

# UNIVERSIDAD DEL MAR

## *campus Puerto Ángel*



**Título: Condiciones ambientales y organismos asociados al cambio de coloración de la Laguna La Salina, Bajos de Coyula, Oaxaca**

TESIS

Que para obtener el Título Profesional de  
**Licenciada en Biología Marina**

Presenta

**Andehui Danay Morales Flores**

Dirigida por:

**Dra. Ivonne Sandra Santiago Morales**

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2019

## Resumen

Las lagunas costeras en Oaxaca pueden presentar condiciones de hipersalinidad que favorecen la presencia de microorganismos halófilos, por lo cual es importante generar información sobre las características físicas, químicas y biológicas de estos cuerpos de agua. En el presente estudio, se generó información sobre la Laguna La Salina, Bajos de Coyula, Oaxaca, México. Se evaluaron parámetros fisicoquímicos y concentración de nutrientes del agua. Para conocer la variedad de microorganismos se aislaron y cultivaron en el medio Pfennig en dos salinidades (3.15 M y 4.2 M), en condiciones aerobias y anaerobias, a 35 °C en oscuridad. También se evaluó el crecimiento en medio marino (0.5 M). La Laguna La Salina fue hipersalina (51-53 UPS) en todo el cuerpo de agua. Se registró la presencia de dos ambientes según la coloración del agua: la zona con agua rosa presentó bajas concentraciones de oxígeno (0.2 a 0.62 mg L<sup>-1</sup>) así como temperaturas de 28.5 a 31.3 °C y un pH de 7.65 a 7.89. A su vez, el agua color verde presentó condiciones aerobias (8.31 y 10.95 mg L<sup>-1</sup>), mayor temperatura (34.3 y 36.6 °C) y mayores pH (8.36 y 8.8). Las concentraciones de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup> fueron de 13.64 μM a 23.84 μM, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 0.73 μM a 1.25 μM, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> de 10.41 μM a 32.08 μM y SiO<sub>2</sub> de 70.96 μM a 88.97 μM. Los organismos aislados pertenecen a grupos filogenéticamente distintos pero adaptados a ambientes salinos. Los organismos representados fueron la haloarquea *Haloterrigena hispanica* de coloración roja, y dos bacterias halófilas, *Halobacillus halophilus* y *Halomonas salina*. La presencia de estos microorganismos son evidencia del uso antiguo de una salina artesanal usada por los habitantes de Bajos de Coyula. El cierre de la bocabarra en este cuerpo de agua ha permitido las condiciones nuevamente para el crecimiento masivo de haloarqueas rojas principalmente.

*Palabras clave:* laguna costera, hipersalinidad, halófilos, haloarquea, bacteria, Oaxaca

## Abstract

Extreme environments have been considered to be populated almost exclusively by prokaryotic organisms. Some coastal lagoons at Oaxaca are natural hypersaline environments. The present work studied the environmental conditions and the microorganism that flourished in the “La Salina” Lagoon of Bajos de Coyula, Oaxaca, and that turned on pink for a short time the watercolor. Environmental conditions were evaluated by physicochemical parameters and water nutrients. The variety of microorganisms were isolated and cultivated by Pfennig medium. Changing the salinity (3.15 M and 4.2 M), with oxygen and with an anaerobic chamber, incubated at 35°C in darkness, also with marine medium (0.5 M). The environment conditions showed that the high salinity levels remained equal in the mass of water (51-53). The presence of two environments by the water appearance: the pink zone presented low levels of oxygen (0.2 to 0.62 mg L<sup>-1</sup>), temperatures from 28.5 to 31.3 °C and a pH of 7.65 to 7.89. In contrast, the green water showed aerobic conditions (8.31 y 10.95 mg L<sup>-1</sup>), higher water temperature (34.3 y 36.6 °C) and a higher pH (8.36 y 8.8). The nutrients showed the next values: NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (from 13.64 μM to 23.84 μM), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (from 0.73 μM to 1.25 μM), PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (from 10.41 μM to 32.08 μM) and SiO<sub>2</sub> (from 70.96 μM to 88.97 μM). The resulted isolated microorganisms correspond to a different Phylum however they were adapted to extreme salinity conditions: the red haloarchaea *Haloterrigena hispanica*, and two bacterias, *Halobacillus halophilus* and *Halomonas salina*. The presence of these microorganisms is an evidence of the ancient usage of an artisanal salina by the population of Bajos de Coyula. The sedimentation processes that lead the closure of the coastal lagoon promoted again the conditions for a massive growth of red haloarchaeon.

