

Análisis de la diversidad microbiana en la zona geotérmica de Apaseo el Alto, Gto.

Segura Bustos Andrea Iveth¹, Márquez Gámez Miriam del Carmen¹, García Sánchez Isai¹, Ávila Hernández César Yahir¹, Huerta Martínez Fernando¹, Noriega Luna Berenice¹

¹Universidad de Guanajuato
berenice.noriega@correo.mx¹

Resumen

Apaseo el Alto se encuentra en las limitaciones de una falla geológica, la cual ha generado mantos de aguas termales que tienen condiciones adecuadas para el posible desarrollo de microorganismos extremófilos. El propósito de esta investigación es comprobar la presencia de microorganismos en los tapetes microbianos formados en las aguas termales.

Palabras clave: Apaseo el Alto, aguas termales, microorganismos extremófilos.

Abstract

Apaseo el Alto is located in the limitations of a geological fault, which has generated hot springs that have suitable conditions for the possible development of extremophile microorganisms. The purpose of this research is to verify the presence of microorganisms in the microbial mats formed in the hot springs.

Key words: Apaseo el Alto, hot springs, thermophilic microorganisms.

Introducción

Las algas son un conjunto Alto y diverso de organismos que contienen clorofila y que además llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica, generalmente son de tamaño microscópico y son consideradas microorganismos, aunque existen otras que son de morfología macroscópica que son presentados como agregados de diversas células que comparten funciones o propiedades como lo son sus productos de almacenamiento y sus estructuras en las paredes celulares. (Davis T., Volesky B., Mucci A., 2003). Se encuentran incluidas dentro del reino vegetal, sin embargo, presentan diferencias con las plantas para su reproducción debido a que las algas pueden ser unicelulares o multicelulares, presentando en aquellas que son unicelulares la característica de que los propios organismos tienen la capacidad de comportarse como gametos, además las que son multicelulares sus gametos son producidos en recipientes unicelulares especiales o gametangios. Existen casos en donde los gametangios son multicelulares, lo que significa que cada célula gametangial se encuentra fértil y produce un gameto. Las características anteriores son la base para el estudio y clasificación de las algas. (Davis T., Volesky B., Mucci A., 2003). La presencia de algas termófilas en una fuente termal es determinada principalmente por las condiciones fisicoquímicas del medio, por lo que se convierten en un referente del estado ecológico del mismo. Además, tienen un amplio potencial biotecnológico que son de gran utilidad en varias áreas de estudio (Santamaria, 2010).

En la localidad de Apaseo el Alto existe una falla geológica que va desde el rancho de la Purísima en Apaseo el Alto hasta el molino de Apaseo el Alto de casi 10 kilómetros de longitud. Asimismo, está presente una zona geotérmica entre las localidades Rancho de Guadalupe y Rancho Nuevo. Se ha identificado otra falla geológica ubicada en la comunidad Juan Martín, la cual cruza el municipio de Apaseo el Alto de sur a norte hasta el ejido rancho Nuevo, a la que se le atribuye la generación de afloramientos de aguas sulfurosas. En el municipio de Apaseo el Alto se tienen identificadas un total de 17 fracturas localizadas la zona norte que se encuentran vinculadas a rocas ígneas que conforman el área y a la presencia del volcán el Jocoque, además el municipio intercepta en su parte oriente con una falla ubicada en el estado de Querétaro. (PRESIDENCIA MUNICIPAL - APASEO EL GRANDE, 2018).

En la zona geotérmica localizada en Rancho de Guadalupe se han identificado cráteres geológicos con afloraciones de ojos de agua hirviendo a elevadas temperaturas en la zona correspondiente a la comunidad de Rancho Nuevo, haciendo similitud a pequeños géiseres, algunos estudios realizados en la zona han demostrado que sustancias como cromo, sulfuros y arsénicos están presentes. Las afloraciones de aguas sulfurosas tienen su origen en la falla volcánica que comienza en Calera de Ameche, la cual corre de Apaseo el Alto, siguiendo a la comunidad de La Purísima, Rancho Nuevo y la comunidad de la Laja en Celaya. (PRESIDENCIA MUNICIPAL - APASEO EL GRANDE, 2018). El propósito de este artículo es analizar la diversidad de microorganismos en muestras de agua y tapete microbiano del Rancho la Purísima.

