

UNIVERSIDAD DEL MAR



CARACTERIZACIÓN DE CIANOBACTERIAS PREDOMINANTES EN LA LAGUNA "LA PASTORÍA", TUTUTEPEC, OAXACA (SEPTIEMBRE DE 2017 A MAYO DE 2018)

TESIS

Que para obtener el Título Profesional de

Licenciada en Biología Marina

Presenta

Jennyfer Marisol Pérez Pérez

Dirigido por:

Dra. Ivonne Sandra Santiago Morales

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, México 2021

Resumen

Las cianobacterias o cianofitas, son un linaje filogenético de organismos en el dominio de las bacterias, que debido a su éxito ecológico forman florecimientos cada vez más frecuentes, generando impactos negativos para la salud humana, el ecosistema y el sector productivo, ya sea por la producción de toxinas o compuestos nocivos, o por la degradación de las condiciones ambientales. Este fenómeno es caracterizado por poblaciones densas que pueden estar conformadas por una sola o varias especies. En Oaxaca, México, la laguna “La Pastoría” ha sido afectada por una proliferación de cianobacterias entre septiembre de 2017 y mayo de 2018, con el registro de la mortalidad de ictiofauna. El objetivo del presente estudio fue caracterizar las cianobacterias predominantes en la laguna, para ello, se tomaron muestras de agua superficial entre los meses de septiembre de 2017 y mayo de 2018, se aislaron y cultivaron en medio BG11, cuatro de las cepas predominantes, identificadas posteriormente por herramientas moleculares como *Anabaenopsis elenkinii*, *Cyanobacterium aponinum*, *Limnothrix* sp. y *Roseofilum reptotaenium*. Se evaluó su potencial para producir microcistinas, a partir del análisis de la presencia de los genes de microcistinas, y a excepción de la cepa *Limnothrix* sp., las cepas aisladas amplificaron el gen *mcyG*. Las cuatro cepas aisladas produjeron el aminoácido neurotóxico BMAA en cultivos con presencia de nitrógeno, incrementando su producción en cultivos con ausencia de nitrógeno de 9-16% a excepción de la cepa *Limnothrix* sp., destacando la cepa *A. elenkinii*. En vista de que las cepas registradas, pueden producir simultáneamente compuestos tóxicos y/o nocivos, se recomienda la realización de estudios multidisciplinarios que permitan comprender el origen, permanencia y riesgo asociado ante la formación de estas proliferaciones.

Palabras clave: Cianobacterias, Laguna Pastoría, microcistina, BMAA.

Abstract

Cyanobacteria or cyanophytes are a phylogenetic lineage of organisms in the bacterial domain that, due to their ecological success form blooms every time most frequently generating negative impacts on human health, the ecosystem and the productive sector, either by the production of toxins or harmful compounds, or by the degradation of environmental conditions. Dense populations that may consist of a single species or several species characterize this phenomenon. In Oaxaca, Mexico, the lagoon "La Pastoría" affected by a proliferation of cyanobacteria between September 2017 and May 2018, with recorded mortality of ichthyofauna. The objective of the present study was to describe and characterize the predominant cyanobacteria in the lagoon, surface water samples taken between September 2017 and May 2018, and four predominant strains were isolated and cultured in BG11 medium, subsequently identified by molecular tools as *Anabaenopsis elenkinii*, *Cyanobacterium aponinum*, *Limnothrix* sp. and *Roseofilum reptotaenium*. Their potential to produce microcystins evaluated based on the analysis of the presence of microcystin genes, and with the exception of the *Limnothrix* sp. strain, the isolated strains amplified the *mcyG* gene. The four isolated strains produced the neurotoxic amino acid BMAA in cultures with the presence of nitrogen, increasing its production in cultures with the absence of nitrogen from 9-16% with the exception of the *Limnothrix* sp. strain, highlighting the *A. elenkinii* strain. In view of the fact that the registered strains can simultaneously produce toxic and/or harmful compounds, multidisciplinary studies recommended to understand the origin, permanence and risk associated with the formation of these proliferations.

Keywords: Cyanobacteria, Laguna Pastoría, microcystin, BMAA.

**A mi madre, al mar y a la vida,
por su inmensidad y por darme tanto.**

Agradecimientos

A mi muy apreciable directora de tesis, Dra. Ivonne Santiago Morales, con usted y el empuje a la parte experimental de este trabajo, varias de mis dudas fueron resueltas, además de darle dirección a este *trip*, el nivel de compañerismo que he disfrutado, contribuyó a forjar parte de la vida que estoy viviendo, la vida es hermosa y vaya que ha sido un verdadero placer coincidir con una gran persona como usted, un océano de gracias por todo mom!