*Keywords: coastal lagoon, hipersalinity, halophiles, red archea, bacteria, Oaxaca.*

*Al universo,  
Por permitirme conocer a maravillosas personas,  
Por darme tiempo y vida para contemplar lo que me rodea,  
Por dejarme ser una exploradora de su inmensidad.*

## **Agradecimientos**

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo de la Universidad del Mar, del proyecto CONACyT INFR-2015, y de la Sociedad Cooperativa Bajos de Coyula, que colaboró en la toma de muestra.

A mi directora de tesis la Dra. Ivonne Santiago, quien me brindo su confianza y apoyo durante todo este proceso, así como la facilidad del uso del Laboratorio de Análisis de Ficotoxinas (Larvatron). Gracias por darme la oportunidad de trabajar con su equipo durante mi formación, ha sido una guía y amiga que me ayudó a resolver mis dudas sobre la ciencia.

A a la M.C. Yolanda Huante, por asesorarme y enseñarme las técnicas de microbiología. Por su amistad, conocimiento y tiempo compartido le estoy muy agradecida.

A a la M.C Barbara Zavala por guiarme y resolver mis dudas con la programación de los mapas de Matlab.

A la Dra. Amayaly Becerril Espinosa por aportar su conocimiento en la realización de los mapas filogenéticos.

Al Dr. Aramis Olivos Ortíz quien colaboró para la realización del análisis de nutrientes en la Universidad de Colima.

Al Dr. Ernesto García Mendoza por sus enseñanzas sobre fotobiología y la convivencia con su grupo de trabajo. También por las correcciones para mejorar la calidad de este escrito.

A la RedFAN por el apoyo económico para mis movilidades durante estancias, así también durante el congreso de la SOMEFAN 2017. A los miembros de esta red,

por su ejemplo del trabajo en equipo, por los cursos y todo el aprendizaje que pude compartir con ellos.

A mis padres Angel David y María de la Soledad, mis hermanos Alejandro y Angeles Vida, son y serán mi mayor inspiración, por enseñarme a vivir y hacerme feliz con su amor, por ser mi hogar, cuidarme cerca o lejos, por alimentar mi curiosidad. A mis abuelitos Marina, Angela, David y Genaro, a la familia Morales Cortes y la familia Flores Galindo. Gracias al universo por dejarme ser parte de su vida. Los amo.

A colegas y amigos del Larvatron, Sara, Kike, Abraham, Ángeles, Caro, Jenifer, Areli, Sofi, Leo, Irene, Victoria, Blanca, Carolina, por sus enseñanzas y amistad. A la generación de umareños, Eli, Martha, Lucero, Jovis, Marco, Itza, Fer, Isaac, Julio, Moni, Scarlett, Lore, Ibra, Bell, Paco, Amauri, Isa... Todo lo aprendido fue gracias a su participación. Ha sido un gusto conocerlos. ¡Puro biólogo de calidad! A los que conocí fuera de las aulas, Pedro, Raúl, Violeta, Chido, Ángel, Sac, mis Garrobo *Nostrum*, con los que compartí sonrisas, buenas conversaciones y que me enseñaron algo nuevo por hacer, imaginar y soñar. A mis amigos de Ensenada por su amistad, las comidas y buenas caminatas, Brisa, Tadashi, Alicia, Ari, Jorge y oceanólogos de CICESE, son la onda. ¡Mis amigos de Huajuapán! Les admiro y quiero, Jony, Sori, Hernán, Yakin, Tavo, Memo, a los tiernos y los tejones. A Salomón Torres por su cariño, con quien compartí la magia de las lagunas costeras, mares, selvas, bosques, nubes, cielos y lo que fotografiamos con el corazón.

