
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Título
**“Caracterización morfológica y molecular de
Fitoplancton del género *Phaeocystis* en condiciones de
cultivo”**

QUE PRESENTA LA ALUMNA
Sandra Leticia Ortiz Cruz
Matrícula
2142036111

ASESORES:

Interno: Dra. Leonor Mendoza Vargas
Número económico: 37826
Departamento del Hombre y su Ambiente

Vo.Bo.

Externo: Dr. David Uriel Hernández Becerril
Responsable del Lab. Diversidad y Ecología de fitoplancton
Inv. Titular “B” T.C. del ICML (UNAM)

Vo.Bo.

México, CDMX

Resumen

El filo Haptophyta es un grupo de algas marinas de gran importancia dentro del fitoplancton ya que contribuyen a los ciclos biogeoquímicos del carbono y del azufre. Las Haptofitas se dividen en dos clases, la Prymnesiophyceae y las Pavlovophyceae dentro de las cuales se encuentra el género *Phaeocystis* que son productores de dimetilsulfoniopropionato compuesto precursor del dimetilsulfóxido. El objetivo de esta investigación fue Caracterizar morfológica y molecularmente el género *Phaeocystis* en condiciones de laboratorio. Para lo cual se realizó un cultivo de *Phaeocystis sp* proveniente de las costas de Mazatlán. Para conocer la estructura externa se realizaron observaciones y toma de fotos en diferentes microscopios, se realizaron fijaciones y cortes histológicos. Se realizó la extracción de DNA y secuenciación. Como resultados se obtuvo la descripción externa de *Phaeocystis sp*, aunque debido a los recambios de cultivos la secuenciación molecular no resulto ser de la misma especie, por lo que se adquirió conocimiento de mejoramiento de técnicas para cultivo.

Palabras clave

Haptophyceas, *Phaeocystis*, caracterización morfológica y molecular.

Contenido

1. Marco Institucional del proyecto.....	4
2. Introducción	4
3. Antecedentes del proyecto	5
4. Ubicación geográfica del programa o proyecto donde se realizaron las actividades del servicio social.	5
5. Objetivo general del proyecto	5
6. Especificación y fundamento de las actividades desarrolladas de acuerdo con el calendario propuesto.	5
6.1 Búsqueda bibliográfica	5
6.2 Obtención de la muestra y siembra	6
6.3 Identificación morfológica	6
6.4 Identificación Molecular	8
6.5 Filogenia.....	8
7. Impacto de las actividades del servicio social en programa o proyecto de adscripción	8
Al hacer la caracterización morfológica y molecular de <i>Phaeocystis sp.</i> En condiciones de cultivo se pudieron encontrar los siguientes resultados.	8
8. Aprendizaje y habilidades obtenidas durante el desarrollo del servicio social.	8
9. Fundamento de las actividades del servicio social.....	9
10. REFERENCIAS.....	10

1. Marco Institucional del proyecto

En el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML, UNAM), se pretende efectuar investigaciones científicas interdisciplinarias dentro de las ciencias del mar y de la limnología y contribuir al desarrollo científico del país mediante el impulso de la investigación (ICMyL, 2019). En el laboratorio Diversidad y Ecología del Fitoplancton Marino del ICML-UNAM se desarrolla la línea de investigación sobre la diversidad, taxonomía, filogenia y ecología del fitoplancton marino, tanto fitoplancton tóxico como nocivo; además se aborda el estudio del picofitoplancton autótrofo. En colaboración con la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X), a través del laboratorio de Plancton y Bioenergética adscrito al Departamento El Hombre y su Ambiente, han contribuido en el bienestar de la sociedad mediante la realización de investigación científica, innovación tecnológica y formación de recursos humanos. Además, en el manejo sustentable de los recursos naturales. Lo anterior permitió el desarrollo de las presentes actividades relacionadas con la caracterización morfológica y molecular de fitoplancton del género *Phaeocystis* en condiciones de cultivo.