A la M. en C. Bárbara Zavala, por su apoyo y atención dados a este trabajo, por compartir conmigo su amistad, confianza, y sus deliciosos postres, gracias totales Barbarita!

A mis sinodales la Dra. Sonia Quijano Scheggia, al Dr. José Aké, a la M. en C. Yolanda Huante; por su disposición y apoyo a la mejora de este trabajo, a ustedes muchísimas gracias.

Al proyecto CONACyT INFR-2015 (No. 255733) que permitieron el desarrollo del presente trabajo.

A SEMAEDESO, al municipio de Tututepec, y a la Universidad del Mar, por el apoyo para la realización de la toma de muestras.

A lo largo de este tiempo, he tenido la fortuna de coincidir con gente grandiosa, que además de contagiarme su pasión por el conocimiento, están dispuestos siempre a echar una mano. Román y Ame, gracias por estar ahí cuando fue necesario y cuando no necesariamente, muchas gracias por su buen humor, su apoyo, los ratos y las risas compartidas, de lo mejor, que chido crecer con ustedes en la vida! Mis myfs Anyely y Dani, Ubaldo mi parce, gracias por su amistad y su apoyo, por las pláticas y caminatas en la playa, las tardes de comida o los sábados de carnitas, con ustedes la vida es un picnic! A mis amiguitos los acuis Isma y Eli, y Dani Daniel, mis más sinceros agradecimientos por contar con su amistad, pasar rato con ustedes es reírse hasta el alma y pues nada, agradecida con el de arriba, pero el de más arriba, ¿no Isma?

A mis compañeros, gracias! Fue un honor realizar esta travesía a lado de ustedes.

Al equipo LARVATRON, Samuel, Ana, Caro, Bob, Marisol, Sofía, Mariela hongos, trabajar y compartir espacio con ustedes fue otra manera de crecer, muchas gracias.

A mi querida familia, mis hermanos, gracias por siempre estar ahí, por siempre tenderme la mano, por todo, infinitas gracias a la vida por tenerlos, por todo el amor incondicional, porque me han convertido en lo que soy y de la cual estoy enormemente orgullosa, sobre a todo, a ti mamá, por acompañarme en todo momento, por tu paciencia conmigo y por haberme permitido darme este viaje, el mejor que me he aventado, este logro que es nuestro, lo ando disfrutando, sobre todo porque en un rato comienzan a imprimir esto!

*Si quisiera definir en una frase a los seres humanos, ésta podría valer:
son animales que se creen las historias que ellos cuentan sobre sí mismos.*

Son animales crédulos.

Mark Rowlands, 2008.

Índice de figuras	ix
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación	4
4. Hipótesis	5
5. Objetivos	5
5.1 <i>Objetivo general</i>	5
5.2 <i>Objetivos particulares</i>	5
6. Materiales y métodos	5
6.1 <i>Área de estudio</i>	5
6.2 <i>Toma de muestras</i>	7
6.3 <i>Aislamiento y cultivo de cianobacterias</i>	7
6.4 <i>Identificación molecular de las cepas</i>	7
6.4.1 <i>Extracción de DNA</i>	7
6.4.2 <i>Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16S</i>	8
6.4.3 <i>Alineamiento y análisis filogenético</i>	8
6.5 <i>Caracterización morfológica de las cepas aisladas</i>	9
6.6 <i>Identificación de genes asociados a microcistinas (mcy) mediante PCR</i>	9
6.7 <i>Producción BMAA en cultivo con y sin nitrógeno</i>	10
6.7.1 <i>Condiciones de cultivo</i>	10
6.7.2 <i>Obtención de Biomasa</i>	10
6.7.3 <i>Cuantificación de BMAA por HPLC</i>	10
7. Resultados	11
7.1 <i>Cepas aisladas</i>	11
7.2 <i>Identificación molecular y caracterización morfológica de los aislados</i>	12
7.2.1 <i>Análisis filogenético cepa SynP</i>	12
7.2.2 <i>Caracterización morfológica cepa SynP</i>	14
7.2.3 <i>Análisis filogenético cepa AnaP</i>	15
7.2.4 <i>Caracterización morfológica cepa AnaP</i>	17

