

Análisis de la diversidad microbiana en la zona geotérmica de Comanjilla, Gto.

García Sánchez Isai¹, Márquez Gámez Miriam del Carmen¹, Noriega Luna Berenice¹

¹Universidad de Guanajuato
berenice.noriega@correo.mx¹

Resumen

Comanjilla es una localidad perteneciente al municipio de Silao, Gto., la cual tiene dentro de sus limitaciones la presencia de aguas azufro termales y géiseres que tienen su origen por una falla geológica que atraviesa las inmediaciones de la Sierra de Guanajuato. El agua al momento de escurrir por las paredes de dicha falla alcanza a tener profundidades que hacen posible un aumento de temperatura, alcanzando niveles adecuados para el crecimiento de diferentes microorganismos extremófilos. En esta investigación se realizó el análisis microscópico de muestras de tapete microbiano y de agua de las zonas termales de Comanjilla, Gto., para identificar los microorganismos presentes, particularmente diatomeas.

Palabras clave: Comanjilla, diatomeas, aguas termales.

Abstract

Comanjilla is a town belonging to the municipality of Silao, Gto., which has within its limitations the presence of sulfur-thermal waters and geysers that have their origin by a geological fault that crosses the vicinity of the Sierra de Guanajuato. When the water runs down the walls of this fault, it reaches depths that make possible an increase in temperature, reaching levels suitable for the growth of different extremophilic microorganisms. In this research, microscopic analysis of microbial mat and water samples from the thermal zones of Comanjilla, Gto. was carried out to identify the microorganisms present, particularly diatoms.

Keywords: Comanjilla, diatoms, hot springs.

Introducción

Las diatomeas son un tipo de algas que se caracterizan por poseer una pared celular conformada de sílice, que rodea completamente su estructura. Poseen a su vez una frústula que se conforma de dos partes desiguales la epiteca y la hipoteca, cada frústula posee patrones únicos que se delimitan por medio de su genética, así mismo las frústulas están hechas de sílice y albergan matrices con carbohidratos y proteínas. (Colín-García, y otros, 2013). Las diatomeas cuentan con registros fósiles que datan de la era Cretácica, ya que durante esa época eran muy abundantes y conformaban enormes depósitos. Hoy en día, las diatomeas están distribuidas a lo largo de los ecosistemas marinos y en agua dulce, así como también en sedimentos y en ecosistemas extremos tales como las zonas geotérmicas. Las diatomeas pueden encontrarse tanto de manera individual como formando colonias. Una aportación que se les puede adjudicar es que son responsables, al menos de un 25%, de la fijación del carbono orgánico que hay en el planeta y pueden presentar diversos usos tales como aplicaciones industriales o de investigación. (Colín-García, y otros, 2013).

Comanjilla es una localidad ubicada en el municipio de Silao perteneciente al estado de Guanajuato (Figura 1), en donde se localizan pequeños géiseres y aguas azufro termales e intermitentes. (Wittich, 1910). El géiser más alto y grande se llama "Géiser Humboldt," tiene un diámetro de aproximadamente 1.15 m, más fuerte. Aproximadamente a 10 m del géiser Humboldt se tiene un grupo de manantiales azufro-termales en donde algunos presentan agua hirviendo con intermitencia mientras en otros el agua desborda sin interrupciones. (Wittich, 1910). Las aguas termales se originaron por una falla geológica, la cual atraviesa la Sierra de Guanajuato y por los escurrimientos de agua que se generan se forman cuencas subterráneas a profundidades estimadas de entre 480 a 550m. Al pasar el agua por las fracturas entra en contacto El estado de Guanajuato alberga una numerosa cantidad de manantiales termales, dichos manantiales surgen como

resultado de la actividad de las placas tectónicas y de los fenómenos relacionados con el vulcanismo que alberga el territorio. Las temperaturas que estos sitios alcanzan varían entre los 32° y 100°C, siendo los más significativos los de La Gruta (Corredor Dolores Hidalgo-Atotonilco), La Caldera (Corredor Abasolo-La Piedad), San Bartolomé Agua Caliente (Corredor Apaseo el Alto), y Comanjilla (Corredor Silao-León), situados respectivamente en los municipios de Silao, Dolores Hidalgo, Atotonilco, Abasolo, Apaseo el Alto. (Puy y Alquiza et al., 2017). con un tipo de barrera natural sólida provocando una zona de 120 m de largo con 60 m de ancho cubierta por géiseres. (Club, s.f.). lo que provoca un incremento en la temperatura del agua, alcanzando niveles adecuados para el crecimiento de diferentes microorganismos extremófilos. La presente investigación tiene como objetivo conocer la diversidad de diatomeas termófilas en muestras de tapete microbiano y agua termal provenientes de Comanjilla, Gto.