2. Introducción

El filo Haptophyta es un grupo de eucariotas unicelulares predominantemente marinas. Su nutrición es principalmente fototrófica, aunque algunas exhiben fagotrófia y heterotrófia (Eikrem y Col., 2016). Es un grupo de microalgas flageladas con una estructura adicional parecida a un tercer flagelo llamada haptonema y presentan escamas orgánicas o mineralizadas (carbonato de calcio o sílice) (Hernández-Becerril, 2014).

Las Haptofitas incluyen 80 géneros existentes con aproximadamente 330 especies que se dividen en dos clases, los Coccolithophoridae (Primnesiofitas) con alrededor de 76 géneros y 318 especies y Pavlovophyceae con 4 géneros y 13 especies (Eikrem y col. 2016). Juegan un papel importante a nivel ecológico ya que los coccolitofóridos producen escamas calcificadas (cocolitos) que al morir se liberan y se transportan al suelo marino (Jordan, 1997) y algunos géneros de Pavlovophyceae como *Phaeocystis* y otros haptófitos son productores de dimetilsulfoniopropionato (DMSP), compuesto precursor del dimetilsulfóxido (DMS), un gas climático activo que induce la formación de nubes atmosféricas y puede afectar el albedo planetario. El DMSP puede dividirse en ácido acrílico y DMS (Jordan, 1997) dándole un papel importante en los ciclos biogeoquímicos globales y la regulación del clima, siendo un importante contribuyente en los ciclos del carbono y del azufre en el océano (Schoemann, 2005). *Phaeocystis sp.* puede ser perjudicial para el crecimiento y la reproducción de la vida marina e impactar fuertemente las actividades humanas como la pesca, la acuicultura y el turismo (Andersen, 2015).

Phaeocystis es un género cosmopolita productor de mucílago cuyas especies pueden estar presentes en altas concentraciones en los hemisferios norte y sur siendo *Phaeocystis globosa*, *P. pouchetii* y *P. antarctica* importantes formadoras de floraciones algales (Jordan, 1997). Este género tiene un ciclo de vida polimórfico con células coloniales y células flageladas. Durante la etapa colonial muestra células muy poco conectadas entre sí, aunque algunas especies pueden

formar colonias mucilaginosas o no parecen tener una etapa colonial (Medlin, 2007). También, se ha encontrado que *P. globosa* presenta una compleja alternancia entre varios tipos de células de vida libre (no móviles, flagelados, microzoosporas y posiblemente macro-zoosporas) y colonias (Rousseau, 1994)

Lange (2002) menciona que debido a que dentro del género *Phaeocystis* existen diversas especies crípticas es complicado determinar si se trata de una o más especies, por lo que los métodos moleculares han sido fundamentales para revelar la diversidad y distribución de Haptófitos (Eikrem y Col. 2016). Se han utilizado los genes 18S rRNA de *Phaeocystis* para reconstruir la filogenia y la historia biogeográfica de las especies principales, con floraciones más comúnmente registrada. Sin embargo, la variación en el gen del ARNr 18S entre *P. globosa* y *P. pouchetii* y entre *P. antarctica* no varía mucho haciendo que sean especies cercanas (Lange y Col. 2002).

Debido a que no existe registro de *Phaeocystis* en México es necesario hacer un estudio de las especies que se encuentran distribuidas en el país ya que muchas especies son crípticas es necesario realizar análisis morfológicos y moleculares para así obtener resultados más acertados.

3. Antecedentes del proyecto

Dentro del laboratorio de Ecología y Diversidad de Fitoplancton Marino del ICMYL, UNAM, se llevan a cabo proyectos de cultivos de especies de fitoplancton procedentes de varios puntos del Pacífico mexicano de los cuales se busca conocer la morfología, ciclos de vida y filogenia molecular, esto con el objetivo de conocer la diversidad del fitoplancton que se encuentra en México. Para ello se llevó a cabo una separación de diferentes microalgas y se eligió *Phaeocystis sp.* para caracterizar tanto morfológica como molecular debido a su importancia ecológica.

4. Ubicación geográfica del programa o proyecto donde se realizaron las actividades del servicio social.

Este servicio social se desarrolló en el laboratorio de Diversidad y Ecología del fitoplancton en el Instituto de Ciencias Del Mar y Limnología de la UNAM. La sede del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología se encuentra en Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04510, CDMX.

