

UNIVERSIDAD DEL MAR

LICENCIATURA EN BIOLOGIA MARINA



BIOPROSPECCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE CIANOBACTERIAS AISLADAS DE ESTANQUES DE CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO

Litopenaeus vannamei (Boone, 1931).

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
LICENCIADO EN BIOLOGIA MARINA presenta:

NORMA GARCÍA LAGUNAS

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca. Marzo de 2003



UNIVERSIDAD DEL MAR


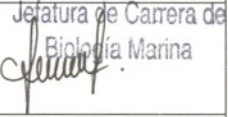
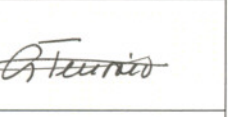
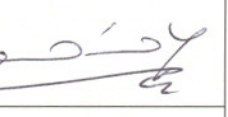

CERTIFICADO DE APROBACIÓN DE TESIS DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA

PARA SER LLENADO POR LOS MIEMBROS DEL COMITÉ

NOMBRE DEL AUTOR C. NORMA GARCÍA LAGUNAS

TÍTULO DE LA TESIS BIOPROSPECCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE
CIANOBACTERIAS AISLADAS DE ESTANQUES DE CULTIVO DEL CAMARÓN
BLANCO *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).

CERTIFICAMOS QUE ESTA TESIS HA SIDO APROBADA POR LOS MIEMBROS
DEL COMITÉ DE TESIS PARA SU DEFENSA EN EXAMEN ORAL.

G.A NOMBRE (S)	APELLIDO	APELLIDO	CARGO	FIRMA
DRA. ELIZABETH	PONCE	RIVAS	DIRECTOR	
M. en C. ALEJANDRA	TORRES	ARIÑO	SINODAL	
M. en C. GUADALUPE	TENORIO	COLÍN	SINODAL	
DR. LUIS RICARDO	HERNÁNDEZ	MOLINA	SINODAL	
DRA. BEATRIZ	HERNÁNDEZ	CARLOS	SINODAL	



O A X A C A
Jefatura de Carrera de
Biología Marina

RESUMEN de la Tesis de Licenciatura de NORMA GARCIA LAGUNAS, presentada como requisito parcial, para la obtención del grado de LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA. Puerto Ángel, Oaxaca. Marzo 2003.

BIOPROSPECCION DE COMPUESTOS ACTIVOS DE CIANOBACTERIAS AISLADAS DE ESTANQUES DE CULTIVO DE CAMARON BLANCO *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).

Resumen aprobado por:



Dra. Elizabeth Ponce Rivas

El crecimiento del fitoplancton en los estanques de cultivo de las granjas camaronícolas, se estimula mediante la fertilización con el fin de obtener un buen crecimiento de las postlarvas de camarón. Sin embargo, no siempre se tiene un control y algunos organismos que se desarrollan llegan a formar florecimientos, como es el caso de las cianobacterias. En este estudio se aislaron seis cianobacterias marinas asociadas al cultivo de *Litopenaeus vannamei* en la granja acuícola Vizomar ubicada en San Felipe B. C. México. Estas se identificaron utilizando características morfológicas y moleculares. Las secuencias parciales del gen que codifica para el ARNr 16S obtenidas de las cianobacterias aisladas no fue suficiente para identificar las cianobacterias a nivel de especie. Los análisis de restricción para la región intergénica con las enzimas *Hha I* y *Dde I* proporcionaron patrones de restricción claros y permitieron diferenciar entre las 6 cepas. Dichos análisis pueden ser utilizados en forma complementaria para la identificación de estas cianobacterias. Las cianobacterias aisladas e identificadas fueron: *Oscillatoria* sp. 1, *Synechocystis* sp., *Oscillatoria* sp. 4 (posible *O. laete-virens*), *Oscillatoria* sp. 5 (posible *O. limnetica*), *Phormidium* sp. y *Lyngbya* sp. Esta última cianobacteria fue la especie dominante en los tapetes microbianos y en el tracto digestivo del camarón, junto con *Oscillatoria* sp. 5. Esto significa que el camarón se esta alimentando en forma selectiva de por lo menos estas dos cianobacterias. Asimismo, se evaluó la capacidad de producción de compuestos antimicrobianos y toxinas en estas cianobacterias y en el tapete microbiano completo. Todas las cianobacterias mostraron propiedades antimicrobianas. Los halos de inhibición de crecimiento mas importantes se obtuvieron con los extractos orgánicos de las cianobacterias *Oscillatoria* sp. 1 y *Lyngbya* sp. Estos halos de inhibición fueron observados principalmente contra *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, que son bacterias patógenas para el camarón, así como para la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis*. Por otro lado, en los bioensayos con *Artemia* sp., los nauplios fueron sensibles principalmente a los extractos de la cianobacteria *Oscillatoria* sp. 1. Esta cianobacteria fue considerada la más tóxica, por provocar el 100 % de mortalidad de *Artemia* sp. en 24 h. a una concentración de 100 mg/ml, mientras que *Oscillatoria* sp. 5 fue considerada como no tóxica por provocar el la muerte de menos del 10 % de *Artemia* sp. Por lo tanto, las cianobacterias *Oscillatoria* sp. 5 y *Lyngbya* sp. podrían estar actuando como probióticos en el tracto intestinal de *L. vannamei*, ya que fueron clasificadas como no tóxica y poco tóxica para crustáceos como *Artemia*, respectivamente y ambas producen compuestos antimicrobianos contra *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*.