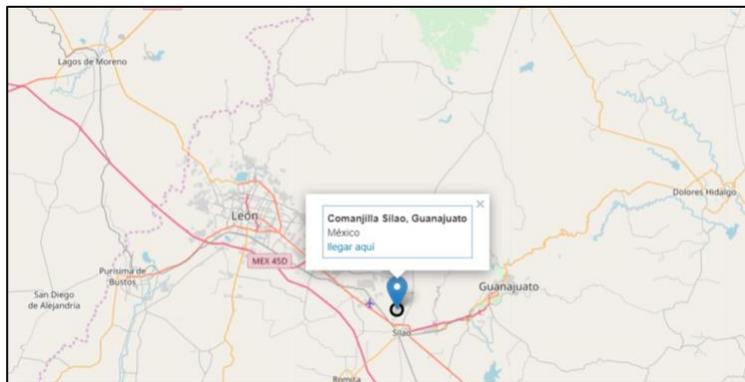


Figura 1 Ubicación del municipio de Comanjilla. Gto (Fuente:Google Maps)

Metodología

Toma de muestras de agua y tapetes microbianos

Las muestras de tapete microbiano y agua se recogieron asépticamente de una de las fosas termales de Comanjilla Gto., en diferentes recipientes y se procesaron inmediatamente en el laboratorio. Se tomaron tres réplicas de cada muestra en el mismo punto del mismo lugar. Para el muestreo, preservación y manejo de las muestras se tomó en cuenta la norma oficial mexicana NOM -230-SSA1-2002. Las muestras se colocaron en hieleras con bolsas de refrigeración o bolsas de hielo para su traslado al laboratorio, a una temperatura entre 4°C a 10°C, cuidando de no congelar las muestras.

Observación de las muestras con microscopio óptico y clasificación

Los aspectos morfológicos de la diatomea se investigaron mediante la observación en el microscopio óptico. Para su observación se utilizó el protocolo de Martin-Jézéquel que se describe a continuación: 1. La muestra se filtró con un filtro que no se disuelve con el solvente orgánico. 2. Los filtros se colocaron en recipientes adecuados para su secado en puntos críticos. 3. Se fijó con una solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato 0,1M preparada con agua de mar filtrada. 4. Para eliminar las sales, las muestras se transfirieron a concentraciones decrecientes de agua de mar. 5. Después de la fijación se deshidrató en series de etanol creciente. 6. Finalmente la muestra se secó en el desecador hasta el punto crítico. Para la asignación genérica de las diatomeas se utilizó la guía de Round.

Preparación de placas de agar con medio de Guillard F/2

El medio F/2 de Guillard es un medio marino enriquecido y comúnmente utilizado en el cultivo de algas marino-costeras, especialmente diatomeas. Recibe este nombre porque la concentración de la fórmula original, llamada medio "F" (Guillard y Ryther, 1962) ha sido diluida a la mitad. El medio de Guillard F/2 se preparó con y sin silicatos. Se empleó la metodología descrita por Invemar (2017). Se preparó agar bacteriológico a una concentración de 20 g.L⁻¹ con agua de mar hipertónica. El agar se disolvió empleando una parrilla de calentamiento a 300°C con agitación magnética a 350 rpm. Se adicionaron los nutrientes de la preparación del medio F/2, exceptuando las vitaminas y esterilizando en autoclave. Se dejó enfriar y se le adiciono la solución de vitaminas. Finalmente se colocó un volumen de 25 ml por placa.

Aislamiento por rayado en agar

Dentro de la campana de flujo laminar se tomó un poco de tapete, así como de agua de la muestra recolectada de Comanjilla y ambas se rayaron suavemente sobre una placa de agar con un asa bacteriológica. Este procedimiento se realizó por duplicado tanto para el medio F/2 con silicatos como para F/2 sin silicatos. Las placas se incubaron por dos días a 37°C hasta observar crecimiento.