5. Objetivo general del proyecto

Caracterización morfológica y molecular de una especie de fitoplancton del género *Phaeocystis* proveniente de Mazatlán, Sinaloa, en condiciones de cultivo y, contribuir en el conocimiento de especies de fitoplancton que se encuentran en México.

6. Especificación y fundamento de las actividades desarrolladas de acuerdo con el calendario propuesto.

6.1 Búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre las comunidades fitoplanctónicas relacionadas con *Phaeocystis sp.* con la finalidad de conocer su distribución y ciclo de vida. También, se revisaron los protocolos y métodos de biología molecular que se utilizan para caracterizar a las especies de fitoplancton. Esta búsqueda de

información se realizó en acervos bibliográficos impresos y electrónicos de bibliotecas, así como en bases de datos tales como Journal of marine systems, Web of Science, Scopus, ProQuest Biological Science Collection, GenBank, entre otros.

6.2 Obtención de la muestra y siembra

En la BASE DE OPERACIONES "EL PUMA" en Mazatlán, al azar se tomó una muestra de agua, tratando de mantener el fitoplancton vivo. Después, se realizó la concentración de los organismos en un sistema de filtrado millipore a base de gravedad y se depositaron en una caja petri de vidrio sin dejar que se secase. En el microscopio invertido se realizó el aislamiento de cada organismo con una pipeta de vidrio previamente modificada y una manguera de plástico, cada organismo fue depositado en microplacas de 96 pozos con capacidad de 200 μ L de medio de cultivo IMK por pozo y se fueron escalando hacia recipientes más grandes hasta obtener un cultivo mono algal con suficientes individuos para realizar los estudios morfológicos y moleculares (figura 1).



FIGURA 1 Incubación de cultivos en los diferentes recipientes de incubación durante 6 meses.

6.3 Identificación morfológica

Estructura externa: Para conocer su estructura externa se hicieron observaciones de las células vivas en el microscopio de luz invertido (Figura 2) y en el microscopio de luz (Figura 3), después se fijó una muestra de 5ml con glutaraldehído al 2% y se filtró con un filtro de (0.22 μ m) el cual fue lavado por medio de alcoholes a cinco diferentes concentraciones (30%, 50%, 70%, 90% y 100%) durante cinco min cada concentración, posteriormente se llevó a punto crítico de secado y se observó en el microscopio electrónico de barrido (MEB) (Figura 4) donde se trató de observar la estructura externa de la célula a un mayor aumento y así conocer los detalles de las células.

También, se realizaron observaciones en el microscopio confocal para poder ver las células a diferentes ángulos tipo 3D para así poder apreciar otros detalles.



FIGURA 2. Células observadas en microscopio invertido en el primer mes del cultivo. Dentro de los círculos rojos se encuentran células donde se pueden apreciar dos cloroplastos.

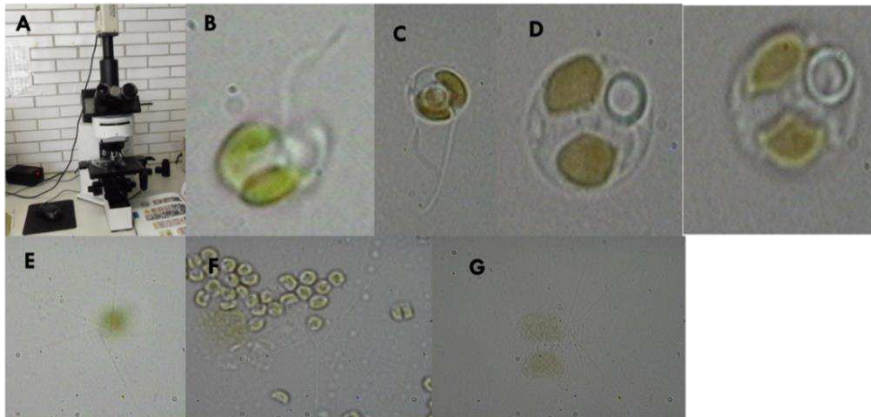


FIGURA 3. A) microscopio de luz; B) muestra una foto de los dos cloroplastos de *Phaeocystis* con sus dos flagelos; C) muestra la célula con sus dos cloroplastos sus dos flagelos y una vesícula de la cual expulsan las estrellitas de quitina; D) células redondeadas ya sin flagelos donde con dos cloroplastos y su vesícula. E,F,G) estrellas de quitina liberadas de las vesículas observadas a los tres meses del cultivo.