Palabras clave: Cianobacterias, antimicrobianos, toxicidad, probiótico, *Litopenaeus vannamei*.

A mi madre, Cristina Lagunas Amaya

Con mucho Amor.

A Antonio García Triana

Por haber tenido la oportunidad de conocerte.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones científicas y de educación superior de Ensenada (CICESE), por permitirme utilizar las instalaciones y equipo del laboratorio de Microbiología Molecular.

A la Dra. Elizabeth Ponce Rivas por su apoyo, dirección, paciencia y por haberme hecho participe de este proyecto.

A la M. en C. Edna Sánchez Castrejón, M. en C. Yessica Matas y M. en C. Luis por brindarme su apoyo técnico en el laboratorio y por sus observaciones para mejorar la calidad de la tesis, así como a los compañeros y amigos del laboratorio (Goya, Angélica, Oscar, Mauricio y Humberto) por las muestras de afecto durante mi estancia en ese lugar.

Especialmente a la M en C. Alejandra Torres Ariño por brindarme su amistad, apoyo, conocimientos y por mostrar una gran disponibilidad para asesorías y observaciones en la elaboración de la tesis.

A la M en C. Guadalupe Tenorio Colín por su amistad, valiosos comentarios y asesoría para mejorar la calidad de la presente tesis.

Al Dr. Ricardo Hernández Molina y la Dra. Beatriz Hernández Carlos por sus sugerencias y revisiones para mejorar la calidad de la tesis.

Al I.B.Q. Amado Shain Mercado por las sugerencias para la presentación de mi tesis.

A todas las personas que intervinieron directa e indirectamente en la realización de la presente tesis.

A los profesores y amigos de la Universidad del Mar porque fueron parte importante de mi formación académica y personal.

A mi madre porque ser la persona mas excepcional. Por todo su amor, confianza y apoyo para concluir una carrera.

A mis hermanos por los momentos que hemos compartido juntos

A Ma. Araceli Triana Tejas, por ser una persona maravillosa y por enseñarme a comprender que la ciencia es un camino muy placentero.

A Antonio García Triana por ser tan especial y por brindarme su amistad, cariño así como por despertar en mí el deseo por aprender cada día más.

A la vida, por permitirme cada día obtener conocimiento.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del proyecto: “Aislamiento y caracterización de cianobacterias marinas de la granja acuícola Vizsomar y su efecto en la salud del camarón *Litopenaeus vannamei*”, del Sistema de Investigación del Estado de Baja California registro 2000 SINVE- clave 010-DE otorgado a la Dra. Elizabeth Ponce Rivas, director de la presente tesis e Investigador del Centro de Investigaciones Científicas y de Educación Superior de Ensenada B. C.