A la Universidad del Mar, por ser mi casa de estudios y la oportunidad de formar parte de su equipo, gracias al personal de esta institución por su atención, su trabajo y mantener radiante nuestra universidad.

¡A los profesores de la UMAR! Les aprendí muchas cosas, a veces sólo fue necesario que me motivaran a seguir adelante... ¡Mis mejores deseos!

## Contenido

|  |           |
|--|-----------|
| I. Resumen   | 2         |
| II. Abstract   | 3         |
| III. Agradecimientos   | 5         |
| IV. Índice de figuras  | 8         |
| V. Índice de tablas  | 9         |
| <b>1. Introducción</b>   | <b>10</b> |
| <b>2. Antecedentes</b>   | <b>11</b> |
| <b>3. Justificación</b>  | <b>17</b> |
| <b>4. Hipótesis</b>  | <b>18</b> |
| <b>5. Objetivos</b>  | <b>18</b> |
| 5.1 Objetivo general   | 18        |
| 5.2 Objetivos particulares   | 18        |
| <b>6. Metodología</b>  | <b>18</b> |
| 6.1 Área de estudio  | 18        |
| 6.2 Descripción de la fenomenología  | 20        |
| 6.3 Obtención y procesamiento de muestras  | 22        |
| 6.4 Conteo celular   | 23        |
| 6.5 Análisis de nutrientes   | 23        |
| 6.6 Aislamiento y crecimiento de los microorganismos   | 24        |
| 6.7 Tinción Gram   | 25        |
| 6.8 Identificación de los cultivos aislados  | 26        |
| 6.8.1 Extracción de ADN  | 26        |
| 6.8.2 PCR y secuenciación  | 26        |
| 6.8.3 Análisis filogenético  | 27        |
| <b>7. Resultados</b>   | <b>27</b> |
| 7.1 Condiciones ambientales  | 27        |
| 7.2 Densidad celular y nutrientes  | 32        |
| 7.3 Aislamiento y cultivo de los organismos  | 37        |
| 7.4 Descripción e identificación de los aislados   | 38        |
| 7.4.1 Morfología celular y colonial cepa MP5   | 38        |
| 7.4.2 Análisis filogenético cepa MP5   | 39        |
| 7.4.3 Morfología celular y colonial cepa P1  | 41        |
| 7.4.4 Análisis filogenético cepa P1  | 42        |
| 7.4.5 Morfología celular y colonial cepa Pf  | 44        |
| 7.4.6 Análisis filogenético cepa Pf  | 45        |
| <b>8. Discusiones y conclusiones</b>   | <b>46</b> |
| 9. Recomendaciones   | 57        |
| XI. Referencias  | 58        |
| XII. Anexos  | 66        |
| XII. I Anexo I. Los medios de cultivo utilizados para los microorganismos de la laguna "La Salina" Bajos de Coyula | 66        |