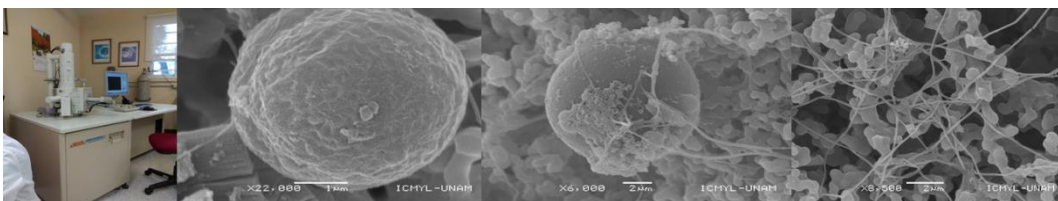


FIGURA 4. Microscopio electrónico de barrido (MEB). Células de *Phaeocystis* y estructuras de quitina en forma de estrella observadas a los tres meses de cultivo.



FIGURA 5. Microscopio confocal donde se observan las células 5 meses después del cultivo.

Ultraestructura: Para conocer la ultraestructura del cultivo que se creía *Phaeocystis*, se realizaron cortes histológicos y se observaron en el microscopio electrónico de transmisión (MET).

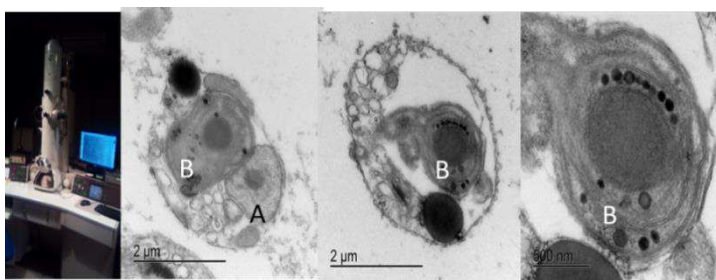


FIGURA 6. MET. Imágenes de algunos cortes histológicos observados en MET. Se pueden observar algunas estructuras como el núcleo (A), cloroplastos (B) entre otras estructuras observadas 5 meses después de seis meses.

6.4 Identificación Molecular

Se tomó una muestra del cultivo para realizar la extracción de DNA por medio del “ZR Soil Microbe DNA Kit”, posteriormente se realizó la PCR con primers específicos de *Phaeocystis* y se comprobó la presencia de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa y mediante un Nanodrop 2000 se midió la concentración de dichos productos.

Se realizó la purificación de la PCR y posteriormente se mandó a secuenciar el resultado en el Instituto de Biología de la UNAM

6.5 Filogenia

Las secuencias obtenidas se clasificarán con el programa online FunGene (Functional Gene Pipeline & Repository) y se alinearán y editarán con el programa BioEdit. Se realizó una comparación de la secuencia genética obtenida con otras de los mismos géneros previamente buscadas en el GENBANK para poder determinar que especie es y así poder caracterizarla filogenéticamente.

7. Impacto de las actividades del servicio social en programa o proyecto de adscripción

Al hacer la caracterización morfológica y molecular de *Phaeocystis sp.* En condiciones de cultivo se pudieron encontrar los siguientes resultados.

Para la morfología de la especie se pudo lograr el objetivo debido a que el cultivo y las fotografías dieron suficiente evidencia para describir a *Phaeocystis sp.* externamente, aunque debido al tiempo y el recambio del cultivo después de unos meses el cultivo de *Phaeocystis* desapareció quedando una especie diferente a la inicial, de esta otra especie se observó la ultraestructura y se realizó la secuencia molecular dando como resultado un alga del género *Ochromonas*.

