c) Dos a tres sectores; (d y e) cuatro sectores; (f y g) cinco o más sectores. Modificado de Lundholm <i>et al.</i> 2003, Lim <i>et al.</i> 2013a, Teng <i>et al.</i> 2013.	21
Figura 3. Estructura del ácido domoico. Tomada de Kalaitzis <i>et al.</i> 2010.	26
Figura 4. Propuesta de la ruta biosintética del ácido domoico basada en experimentos de incorporación de C ¹³ -acetato (Kalaitzis <i>et al.</i> 2010).	27
Figura 5. Zona de estudio. Costa de Oaxaca y zonas donde se recolectaron muestras de agua para el aislamiento de cepas de <i>Pseudo-nitzschia</i> .	37
Figura 6. Características ultraestructurales de <i>Pseudo-nitzschia brasiliiana</i> . Las fotografías tomadas con TEM muestran a) Valva completa (escala 5 µm); b) centro de la valva sin nódulo central (escala 0.5 µm); c y d forma de las puntas (escala 1 y 0.5 µm); e) estructura y patrón de los poroides (escala 0.1 µm); f) 2 poroides de altura en el manto valvar proximal (escala 0.2 µm).	43
Figura 7. Características ultraestructurales de <i>Pseudo-nitzschia americana</i> . Las fotografías tomadas con TEM muestran a) Valva completa (escala 5 µm); b y c) centro de la valva sin nódulo central (escala 0.5 y 1 µm); d) forma de punta (escala 1 µm); e) estructura y patrón de los poroides (escala 0.2 µm).	46
Figura 8. Características ultraestructurales de <i>Pseudo-nitzschia cf. roundii</i> . Las fotografías tomadas con TEM muestran a) Valva completa (escala 5 µm); b) centro valvar con nódulo central (escala 1 µm); c) forma de las puntas (escala 1.5 µm); d) patrón de estrías y fíbulas (escala 0.5 µm); e y f) patrón y forma de poroides (escala 0.2 y 0.1 µm).	49

- Figura 9.** Características ultraestructurales de *Pseudo-nitzschia cf. decipiens*. Las fotografías tomadas con TEM muestran a) Valva completa (escala 5 μm); b y c) centro de la valva con nódulo central (Escala 1 y 0.5 μm); d) forma de las puntas (escala 1 μm); e) estructura y patrón de los poroides (escala 0.1 μm). 52
- Figura 10.** *Pseudo-nitzschia multistriata*. a) Células *in vivo* (escala 10 μm). Características ultraestructurales. Las fotografías tomadas con TEM muestran b) Valva completa (escala 5 μm); c) forma de las puntas (escala 1 μm); d) centro de la valva sin nódulo central (escala 1 μm); e) patrón de estrías y fíbulas (escala 0.5 μm); f) estructura y patrón de los poroides (escala 0.2 μm). 55
- Figura 11.** *Pseudo-nitzschia pungens*. a) Cadena de células mostrando traslape celular (escala 20 μm). Características ultra estructurales. Las fotografías tomadas con TEM muestran: b) Punta de la valva (escala 5 μm); c) centro de la valva sin nódulo central (escala 0.5 μm); d) estructura y patrón de poroides (escala 0.1 μm). 58
- Figura 12.** *Pseudo-nitzschia americana*. a) Células hibridizadas con control negativo (UniR), b) células hibridizadas con control positivo (UniC), c) células hibridizadas con la sonda amD1 (escala 20 μm). *Pseudo-nitzschia brasiliiana*. d) Células hibridizadas con control negativo (UniR), e) Células hibridizadas con control positivo (UniC), f) Células hibridizadas con la sonda Pbra1 (escala 20 μm). 60
- Figura 13.** Crecimiento poblacional de las cepas de *P. brasiliiana* (E2, E4a, E7 y E9) aisladas en Puerto Escondido. Las cepas fueron cultivadas en medio L1 (Guillard y Hargraves 1993), a 24 °C, con una irradiancia de 350 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bajo un ciclo 12 h luz: 12 h oscuridad. La línea representa el ajuste al modelo de Gompertz. 62
- Figura 14.** Crecimiento poblacional de las cepas de *P. americana* (E5 y E8a) aisladas de Puerto Escondido. Las cepas fueron cultivadas en medio L1 (Guillard y Hargraves 1993) a 24°C, con una irradiancia de 350 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bajo un ciclo 12h luz: 12h oscuridad. La línea representa el ajuste al modelo de Gompertz. 63
- Figura 15.** Crecimiento poblacional de la cepa (E15) de *P. cf. roundii* aisladas de Puerto Escondido. La cepa fue cultivada en medio L1 modificado en la concentración de nitratos (0.205 mM) y fosfatos (0.181 mM) (Guillard y Hargraves 1993) a 24°C, con una 64

irradiancia de $350 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bajo un ciclo 12 h luz:12 h oscuridad. La línea representa un ajuste al modelo Gompertz.