## Indice de figuras

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1  | Mapa de la zona de estudio, los puntos de muestreo (puntos rojos) y las características del uso de suelo (naranja) y la edafología (rosa) de la Laguna La Salina, Bajos de Coyula.   | 20 |
| Figura 2  | Laguna La Salina, Bajos de Coyula. 9 de marzo de 2016, cortesía del Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica, UMAR.   | 21 |
| Figura 3  | Bocabarra de la Laguna La Salina en Bajos de Coyula, 9 de marzo de 2016, cortesía del Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica, UMAR.   | 21 |
| Figura 4  | Distribución horizontal del oxígeno disuelto (mg L <sup>-1</sup> ) en la Laguna La Salina, Bajos de Coyula, Oaxaca   | 28 |
| Figura 5  | Distribución horizontal de la temperatura (°C) en la Laguna La Salina, Bajos de Coyula, Oaxaca.  | 29 |
| Figura 6  | Distribución horizontal del pH en la Laguna La Salina, Bajos de Coyula, Oaxaca.  | 30 |
| Figura 7  | Distribución horizontal de la salinidad en la Laguna La Salina, Bajos de Coyula, Oaxaca.   | 31 |
| Figura 8  | Distribución horizontal de la densidad celular (cel mL <sup>-1</sup> x10 <sup>8</sup> ) en la Laguna La Salina, Bajos de Coyula, Oaxaca.   | 33 |
| Figura 9  | Distribución horizontal de nitratos más nitritos (µM) en la Laguna La Salina, Bajos de Coyula, Oaxaca.   | 34 |
| Figura 10 | Distribución horizontal de amonio (µM) en la Laguna La Salina, Bajos de Coyula, Oaxaca.  | 35 |
| Figura 11 | Distribución horizontal de ortofosfatos (µM) en la Laguna La Salina, Bajos de Coyula, Oaxaca.  | 36 |
| Figura 12 | Distribución horizontal de silicatos (µM) en la Laguna La Salina, Bajos de Coyula, Oaxaca.   | 37 |
| Figura 13 | Características de la cepa MP5 cultivada en medio líquido y agar Pfennig modificado (A y B) Micrografías de células vivas (C) y tinción Gram negativa (D) (escala de 10 µm).   | 38 |
| Figura 14 | Crecimiento de la cepa MP5 en placa, medio marino (A) y Pfennig modificado 3.15 M NaCl en ausencia de oxígeno (B), al aumentar la salinidad a 4.5 M en condiciones aerobias las colonias también presentan un tono rojo (C y D).                 | 39 |
| Figura 15 | Árbol filogenético resultante del análisis de Neighbor joining (p-distance, 1000 bootstrap), con secuencias del gen 16S ARNr, donde se observa la relación de similitud de la cepa MP5 con las cepa tipo (T) de <i>Haloterrigena hispanica</i> . | 40 |
| Figura 16 | Micrografías de la cepa P1 en medio líquido Phening 3.15 M NaCl (A) y tinción Gram positiva (B), (escala 10 µm) y colonia amarilla (C); micrografía de células cocoides (D), colonia (E) y en agar Pfennig 4.2 M (F).                            | 41 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 17 | Micrografías de la cepa P1 en agar marino (escala 10 $\mu\text{m}$ ) (A), crecimiento en placa (B) y forma de la colonia (C).   | 42 |
| Figura 18 | Árbol filogenético resultante del análisis de Neighbor joining (p-distance, 1000 bootstrap), con secuencias del gen 16S ARNr, donde se observa la relación de similitud de la cepa P1 con las cepa tipo (T) de <i>Halobacillus halophilus</i> . | 43 |
| Figura 19 | Micrografías de la cepa Pf en medio Pfennig 3.15 M NaCl (A), tinción Gram negativa (B) y las colonias en placa (C); crecimiento en medio Pfennig líquido 4.2 M NaCl (D) y colonias en placa (E y F); escala 10 $\mu\text{m}$ .                  | 44 |
| Figura 20 | Micrografía de la cepa Pf en agar marino, escala 10 $\mu\text{m}$ (A) y crecimiento en placa (B) con detalle en una colonia (C).  | 45 |
| Figura 21 | Árbol filogenético resultante del análisis de Neighbord joining (p distance, bootstrap de 1000) utilizando secuencias del gen 16S ARNr, donde la cepa Pf se agrupa con <i>Halomonas salina</i> de ambientes costeros (AC).                      | 46 |

### Índice de tablas

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Tabla I   | Ubicación de los puntos de muestreo en La Laguna La Salina, Bajos de Coyula, 09 de marzo de 2016.  | 22 |
| Tabla II  | Parámetros fisicoquímicos de la Laguna La Salina, Bajos de Coyula del 09 de marzo de 2016.   | 27 |
| Tabla III | Abundancias celulares ( $\text{cel mL}^{-1} \times 10^6$ ) del 09 de marzo de 2016 y nutrientes ( $\mu\text{M}$ ) del primer y segundo muestreo en la Laguna La Salina, Bajos de Coyula. | 32 |
| Tabla IV  | Medio Pfennig modificado   | 66 |
| Tabla V   | Solución de elementos traza SL-12B para 100 ml agua destilada  | 67 |
| Tabla VI  | Preparación de Agar medio marino   | 67 |