



UNIVERSIDAD DEL MAR
Campus Puerto Ángel

EVALUACIÓN DE LAS INTERACCIONES
***Pseudo-nitzschia fryxelliana*-SIMBIONTES**
EN CONDICIONES DE CULTIVO

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA

PRESENTA:

ABRAHAM AGUILAR NARVÁEZ

DIRIGIDO POR

DRA. IVONNE SANDRA SANTIAGO MORALES

CIUDAD UNIVERSITARIA, PUERTO ÁNGEL, OAXACA. 2021.

RESUMEN

En los ecosistemas marinos, el fitoplancton constituye la base de las diversas cadenas tróficas contribuyendo con más de la mitad de la fijación del carbono orgánico global. Las diatomeas pertenecientes al género *Pseudo-nitzschia* (Pn) son capaces de producir floraciones oceánicas y costeras, y así mismo, capaces de producir una importante neurotoxina conocida como Ácido Domoico (AD). Se han reconocido diversos factores que modifican la dinámica poblacional y potencial tóxico en esta especie, dentro de los cuales, la influencia de bacterias simbiotes es la menos estudiada. En las costas del estado de Oaxaca existen pocos estudios relacionados al análisis de las comunidades bacterianas asociadas a cultivos algales y su incremento podría permitir hacer inferencias sobre las funciones ecológicas de las bacterias sobre las microalgas. En el presente trabajo se realizó la identificación taxonómica de la diatomea mediante el análisis de microfotografías de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y, la identificación de las bacterias presentes en los cultivos, mediante técnicas moleculares. El efecto de las bacterias sobre Pn se evaluó mediante los cambios en el crecimiento, producción de AD (mediante HPLC) y la tasa fotosintética en cultivos con altas y bajas concentraciones bacterianas. El análisis de las microfotografías determinó que la diatomea corresponde a la especie *Pseudo-nitzschia fryxelliana*, así mismo, las cepas bacterianas simbiotes fueron identificadas como *Georgenia satyanarayana* y *Alteromonas macleodii*. Los resultados de la evaluación del crecimiento celular mostraron concentraciones celulares y tasas de crecimiento mayores en los cultivos con una baja densidad bacteriana (1.05 día^{-1}) en comparación con los cultivos con densidades bacterianas altas (0.41 día^{-1}), del mismo modo, los valores correspondientes a la eficiencia cuántica operativa máxima (F_v/F_m) y tasa de transporte de electrones (ETR) fueron mayores en el cultivo con baja carga bacteriana, mientras que, la irradiancia de saturación (E_k) mostró una tendencia opuesta. Además, se encontró que la cepa de *Pseudo-nitzschia fryxelliana* no produce AD, independientemente de la presencia o ausencia de bacterias en los cultivos. Los datos obtenidos permiten establecer que bajo las condiciones evaluadas en el presente trabajo, las bacterias están relacionadas de forma directa con cambios fisiológicos y pueden jugar un papel importante en la dinámica poblacional de *Pseudo-nitzschia fryxelliana*.

PALABRAS CLAVE: *Pseudo-nitzschia*, bacterias, interacciones, simbiosis, ETR, Acido domoico, crecimiento.