Caracterización morfológica colonial

Una vez observado el crecimiento de las colonias en el agar con medio de Guillard F/2, con y sin silicatos, estas fueron caracterizadas y contabilizadas con un contador de colonias. Las características registradas fueron tamaño, forma, borde, transparencia, brillo, color, textura y elevación. Posteriormente se seleccionaron las colonias más predominantes para su aislamiento.

Preparación de placas de agar tripticasa de soya

Para el cultivo de bacterias se preparó agar tripticasa de soya. El agar se esterilizo y posteriormente se colocó en placas. Las muestras de agua fueron sembradas y se dejaron en incubación a 37°C durante 24 horas.

Tinción de Gram

En condiciones estériles se realiza un frotis en un portaobjetos con ayuda del asa bacteriológica. Después, se deja secar para fijar la muestra con el fuego del mechero, moviendo el portaobjetos de manera circular y no tan cercano al fuego. Una vez realizado el frotis, se añaden unas cuantas gotas de solución de cristal violeta durante 1min cubriendo toda el área donde se realizó el frotis y se enjuaga con agua destilada. Después, se añade una solución yodo-lugol durante 1 min y se enjuaga con alcohol. Finalmente, el frotis se cubre con safranina dejando actuar durante 1 min y se vuelve a enjuagar con agua destilada y se deja secar al aire libre.

Resultados

En la figura 1 se presentan algunas especies de diatomeas que se encontraron en las muestras de tapete microbiano formado en la superficie de las aguas de las fosas termales de Comanjilla, Gto. Realizando una identificación morfológica se encontró que las principales diatomeas identificadas pertenecían a la clase *Bacillariophyceae*.

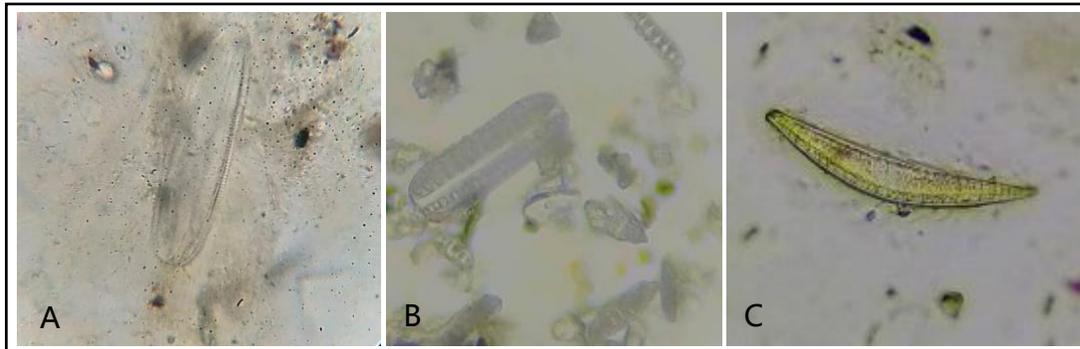


Figura 1. Imágenes de microscopio óptico. A,B y C Diatomeas de la clase Bacillariophyceae

En la figura 2 se muestran las colonias que se desarrollaron en las muestras de agua y tapete microbiano en el medio de Guillard F/2. En la figura 2A se observan las colonias que se desarrollaron de la muestra del tapete microbiano, se pueden apreciar abundantes colonias puntiformes, mientras que en la figura 2B, que corresponde a la muestra de agua, se observa un número pequeño de colonias transparentes.

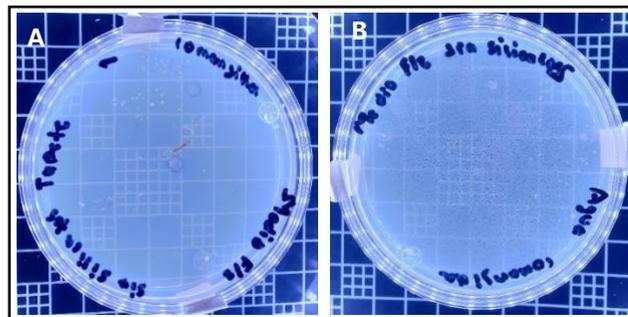


Figura 2. Imágenes de la caracterización morfológica en el contador de colonias.