INDICE

0788



Página

I	INTRODUCCIÓN	1
II	ANTECEDENTES	5
2.1	Taxonomía de cianobacterias	5
2.2	Producción de compuestos tóxicos cianobacterianos	6
2.3	Producción de compuestos antimicrobianos	9
III	JUSTIFICACIÓN	11
IV	OBJETIVO GENERAL	12
V	OBJETIVOS ESPECIFICOS	12
VI	HIPOTESIS DE TRABAJO	12
VII	METODOLOGÍA	13
7.1	Muestreo de cianobacterias	13
7.2	Aislamiento y cultivo de cianobacterias	14
7.3	Caracterización sistemática	17
	7.3.1 Caracterización morfológica	17
	7.3.2. Caracterización molecular	17
	7.3.2.1. Extracción de ADN cromosomal	17
	7.3.2.2. Análisis teórico de secuencias	18
	7.3.2.3. Análisis de restricción teórico para la región intergénica (ITS)	19
	7.3.2.4. Amplificación de fragmentos por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	19
	7.3.2.5. Polimorfismo de la Longitud de los fragmentos de Restricción (RFLP).	21
	7.3.2.6. Secuenciación	21
7.4	Bioactividad	22
	7.4.1. Extractos acuosos para evaluar la actividad antimicrobiana	22
	7.4.2. Extractos orgánicos para evaluar la actividad antimicrobiana	22
	7.4.3. Extractos acuosos para evaluar la biotoxicidad	22

7.4.4. Extractos extracelulares para evaluar la actividad antimicrobiana y biotoxicidad	23
7.4.5. Pruebas antimicrobianas	23
7.4.6. Bioensayos de toxicidad en <i>Artemia</i> sp.	24
VIII RESULTADOS	25
8.1 Observaciones de cianobacterias in situ	25
8.2 Aislamiento y purificación de cianobacterias	25
8.3 Caracterización sistemática	26
8.3.1. Caracterización morfológica	26
8.3.2 Caracterización molecular	33
8.3.2.1. Extracción de ADN cromosomal	33
8.3.2.2. Análisis teórico de secuencias del gen que codifica para el RNAr 16S	34
8.3.2.3. Análisis de restricción teórico para la ITS	35
8.3.2.4. Amplificación de fragmentos por PCR	36
8.3.2.5. Análisis de restricción experimental	37
8.3.2.6. Análisis de secuencias	42
8.4 Bioactividad	45
8.4.1. Ensayos antimicrobianos	45
8.4.2. Bioensayos de toxicidad en <i>Artemia</i> sp.	48
IX DISCUSIÓN	50
9.1 Aislamiento y purificación de cianobacterias	50
9.2 Identificación de las cianobacterias aisladas de estanques de cultivo de la Granja Vizomar	52
9.3 Bioactividad	56
9.3.1. Ensayos antimicrobianos	56
9.3.2. Bioensayos de toxicidad	59
X CONCLUSIONES	61
XI LITERATURA CITADA	63
XII ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>		<u>Página</u>
1	Estructuras químicas de toxinas cianobacterianas: hepatotoxinas y neurotoxinas	4
2	Mapa de localización del área de estudio	14
3	Cianobacteria marina <i>Oscillatoria</i> sp. 1 de la granja camaronícola Vizsomar, San Felipe B.C. México. Foto: García-Lagunas N. y Ponce-Rivas E.	27
4	Cianobacteria marina. <i>Lyngbya</i> sp. de la granja camaronícola Vizsomar, San Felipe B.C. México. Foto: García-Lagunas N. y Ponce-Rivas E.	28
5	Cianobacteria marina <i>Synechocystis</i> sp. de la granja camaronícola Vizsomar, San Felipe B.C. México. Foto: García-Lagunas N. y Ponce-Rivas E.	29
6	Cianobacteria marina <i>Oscillatoria</i> sp. 4 de la granja camaronícola Vizsomar, San Felipe B.C. México. Foto: García-Lagunas N. y Ponce-Rivas E.	30
7	Cianobacteria marina <i>Oscillatoria</i> sp. 5 de la granja camaronícola Vizsomar, San Felipe B.C. México. Foto: García-Lagunas N. y Ponce-Rivas E.	31
8	Cianobacteria marina <i>Phormidium</i> sp. de la granja camaronícola Vizsomar, San Felipe B.C. México. Foto: García-Lagunas N. y Ponce-Rivas E.	32
9	Gel de electroforesis de ADN cianobacteriano en 1.2 % (w/v) de agarosa, teñido con bromuro de etidio.	33