ABSTRACT

In marine ecosystems, phytoplankton support different trophic levels, contributing with almost half of the carbon fixation. Diatoms of the genus *Pseudo-nitzschia* (Pn) are capable of producing oceanic and coastal blooms, and likewise, capable of producing an important neurotoxin known as Domoic Acid (DA). Many factors affect the population dynamics and toxic potential in this species, among which, the influence by symbiotic bacteria is the less studied. On the coasts of the state of Oaxaca there are few studies related to the analysis of bacterial communities associated with algal cultures, and their increase could allow making inferences about the ecological functions of bacteria on microalgae. In the present work, the taxonomic identification of the diatoms was carried out through the analysis of Transmission Electron Microscopy (TEM) microphotographs and, the identification of the symbiotic bacteria by molecular techniques. The effect of different bacterial concentrations on the physiology of Pn, was evaluated in culture by changes in growth, AD production (by HPLC) and the photosynthetic rate. The analysis of the microphotographs determined that the diatom corresponds to *Pseudo-nitzschia fryxelliana*, while the symbiotic bacterial were identified as *Georgenia satyanrayanai* and *Alteromonas macleodii*. The cultures with low bacterial density showed higher growth rates (1.05 day^{-1}) in comparison to cultures with high bacterial densities (0.41 day^{-1}), and the values corresponding to the maximum operational quantum efficiency (F_v / F_m) and electron transport rate (ETR) were higher in the culture with low bacterial load, while the saturation irradiance (E_k) showed an opposite trend. No domoic acid was detected regardless of the presence or absence of bacteria in the cultures. The data obtained allow to establish that, the bacteria play an important role in the physiological change and population dynamics of *Pseudo-nitzschia fryxelliana*.

KEY WORDS: *Pseudo-nitzschia*, bacteria, interactions, symbiosis, ETR, Domoic acid, growth.

DEDICATORIA

A mi familia, especialmente a mi madre por el gran apoyo y ejemplo que ha sido para mí, por esa fuente constante de recursos y en reconocimiento a todo el apoyo brindado en este proceso.

Con cariño y gratitud invaluable.

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Análisis de Ficotoxinas (Larvatron) y Laboratorio de Genética y Microbiología de la Universidad del Mar *campus* Puerto Ángel, bajo la dirección de la Dra. Ivonne S. Santiago Morales.

La realización de las pruebas experimentales se llevaron a cabo gracias al apoyo del proyecto financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT INFR-2015 No. 255733).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a la Universidad del Mar por haberme enseñado tanto, por exigir siempre lo mejor de mí con ese sistema educativo tan riguroso y eficiente al mismo tiempo.

A todos los profesores que hicieron lo mejor por compartir conocimientos de las distintas áreas en que se desempeñan, por el tiempo y esfuerzo dedicado en cada una de sus clases y tutorías.

A mi comité revisor, M. C. Yolanda Huante González y Concepción Martínez Liévana (Universidad del Mar), Dra. Amaly Becerril Espinosa (Universidad de Guadalajara) y Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre (Universidad Autónoma de Baja California), por el tiempo invertido en la revisión del manuscrito, por sus sugerencias sobre los ensayos moleculares en la identificación de bacterias y hacerme un poco más fácil este proceso. Agradezco especialmente a la Dra. Ivonne S. Santiago Morales por su tiempo, esfuerzo y dirección en la elaboración de este trabajo.

A todo el equipo de jóvenes (Gustavo, Sara, Bany, Jenny, Caro, Danay, Marisol, Ana, Ángeles) y profesionistas del Laboratorio de Análisis de Ficotoxinas con quienes tuve la oportunidad de convivir, aprender y compartir experiencias.

A mis compañeros y amigos: Fer, Caro, Scarlett, Isaac, Rodolfo, Malu, Ibra, Lore, Isa, Paco, Amauri, Mari, Julio, Jenny, Alo, Liz, Dulce, Tixta. Gracias, porque a pesar de haber pasado por periodos de estrés académico, siempre había un momento para convivir y refrendar nuestra amistad. No olvidaré esos buenos ratos, esas salidas de campo. Gracias por todo, por compartir experiencias y tan buenos momentos.

A todo el personal administrativo de la Universidad del Mar, quienes me ayudaron y orientaron, desde el principio en mi llegada al curso propedéutico, hasta el final, en el proceso de defensa de este trabajo.