En las tablas 1, 2, 3 y 4 se resume la caracterización de la morfología colonial de las colonias que crecieron después de sembrar las muestras de agua y tapete microbiano. Se encontraron un total de 13 morfologías coloniales, 4 colonias se desarrollaron en medio Guillard F/2 sin silicatos de la muestra de agua (Tabla 1), 3 colonias se desarrollaron en medio Guillard F/2 sin silicatos para la muestra tapete (Tabla 3), 3 colonias se desarrollaron en medio Guillard F/2 con silicatos de la muestra de agua (Tabla 2) y 3 colonias se desarrollaron en medio Guillard F/2 con silicatos de la muestra de tapete (tabla 4). Respecto a las formas de las colonias predomina las colonias circulares e irregulares, los tamaños son pequeños, medianos y grandes, los bordes son enteros, lobulados y ondulados, en general no presentan brillo ni color, su textura es lisa y la mayoría son planas. En la tabla 5 se resumen las características morfológicas de las colonias que se desarrollaron en el agar tripticosa de soya.

Tabla 1. Crecimiento colonial y morfología de agua de Comanjilla, Gto. en medio F/2 sin silicatos.

Caja	Número colonias	Tamaño	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color	Textura	Elevación
1	30	Grande	Irregular	Lobulado	Transparente	No	No	Lisa	Plana
2	33	Pequeña	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
3	9	Mediana	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
4	5	Pequeña	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Elevada

Tabla 2. Crecimiento colonial y morfología de agua de Comanjilla, Gto. en medio F/2 con silicatos

Caja	Número colonias	Tamaño	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color	Textura	Elevación
1	5	Puntiforme	Circular	Entero	Transparente	No	No	Lisa	Plana
2	6	Mediana	Irregular	Ondulado	Transparente	No	No	Lisa	Plana
3	45	Pequeña	Circular	Entero	Transparente	No	No	Lisa	Plana

Tabla 3. Crecimiento colonial y morfología de tapete microbiano de Comanjilla, Gto. en medio F/2 sin silicatos

Caja	Número colonias	Tamaño	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color	Textura	Elevación
5	21	Mediana	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
6	55	Pequeña	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
7	8	Pequeña	Circular	Entero	Transparente	No	No	Lisa	Plana

Tabla 4. Crecimiento colonial y morfología de tapete microbiano de Comanjilla, Gto. en medio F/2 con silicatos

Caja	Número colonias	Tamaño	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color	Textura	Elevación
4	7	Pequeña	Circular	Entero	Transparente	No	No	Lisa	Plana
5	3	Pequeña	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
6	53	Pequeña	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana

Tabla 5. Crecimiento colonial y morfología de agua de Comanjilla, Gto. en medio agar tripticaseína

Caja	Número colonias	Tamaño	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color	Textura	Elevación
1	4	Grande	Circular	Entero	Opaca	No	Beige	Lisa	Plana
2	S/N	Mediana	Circular	Entero	Opaca	No	Amarillo	Lisa	Plana

Una vez aisladas las colonias en el medio de Guillard F/2 con y sin silicatos éstas se observaron al microscopio y el crecimiento principalmente registrado fue de bacterias Gram (+) y (-), sin embargo, no se logró identificar en las muestras la presencia de diatomeas y cianobacterias. En la Figura 2 se muestran bacilos Gram (+) (Figura 2A) y bacilos Gram (-) (Figura 2B).

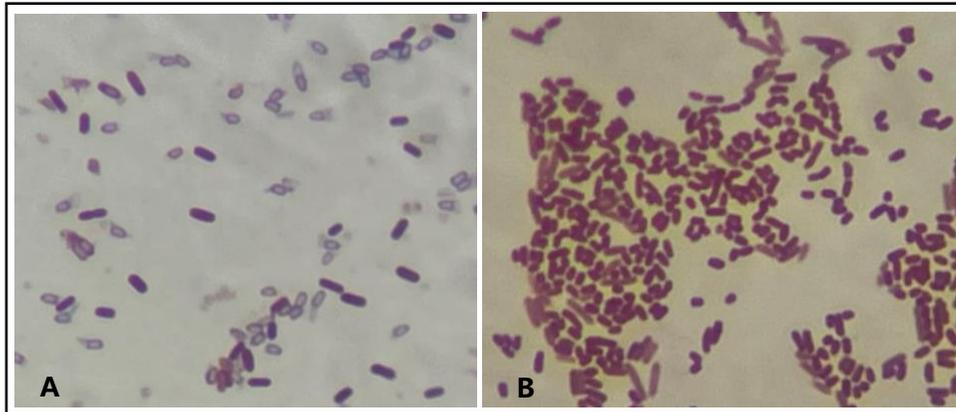


Figura 2. Tinción de Gram. A) Muestra C4 en medio sin silicatos. B) Muestra C5 en medio sin silicatos. Objetivo 100x