- 10 Representación esquemática del ADNr con el operón del ARNr, conteniendo la región intergénica (ITS) y los sitios de hibridación de los oligonucleótidos usados para la amplificación y secuenciación. 35
- 11 Esquema del análisis de restricción teórico realizado en el programa MapDraw del software DNASTar (lasergene) para la región intergénica de *Oscillatoria animalis* 36
- 12 Gel de electroforesis de productos de PCR de la ITS de las cianobacterias en 8 % (w/v) de poliacrilamida. 37
- 13 Gel de electroforesis que muestra el RFLP del producto de PCR para la ITS de las cianobacterias en 8 % (w/v) de poliacrilamida, digeridas con la enzima *Hha* I 38
- 14 Gel de electroforesis, con el RFLP de las amplificaciones de la ITS de las cianobacterias en 8 % (w/v) de poliacrilamida digeridas con dos enzimas: *Dde* I, *Tru9* I 40
- 15 Gel de electroforesis con el RFLP del producto de PCR de la ITS de cianobacterias al 8 % (w/v) de poliacrilamida, digerido con la enzima *Alu* I 41
- 16 Esquema de porcentajes de similitud y divergencia entre las secuencias de cianobacterias 44
- 17 Antibiograma de diferentes especies de bacterias, el cual muestra la sensibilidad de cada cepa con respecto a la concentración de antibiótico. 45
- 18 Fotografía de los efectos antimicrobianos de los extractos orgánicos de las cianobacterias aisladas. 48

LISTA DE TABLAS

<u>TABLA</u>		<u>Página</u>
I	Técnicas que permitieron aislar y purificar cianobacterias	26
II	Datos generales de la cianobacteria <i>Oscillatoria</i> sp. 1 aislada de la granja Vizomar San Felipe, B.C.	27
III	Datos generales de la cianobacteria <i>Lyngbya</i> sp. aislada de la granja Vizomar San Felipe, B.C.	28
IV	Datos generales de la cianobacteria <i>Synechocystis</i> sp. aislada de la granja Vizomar San Felipe, B.C.	29
V	Datos generales de la cianobacteria <i>Oscillatoria</i> sp. 4 aislada de la granja Vizomar San Felipe, B.C.	30
VI	Datos generales de la cianobacteria <i>Oscillatoria</i> sp. 5 aislada de la granja Vizomar San Felipe, B.C.	31
VII	Datos generales de la cianobacteria <i>Phormidium</i> sp. aislada de la granja Vizomar San Felipe, B.C.	32
VIII	Concentración de ADN cromosomal de las diferentes cianobacterias aisladas de la granja camaronícola Vizomar San Felipe, B. C.	34

- IX Efectos antibacterianos de extractos de cianobacterias, con siete ensayos bacterianos: *Escherichia coli* (EC); *Pseudomonas aeruginosa* (PA); *Bacillus subtilis* (Bs); *Vibrio alginolyticus* (VA); *V. parahaemolyticus* (VP); *V. harveyi* (VH); *V. Vulnificus* (VV). 47
- X Porcentaje de mortalidad de *Artemia* sp. en 24 hrs, con diferentes concentraciones del extracto (expresadas en mg/ml en términos de biomasa liofilizada) obtenido con disolventes orgánicos, de las cianobacteria aisladas de la Granja Vizomar, San Felipe B. C. 49