A esos grandes amigos y compañeros con quienes no llegué a la meta juntos. A aquellos que hicieron tan amenas esas noches de desvelo, dentro y fuera de la universidad.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

| CONTENIDO | Página |
|---|-----------|
| RESUMEN..... | ii |
| ABSTRAC..... | iii |
| DEDICATORIAS..... | v |
| CREDITOS INSTITUCIONALES..... | vi |
| AGRADECIMIENTOS..... | vii |
| ÍNDICE..... | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xi |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xiii |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Interacciones planctónicas: su importancia en los ecosistemas oceánicos..... | 1 |
| 1.2. Fotosíntesis y su regulación en respuesta a variaciones ambientales..... | 3 |
| 1.3. La fluorescencia como un indicador de estrés..... | 5 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 7 |
| 2.1 Interacciones algales-bacterianas en los ecosistemas marinos..... | 7 |
| 2.2. <i>Pseudo-nitzschia</i> : Consideraciones taxonómicas y ciclo de vida..... | 9 |
| 2.3. Interacciones <i>Pseudo-nitzschia</i> -bacterias y sus efectos en la fisiología | |
| Del hospedero..... | 12 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 16 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 16 |
| 5. OBJETIVOS..... | 17 |
| 5.1. Objetivos generales..... | 17 |
| 5.2. Objetivos particulares..... | 17 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 18 |
| 6.1. Obtención de muestras..... | 18 |
| 6.2. Aislamiento y cultivo de cepas de <i>Pseudo-nitzschia</i> | 18 |
| 6.3. Identificación de la especie del género <i>Pseudo-nitzschia</i> | 19 |
| 6.3.1. Características morfométricas..... | 19 |
| 6.4. Interacción <i>Pseudo-nitzschia</i> -simbiontes bacterianos..... | 19 |
| 6.4.1. Observación y aislamiento de bacterias simbiontes..... | 19 |
| 6.4.2. Identificación molecular de bacterias simbiontes..... | 20 |
| 6.4.3. Análisis filogenético de las cepas bacterianas..... | 21 |
| 6.5. Reducción de la carga bacteriana de cultivos de <i>Pseudo-nitzschia</i> | 21 |
| 6.6. Análisis fisiológicos de <i>Pseudo-nitzschia</i> en consorcio con bacterias..... | 22 |
| 6.6.1. Crecimiento poblacional de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp..... | 22 |
| 6.6.2. Evaluación de la actividad fotosintética..... | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 6.6.3. Medición de la fluorescencia de la clorofila a..... | 23 |
| 6.6.4. Contenido de Ácido Domoico (AD)..... | 24 |
| 6.7. Análisis y procesamiento de datos..... | 24 |
| 7. RESULTADOS..... | 25 |
| 7.1 Aislamiento de cepas de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp..... | 25 |
| 7.2. Características morfológicas de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp..... | 25 |
| 7.3. Observación y aislamiento de bacterias simbiotes..... | 28 |
| 7.4. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias simbiotes..... | 28 |
| 7.5. Identificación molecular de las cepas bacterianas..... | 30 |
| 7.6. Análisis fisiológicos en el consorcio <i>Pseudo-nitzschia fryxelliana</i> – bacterias..... | 33 |
| 7.6.1. Crecimiento celular..... | 34 |
| 7.6.2. Actividad fotosintética..... | 34 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 37 |
| 8.1. Identificación taxonómica de <i>Pseudo-nitzschia fryxelliana</i> | 37 |
| 8.2. Identificación de bacterias simbiotes..... | 39 |
| 8.3. Variaciones fisiológicas en el consorcio <i>Pseudo-nitzschia fryxelliana</i> – bacterias..... | 41 |
| 8.3.1 Crecimiento celular..... | 41 |
| 8.4. Eficiencia fotosintética..... | 43 |
| 9. CONCLUSIÓN..... | 47 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA..... | 48 |
| 11. ANEXOS..... | 68 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Características morfométricas y ultraestructurales de las especies de <i>Pseudo-nitzschia</i> . (A) E: Estrías, IE: Interestrías, P: Proides, F: Fíbulas. (B) PC: poroide central. (C) L: longitud, A: amplitud. (Fotos: Yuri Okolodkov). | 11 |
| 2 | Área de estudio y localización del punto de muestreo. El punto A muestra la ubicación geográfica de la Bahía Santa Elena, Santa María Colotepec, Oaxaca. | 18 |
| 3 | Características ultraestructurales de <i>Pseudo-nitzschia fryxelliana</i> . Las fotografías tomadas mediante TEM muestran: A) valva completa; B) y C) centro de la valva con nódulo central (flechas); D) y E) estructura y patrón de los poroides; F) forma de las puntas. (Fotos: Yuri Okolodkov). | 27 |
| 4 | Características macroscópicas y microscópicas de las cepas bacterianas aisladas de los cultivos de <i>Pseudo-nitzschia fryxelliana</i> . A) Cepa BrT: A1) Células en vivo; A2) Morfología colonial; A3) Crecimiento de bacterias en agar medio marino. B) Cepa AMK. B1) Células en vivo; B2) Morfología colonial; B3) Crecimiento de bacterias en agar medio marino. C) Cepa BRe. C1) Células en vivo; C2) Morfología colonial; C3) Crecimiento de bacterias en agar medio marino. | 29 |
| 5 | A) Confirmación de la extracción de ADN a través de geles de agarosa al 1 % utilizando tres métodos de extracción. B) Productos de PCR de las bacterias aisladas de los cultivos de <i>Pseudo-nitzschia</i> . Cepa BRe, Cepas Amk y BrT. Lad: marcador molecular con la longitud de pb de los productos amplificados. | 30 |
| 6 | Caracterización taxonómica. A) análisis filogenético basado en secuencias del gen 16S ARNr disponible en Blast Nucleotide database. El árbol se generó usando el método del vecino mas cercano (Neighbor-Joining), con 500 réplicas. El nombre de las especies esta seguido por la designacion de la cepa, un indicador de cepas tipo (T) y el número de acceso al GenBank (entre parentesis). B) microfotografía óptica de <i>Alteromonas macleodii</i> (cepa BRe). | 31 |
| 7 | Caracterización taxonómica. A) análisis filogenético basado en secuencias del gen 16S ARNr disponible en BlastNucleotide database. El árbol se generó usando el método del vecino mas cercano (Neighbor-Joining), con 500 réplicas. El nombre de las especies esta seguido por la designacion de la cepa, un indicador de cepas tipo (T) y el número de acceso al GenBank (entre parentesis). B) microfotografía óptica de las cepas BrT (B1) y AMK (B2) identificadas como <i>Georgenia satyanayaranai</i> . | 32 |