En las tablas 6, 7 y 8 se muestran los resultados de la tinción de Gram de las colonias aisladas. En el medio de Guillard F/2 con y sin silicatos crecieron principalmente bacterias Gram negativas, mientras que en el agar tripticasa de soya crecieron bacterias Gram (+).

Tabla 6. Resultados Tinción Gram para colonias de Comanjilla medio F/2 sin silicatos

Número de colonia/cepa	Tinción Gram (+/-)
C3	-
C4	+
C5	-
C6	-
C7	-

Tabla 7. Resultados Tinción Gram para colonias de Comanjilla medio F/2 con silicatos

Número de colonia/cepa	Tinción Gram (+/-)
C1	+
C2	-
C6	-

Tabla 8. Resultados Tinción Gram para colonias de Comanjilla agar tripticaseína

Número de colonia/cepa	Tinción Gram (+/-)
C1	+
C2	+

Discusión

En el estudio microbiológico de estas mismas aguas termales realizado por Díaz de León Velázquez et al., (2021), se reportó que las principales diatomeas identificadas pertenecían a la clase *Bacillariophyceae* las cuales están representadas por los órdenes *Naviculales*, *Cymbellales*, *Achnanthes*, *Bacillariales* y *Rhopalodiales*; en el estudio se aislaron un total de siete especies conocidas como a) *Sellaphora disjuncta*; b) *Navicula detenta*; c) *Rhopalodia gibberula*; d) *Cocconeis peiculus*; e) *Gomphoneis erianse var. apiculata*; f) *Achnanthes brevipes var. intermedia*; g) *Denticula tenuis Kützing*. Respecto a los resultados obtenidos en este trabajo podemos inferir que sigue prevaleciendo la riqueza microbiana presente tanto en el tapete microbiano como en las muestras de agua de la zona termal de Comanjilla puesto que las diatomeas encontradas en esta investigación tienen características similares a las siete especies reportadas por Díaz de León Velázquez et al., (2021), incluso se puede suponer que haya la existencia de algún orden diferente, ya que hubo especies que no se les pudo encontrar similitud, tal como se muestra en la figura 2 inciso D, pudiendo constituir un nuevo informe sobre la riqueza microbiana si se realizará más a fondo la identificación.

Al comparar las formas celulares obtenidas por Díaz de León Velázquez et al., (2021) que fueron elípticas y lineales con las del presente trabajo, se puede indicar que las estructuras celulares son similares al menos para cinco tipos de diatomeas identificadas en este estudio, las cuales serían *Sellaphora disjuncta*, *Rhopalodia gibberula*, *Cocconeis peiculus*, *Achnanthes brevipes var* y *Denticula tenuis Kützing*. En la figura 2 se puede apreciar la concordancia para las especies *Sellaphora disjuncta* (Inciso A) y *Achnanthes brevipes var. Intermedia* (incisos A, B, C y E), mientras que en la figura 3 se distinguen las especies *Sellaphora disjuncta* (inciso F), *Rhopalodia gibberula* (incisos A y C), *Cocconeis peiculus* (incisos B y E) y *Denticula tenuis Kützing* (incisos D y E). De esta comparación podemos suponer que las diatomeas que aislamos en esta investigación podrían pertenecer a los órdenes y especies identificados en Díaz de León Velázquez et al., (2021).