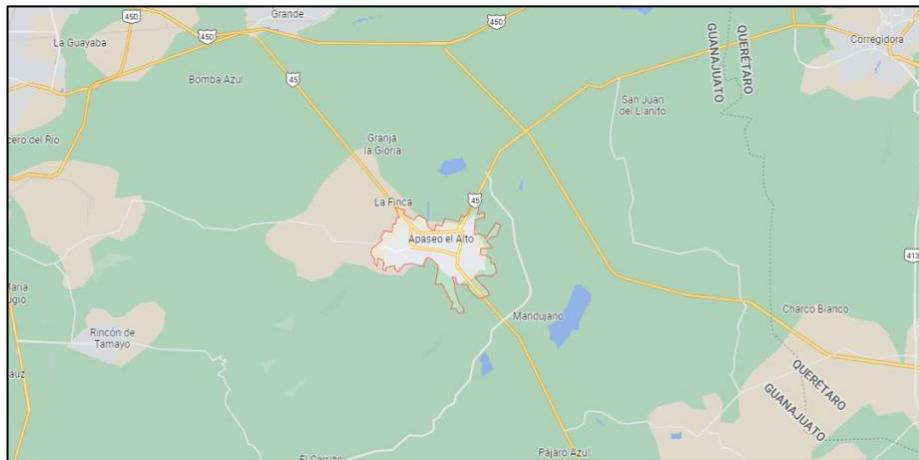


Figura 1 Ubicación de Apaseo el Alto, Gto. (Fuente: Google Maps)

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 Apaseo el Alto., 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 Apaseo 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 2 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 Apaseo el Alto, Gto. Realizando una identificación morfológica se encontró que las principales diatomeas identificadas pertenecían a la clase Bacillariophyceae.

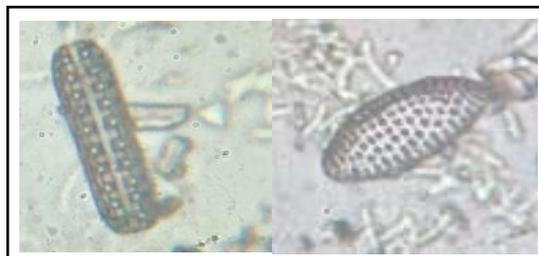


Figura 2. Imágenes de microscopio óptico del tapete microbiano.

En la figura 3 se muestran las colonias que se desarrollaron en las muestras de agua y tapete microbiano en el medio de Guillar F/2. En la figura 3A se observan las colonias que se desarrollaron de la muestra del tapete microbiano, se pueden apreciar abundantes colonias puntiformes, mientras que en la figura 3B, que corresponde a la muestra de agua, se observa un número pequeño de colonias transparentes.

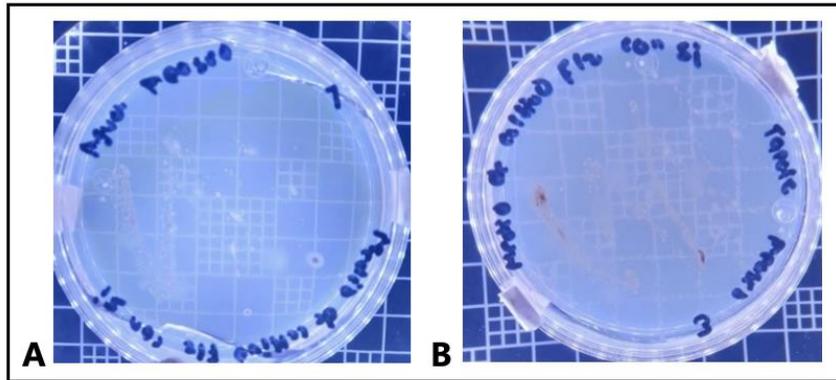


Figura 3. Imágenes de la caracterización morfológica en el contador de colonias.

En las tablas 2, 3, 4 y 5 se presenta la caracterización morfológica de las colonias que crecieron al sembrar muestras de agua y tapete microbiano de la zona termal de Apaseo el Alto, Gto. En total fueron identificadas 28 morfologías diferentes, 5 se sembraron en medio Guillar F/2 sin silicatos, colonias que crecieron de la muestra de agua (Tabla 2), 7 se sembraron en medio Guillar F/2 sin silicatos, colonias que crecieron de la muestra de tapete (Tabla 3), 7 se sembraron en medio Guillar F/2 con silicatos, colonias que crecieron de la muestra de agua (Tabla 4) y 6 se sembraron en medio Guillar F/2 con silicatos colonias que crecieron de la muestra de tapete (Tabla 5). Asimismo, en la tabla 6 se resumen las características morfológicas de las colonias de bacterias que se desarrollaron de la muestra de agua sembrada en agar tripticasa de soya. Respecto a las formas de las colonias predomina las colonias circulares y filamentosas, los tamaños son pequeños y medianos, los bordes son enteros, en general las colonias no presentan brillo ni color, su textura es lisa y la mayoría son planas.