| | | |
|----|--|----|
| 8 | Curva de crecimiento poblacional de la capa de <i>Pseudo-nitzschia fryxelliana</i> (Pn3ESC) aislada de la bahía Santa Elena. A) Cultivo sin tratamiento de antibióticos (altas densidades bacterianas). B) cultivo con tratamiento de antibióticos. En ambos tratamientos la cepa fue cultivada en medio L1 modificado a 24 ° C, con una irradiancia de 300 $\mu\text{mol E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bajo un ciclo 12:12 h luz:oscuridad.. | 34 |
| 9 | Valores de tasa de transferencia de electrones (ETR) correspondientes al cultivo de <i>Pseudo-nitzschia fryxelliana</i> con altas densidades bacterianas. La línea representa el ajuste al modelo de BoxLucas. | 35 |
| 10 | Valores de tasa de transferencia de electrones (ETR) correspondientes al cultivo de <i>Pseudo-nitzschia fryxelliana</i> con baja carga bacteriana. La línea representa el ajuste al modelo de BoxLucas. | 35 |
| 11 | Máxima eficiencia cuántica operativa del PSII medida como la relación entre la fluorescencia basal y variable (Fv/Fm) e Irradiancia de saturación (E_k) en cultivos de <i>Pseudo-nitzschia fryxelliana</i> con una alta densidad bacteriana y en cultivos con baja densidad de bacterias. | 36 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|---|---------------|
| I | Datos morfométricos de la cepa Pn3ESC obtenidas mediante TEM. | 26 |
| II | Posición taxonómica de las bacterias aisladas del cultivo de <i>Pseudonitzschia fryxelliana</i> . | 33 |