Conclusiones

Las aguas termales son ricas en una gran variedad de microorganismos los cuales desarrollan características específicas según las propiedades fisicoquímicas que posea el suelo y el agua de la región geográfica en donde crecen y se desarrollan. En este trabajo mostramos especies de diatomeas que interactúan también con otros microorganismos pertenecientes a este cuerpo termal como lo son las bacterias y cianobacterias, lo que puede representar una coyuntura para aplicaciones y usos de estos organismos presentes en esta zona poco explorada y caracterizada microbiológicamente. Respecto a los resultados de esta investigación se afirma que las aguas de la zona termal de Comanjilla, Gto., poseen características importantes que permiten la adaptación de los microorganismos y por lo tanto son un hábitat con un potencial importante para las aplicaciones industriales y biotecnológicas.

Bibliografía

- Club, M. T. (s.f.). *Informacion General, Comanjilla, Guanajuato*. Obtenido de <https://www.mexicotravelclub.com/comanjilla-en-comanjilla-guanajuato>
- Colín-García, M., Heredia, A., Dos Santos-Rodriguez, C. T., Figueira, E., Almeida, S. F., Basiuk, V. A., . . . Vrieling, E. G. (30 de Junio de 2013). *La Granja*. Obtenido de La Granja: <https://lagranja.ups.edu.ec/index.php/granja/article/view/17.2013.01>
- Díaz de León Velázquez, M. R., Altamirano Huerta, H. J., Morales Godínez, D., Ramírez Ortiz, A., Rangel Samano, R. I., & Noriega Luna, B. (07 de septiembre de 2021). *jovenesenlaciencia.ugto.mx*. Obtenido de [jovenesenlaciencia.ugto.mx: http://repositorio.ugto.mx/bitstream/20.500.12059/6113/1/Aplicaci%3b3n%20biotecnol%3b3gica%20de%20las%20algas%20que%20habitan%20en%20los%20tapetes%20microbianos%20de%20las%20fuentes%20termales%20de%20Comanjilla%2c%20Gto..pdf](http://repositorio.ugto.mx/bitstream/20.500.12059/6113/1/Aplicaci%3b3n%20biotecnol%3b3gica%20de%20las%20algas%20que%20habitan%20en%20los%20tapetes%20microbianos%20de%20las%20fuentes%20termales%20de%20Comanjilla%2c%20Gto..pdf)

- Invemar. (2017). <http://cinto.invemar.org.co/>. Obtenido de [http://cinto.invemar.org.co/:
http://cinto.invemar.org.co/alfresco/d/d/workspace/version2Store/80875a59-70ec-40a3-a3fa-
69f85f99f62a/Bacterias_pp1-7-
.pdf?ticket=TICKET_38726256234b83143f7a2e6576327b3dfd7a2728](http://cinto.invemar.org.co/:http://cinto.invemar.org.co/alfresco/d/d/workspace/version2Store/80875a59-70ec-40a3-a3fa-69f85f99f62a/Bacterias_pp1-7-.pdf?ticket=TICKET_38726256234b83143f7a2e6576327b3dfd7a2728)
- M. A., & Puy y Alquiza, M. J. (11 de Enero de 2017). *jovenesenlaciencia.ugto.mx*. Obtenido de *jovenesenlaciencia.ugto.mx*:
<http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/1354>
- PRESIDENCIA MUNICIPAL - APASEO EL GRANDE, G. (5 de Diciembre de 2018). *PROGRAMA Municipal de Desarrollo Urbano y Ordenamiento Ecológico*. Obtenido de [https://apaseoelgrande.gob.mx/wp-
content/obligaciones/hipervinculo/1/PROGRAMA%20MUNICIPAL%20DE%20DESARROLLO%20
URBANO%20Y%20ORDENAMIENTO%20ECOL%C3%93GICO%20TERRITORIAL%20DE%20AP
ASEO%20EL%20GRANDE%2C%20GUANAJUATO%20%28VERSI%C3%93N%20ABREVIADA%
29.pdf](https://apaseoelgrande.gob.mx/wp-content/obligaciones/hipervinculo/1/PROGRAMA%20MUNICIPAL%20DE%20DESARROLLO%20URBANO%20Y%20ORDENAMIENTO%20ECOL%C3%93GICO%20TERRITORIAL%20DE%20APASEO%20EL%20GRANDE%2C%20GUANAJUATO%20%28VERSI%C3%93N%20ABREVIADA%29.pdf)
- Wittich, D. E. (1910). *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*.
<http://boletinsgm.igeolcu.unam.mx/bsgm/vols/epoca01/0601/1909-6-2wittich3.pdf>