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

Caja	Número Colonias	Tamaño	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color	Textura	Elevación
15	S/n	Pequeña	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
16	S/n	Pequeña	Circular	Entero	Transparente	No	No	Lisa	Plana
17	S/n	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
18	S/n	Puntiforme	Circular	Entero	Transparente	No	No	Lisa	Plana
19	1	Alto	Filamentosa	Filamentoso	Transparente	No	No	Lisa	Plana

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

Caja	Número Colonias	Tamaño	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color	Textura	Elevación
8	7	Mediana	Filamentosa	Filamento so	Transparente	No	No	Lisa	Plana
9	10	Pequeña	Irregular	Rizado	Opaca	No	No	Lisa	Plana
10	5	Pequeña	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
11	S/n	Pequeña	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
12	S/n	Pequeña	Circular	Entero	Transparente	No	No	Lisa	Plana
13	S/n	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
14	S/n	Puntiforme	Circular	Entero	Transparente	No	No	Lisa	Plana

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

Caja	Número colonias	Tamaño	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color	Textura	Elevación
7	S/n	Pequeña	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
8	S/n	Pequeña	Circular	Entero	Transparente	No	No	Lisa	Plana
9	S/n	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
10	S/n	Puntiforme	Circular	Entero	Transparente	No	No	Lisa	Plana
11	17	Mediana	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
12	5	Alto	Filamentosa	Filamentoso	Transparente	No	No	Lisa	Plana

Tabla 5. Crecimiento colonial y morfología de agua de Apaseo, Gto. en medio F/2 con silicatos.

Caja	Número colonias	Tamaño	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color	Textura	Elevación
13	3	Alto	Filamentosa	Filamentoso	Transparente	No	No	Lisa	Plana
1	1	Alto	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
15	S/n	Pequeña	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
16	S/n	Pequeña	Circular	Entero	Transparente	No	No	Lisa	Plana
17	S/n	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	No	No	Lisa	Plana
18	S/n	Puntiforme	Circular	Entero	Transparente	No	No	Lisa	Plana
19	2	Mediana	Irregular	Ondulado	Opaca	No	No	Lisa	Plana

Tabla 6. Crecimiento colonial y morfología de agua de Apaseo, Gto. en medio agar

Caja	Número colonias	Tamaño	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color	Textura	Elevación
3	10	Alto	Circular	Entero	Opaca	No	Naranja	Lisa	Plana
4	3	Alto	Irregular	Ondulado	Opaca	No	Blanca	Rugosa	Umbilicada
5	S/N	Mediana	Circular	Entero	Opaca	No	Beige	Lisa	Elevada

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 (-), lograndose incluso identificar en las muestras la presencia de diatomeas y cianobacterias. En la Figura 4 se muestran bacilos Gram (+) y la presencia de una cianobacteria (Figura 4A), así como también bacilos Gram (-) y la presencia de una diatomea (Figura 4B).

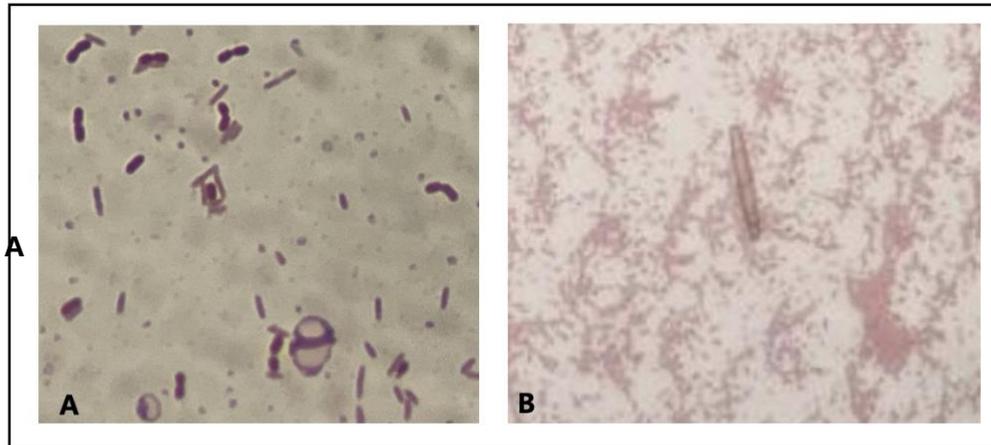


Figura 4. Tinción de Gram. A) Muestra C4 en medio sin silicatos. B) Muestra C5 en medio sin silicatos. Objetivo 100x

En las tablas 7, 8, 9 se muestran los resultados de la tinción de Gram. La mayoría de las colonias aisladas fueron Gram negativas en los 3 medios de cultivo, medio Guillard F/2 con silicatos (Tabla 7), medio Guillard F/2 sin silicatos y agar tripticosa de soya. En su mayoría las cepas mostraron ser negativas a la reacción de Gram.