7.2.5	<i>Análisis filogenético cepa FGP</i>	18
7.2.6	<i>Caracterización morfológica cepa FGP</i>	20
7.2.7	<i>Análisis filogenético cepa F2P</i>	21
7.2.8	<i>Caracterización morfológica cepa F2P</i>	22
7.3	<i>Identificación de genes asociados a microcistinas (mcy) mediante PCR</i>	23
7.4	<i>Producción de BMAA en cultivo con y sin nitrógeno</i>	24
8.	Discusión	26
8.1	<i>Identificación molecular y caracterización morfológica de los aislados</i>	26
8.2	<i>Identificación de genes asociados a microcistinas (mcy) mediante PCR</i>	30
8.3	<i>Producción de BMAA en medios con y sin nitrógeno</i>	33
	Conclusiones	34
	Recomendaciones	35
	Referencias	35
	ANEXOS	47

Índice de figuras

- Figura 1.** Área de estudio laguna “La Pastoría” y puntos de muestreo, Oaxaca, México. 6
- Figura 2.** Gel de agarosa al 1% donde se observan las bandas de productos de PCR de ~700 pb con un marcador molecular de 1Kb, resultado de la amplificación del gen 16s con los primers CYA106F y CYA781R con el DNA extraído de las cianobacterias aisladas: AnaP, FGP, F2P y SynP. 12
- Figura 3.** Árbol filogenético reconstruido a partir del análisis de Máxima Verosimilitud (1000 bootstrap) con secuencias parciales del gen 16s rRNA, donde se observa una homología del 98% de la cepa SynP con la cepa *Cyanobacterium aponinum*. 13
- Figura 4.** Micrografía de la cepa SynP caracterizado como *Synechocystis aquatilis* A) y D) Células individuales y en pares observadas bajo el microscopio de epifluorescencia; B) Polisacáridos alrededor de las células teñidas con azul de metileno C) Células verde-azules con aspecto granuloso rodeadas de polisacáridos. Las flechas indican el halo de polisacáridos alrededor de las células. 14
- Figura 5.** Árbol filogenético reconstruido a partir del análisis de Máxima Verosimilitud (1000 bootstrap) con secuencias parciales del gen 16s rRNA, mostrando una homología del 82% de la cepa AnaP con la cepa *Anabaenopsis elenkinii*. 16
- Figura 6.** Micrografía de la Cepa AnaP caracterizada como *Anabaenopsis elenkinii*. A) Tricomas cortos y solitarios observados bajo el microscopio de epifluorescencia; B) Tricomas enroscados irregularmente; C) Células elipsoidales más largas que anchas. D) Heterocistos pequeños y esféricos vistos con el microscopio de epifluorescencia. 18
- Figura 7.** Árbol filogenético reconstruido a partir del análisis de Máxima Verosimilitud (1000 bootstrap) con secuencias parciales del gen 16s rRNA, donde

se observa una homología del 81% de la cepa FGP con dos cepas del género *Limnothrix*. 19

Figura 8. Micrografía de la cepa FGP caracterizada como *Geitlerinema amphibium*. A) Tricomas verde azules en forma de fascículo, rectos o ligeramente curvados, isopolares redondeadas y presencia de gránulos de ficocianina. B) Tricomas sin constricciones transversales y ausencia de vaina en la tinción con azul de metileno. Células más largas que anchas, las vesículas de gas centrales vistas bajo el microscopio de epifluorescencia C) se observan muy marcadas en muestras de campo y D) reducidas en condiciones de laboratorio. Las flechas indican vesículas de gas. 21

Figura 9. Árbol filogenético reconstruido a partir del análisis de Máxima Verosimilitud (1000 bootstrap) con secuencias parciales del gen 16s rRNA, donde se observa la homología del 100% de la cepa F2P con *Roseofilum reptotaenium*. 22

Figura 10. Micrografía de la cepa F2P caracterizada como *Planktothrix cf. agardhii*. A) Tricomas rectos de color verde azul oscuro, con una célula cónica de un extremo y redondeada por el otro, B y C) células más cortas que anchas, vistas bajo el microscopio de epifluorescencia. D) Ausencia de vainas en la tinción con azul de metileno. 23

Figura 11. Amplificaciones del gen *mcy* con los primers PKEF/PKER y PKGF/PKGR. 24

Figura 12. Producción de BMAA de las cepas aisladas en cultivos con presencia y ausencia de nitrógeno, este último indicado con un cero. 25