La relevancia de esta investigación radica en que aporta información de las especies que se encuentran en las costas mexicanas y que ayuda a mejorar técnicas para lograrlo, ya que al ser trabajos de prueba y error dan pie a mejorar y cambiar las técnicas de cuidado de los cultivos y no dar pie a la pérdida de información.

8. Aprendizaje y habilidades obtenidas durante el desarrollo del servicio social.

El desarrollo de las actividades del servicio social se llevó a cabo en el laboratorio de Ecología y Diversidad del Fitoplancton del Instituto de Ciencias Del Mar y Limnología de la (UNAM). Se desarrolló un adecuado manejo de diferentes materiales del laboratorio, entre ellos se encuentra la separación de microorganismos para cultivos y el saber utilizar diferentes microscopios, entre esos microscopios se encuentra el microscopio de luz, el microscopio de luz invertido y con técnica de contraste diferencial (Nomarski).

Por otra parte, realizo preparaciones para observaciones en microscopios electrónicos de barrido, de transmisión y microscopio confocal. Adquirido conocimiento de técnicas de extracción de DNA y PCR.

9. Fundamento de las actividades del servicio social.

El estudio del fitoplancton es de gran importancia debido a que contribuye en gran medida en la producción primaria y son parte de los ciclos biogeoquímicos del planeta, también ayudan a conocer el estado de salud de los ecosistemas. Es indispensable conocer las especies que existen en las costas del país para conocer el estado de salud de estas. Al existir especies que contribuyen en producción de DMS y DMSP, como es el caso de *Phaeocystis*, gases importantes en los ciclos del azufre y carbono es indispensable saber que especies lo están generando. Por esta razón es necesario realizar cultivos de especies difíciles de estudiar con muestras fijadas y realizar estudios taxonómicos y moleculares de las mismas

10. REFERENCIAS.

Andersen, R. A., Bailey, J. C., Decelle, J. y Probert, I. (2015). *Phaeocystis rex* sp. nov. (Phaeocystales, Prymnesiophyceae): a new solitary species that produces a multilayered scale cell covering. *European Journal of Phycology*, 50(2), 207-222.

Eikrem W., Medlin, L. K., Henderiks, J., Rokitta, S., Rost, B., Probert, I. y Edvardsen, B. (2016). Haptophyta. In Handbook of the Protists (pp. 1-61). *Springer International Publishing*.

Hernández-Becerril, D. U. (2014). Biodiversidad de algas planctónicas marinas (Cyanobacteria, Prasinophyceae, Euglenophyta, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatophyceae, Parmophyceae, Raphidophyceae, Bacillariophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Dinoflagellata) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, S44-S53.

ICMyL. (2019). Universidad Nacional Autónoma de México. [En línea] Obtenido de: <https://www.icmyl.unam.mx/es/quienes-somos/antecedentes#> [Último acceso: 05 mayo 2019]

Jordan R. W., Chamberlain A. H. L. (1997). Biodiversity among haptophyte algae. in *Biodiversity and Conservation* 6, 131-152

Lange, M., Chen, Y. Q. y Medlin, L. K. (2002). Molecular genetic delineation of *Phaeocystis* species (Prymnesiophyceae) using coding and non-coding regions of nuclear and plastid genomes. *European Journal of Phycology*, 37(1), 77-92.

Medlin, L., & Zingone, A. (2007). A taxonomic review of the genus *Phaeocystis*. In *Phaeocystis, major link in the biogeochemical cycling of climate-relevant elements* (pp. 3-18). Springer, Dordrecht.

Rousseau, V., Vaultot, D., Casotti, R., Cariou, V., Lenz, J., Gunkel, J. y Baumann, M. (1994). The life cycle of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae): evidence and hypotheses. *Journal of marine systems*, 5(1), 23-39.

Schoemann, V., Becquevort, S., Stefels, J., Rousseau, V. y Lancelot, C. (2005). *Phaeocystis* blooms in the global ocean and their controlling mechanisms: a review. *Journal of Sea Research*, 53(1-2), 43-66.

UAM-X. (2019) Universidad autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco [En línea] Obtenido de <https://www.xoc.uam.mx/acerca-uam-modelo-academico> [Último acceso: 05 mayo 2019]