Figura 16. Crecimiento poblacional de la cepa (E16) de *P. multistriata* aisladas de Puerto Escondido. La cepa fue cultivada en medio L1 modificado en la concentración de nitratos (0.205 mM) y fosfatos (0.181 mM) (Guillard y Hargraves 1993) a 24°C, con una irradiancia de $350 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bajo un ciclo 12 h luz:12 h oscuridad. La línea representa un ajuste al modelo Gompertz. 65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla I. Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de hibridación utilizadas en la técnica FISH-WCH (Scholin <i>et al.</i> 1994 y Lim <i>et al.</i> 2011).	39
Tabla II. Características morfométricas de cepas de <i>Pseudo-nitzschia brasiliiana</i> .	42
Tabla III. Características morfológicas de cepas de <i>Pseudo-nitzschia americana</i> .	45
Tabla IV. Características morfológicas de cepas de <i>Pseudo-nitzschia cf. roundii</i> .	48
Tabla V. Características morfológicas de cepas de <i>Pseudo-nitzschia cf. decipiens</i> .	51
Tabla VI. Características morfológicas de cepas de <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> .	54
Tabla VII. Características morfológicas de cepas de <i>Pseudo-nitzschia cf. pungens</i> .	57
Tabla VIII. Concentración de ácido domoico celular (ADc) y parámetros poblacionales de las especies.	66

RESUMEN

Pseudo-nitzschia es un género de diatomeas marinas que presenta una distribución global amplia. Los florecimientos de especies de este género representan un riesgo potencial a la economía y salud pública ya que algunas especies son productoras de la neurotoxina ácido domoico (AD). En las costas de Oaxaca, la información sobre el género *Pseudo-nitzschia* es escasa. En el presente estudio se identificó la presencia de especies de *Pseudo-nitzschia* en la zona de Puerto Escondido y Santa Elena, de la costa de Oaxaca y se evaluó la producción de ácido domoico celular (ADc) en cultivo. Se aislaron 18 cepas que correspondían a seis especies: *P. brasiliiana* con una ocurrencia mayor, *P. americana*, *P. brasiliiana*, *P. cf. decipiens*, *P. multistriata* y *P. cf. roundii*. La identificación de las cepas se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Asimismo, mediante hibridación fluorescente *in situ* de células completas (FISH-WCH) se confirmó la presencia de dos especies del complejo *P. americana*. La evaluación de la producción de ADc en las cepas se realizó mediante HPLC-UV. Seis cepas presentaron concentraciones detectables de la toxina: *P. brasiliiana*, *P. multistriata* y *P. roundii*. Esta última especie no ha sido reportada como productora de AD. Los resultados del presente estudio sirven como base para el estudio del género *Pseudo-nitzschia* en las costas de Oaxaca, se sugiere establecer un monitoreo constante en la zona que permita la detección temprana de florecimientos con potencial toxico.

Palabras clave: *Pseudo-nitzschia*, ácido domoico, microscopía electrónica, hibridación de células completas (FISH-WCH), Oaxaca.

ABSTRACT

Pseudo-nitzschia is marine diatoms genus with a global distribution. Blooms of species of this genus represent a potential risk to public health and costal economy since some species are produce the neurotoxin domoic acid (DA). On coasts of Oaxaca, information on the genus *Pseudo-nitzschia* is scarce. In the present study the presence species were identified from Puerto Escondido and Santa Elena, areas of Oaxaca. In addition, production of domoic acid in culture was evaluated on different species. Eighteen strains were insolated that corresponded to six species: *P. brasiliiana* with a higher occurrence, *P. americana*, *P. brasiliiana*, *P. cf. decipiens*, *P. multistriata* and *P. cf. roundii*. The identification of the strains was performed by transmission electron microscopy (TEM). Also, the presence of two species of the *P. americana* complex was confirmed with fluorescence *in situ* hybridization of whole cells (FISH-WCH). Detection of DA in the strains was evaluated by HPLC-UV. Six strains showed detectable concentrations of the toxin: *P. brasiliiana*, *P. multistriata* and *P. roundii*. This last species has not been reported DA producer. The results of the present study represent the basis for the study of the genus *Pseudo-nitzschia* in the coasts of Oaxaca, it is suggested to establish a constant monitoring in the area for early detection of potentially toxic blooms.

Key words: *Pseudo-nitzschia*, domoic acid, electron microscopy, hybridization by whole cells (FISH-WCH), Oaxaca.