Tabla 7. Resultados Tinción Gram para colonias de Apaseo medio F/2 sin silicatos

Número de colonia/cepa	Tinción Gram (+/-)
C3	+
C4	-
C5	+
C6	-
C7	-
C8	-
C9	+
C10	-
C11	-
C12	-

Tabla 8. Resultados Tinción Gram para colonias de Apaseo medio F/2 con silicatos

Número de colonia/cepa	Tinción Gram (+/-)
C3	-
C5	-
C7	-
C10	-
C12	+
C13	-

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

Número de colonia/cepa	Tinción Gram (+/-)
C1	-
C2	-
C3	-

Discusión de Resultados

Las colonias aisladas mostraron diferencias significativas en cuanto a su morfología, sobresaliendo una morfología característica. Desafortunadamente no se logró aislar en el medio de Guillard monocultivos de algas, diatomeas y cianobacterias, únicamente se logró en un par de muestras identificar una cianobacteria y una diatomea, el resto de las colonias estaban constituidas por bacterias.

Díaz de León Velázquez et al., (2021), en su investigación reporta un primer informe sobre la caracterización microbiológica de las aguas termales de Comanjilla, en el cual identifica que las principales diatomeas aisladas pertenecían a la clase Bacillariophyceae. Respecto a los resultados obtenidos en este trabajo podemos comparar que la clase de diatomeas reportada en Díaz de León Velázquez et al., (2021) es exactamente la misma que la que logramos aislar nosotros a lo largo de este cometido y que sería la *Bacillariophyceae*.

Del mismo modo, las especies caracterizadas en Díaz de León Velázquez et al., (2021) corresponden a las especies conocidas como a) *Sellaphora disjuncta*; b) *Navicula detenta*; c) *Rhopalodia gibberula*; d) *Cocconeis peiculis*; e) *Gomphoneis erriense var. apiculata*; f) *Achnanthes brevipes var. intermedia*; g) *Denticula tenuis Kützing* por lo que no podemos descartar que las diatomas que nosotros identificamos en este trabajo sean parecidas a la misma especie al menos para *Gomphoneis erriense var. Apiculata* y *Denticula tenuis Kützing* como se muestra en la figura 1, ya que su morfología celular es muy parecida.

Finalmente, cada sitio geotérmico es rico y único en su distribución microbiológica, pero como vimos al comparar este trabajo con el de Díaz de León Velázquez et al., (2021) apreciamos que la variación entre clase y especie no varía mucho con la de otra zona dentro un mismo territorio, en este caso el estado de Guanajuato, ya que a pesar de que existen 135 km de distancia entre ambos puntos (Comanjilla y Apaseo el Alto), la caracterización microbiológica de especies, en este caso diatomeas, es muy similar en ambos sitios.

Conclusiones

Las aguas termales de Apaseo el Alto, Gto., México son reservorio de una variedad de microorganismos, los cuales cuentan con diferentes mecanismos de adaptación de acuerdo con su metabolismo. Los microorganismos que destacan son los microorganismos termófilos, cianobacterias, bacterias y algas. Resulta interesante continuar con la investigación para caracterizar cada microorganismo y evaluar posibles usos en el campo de la biotecnología y la industria.

Bibliografía/Referencias

- Colín-García, M., Heredia, A., Dos Santos-Rodríguez, 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). jóvenesenciencia.ugto.mx. Obtenido de jóvenesenciencia.ugto.mx: <http://repositorio.ugto.mx/bitstream/20.500.12059/6113/1/Aplicaci%C3%B3n%20biotecnol%C3%B3gica%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/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). jóvenesenciencia.ugto.mx. <http://www.jovenesenciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenciencia/article/view/1354>
- Santamaría, D. E. (2010). Algas termófilas: revisión y caso de estudio parque nacional natural los nevados. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10554/8744>
- Sahoo, Dinabandhu. Seckbach, Joseph. (2015). The algae world. New York, EUA: Springer.
- de Desarrollo Urbano y Ordenamiento Ecológico. Obtenido de <https://apaseoelAlto.gob.mx/wp-content/obligaciones/hipervinculo/1/PROGRAMA%20MUNICIPAL%20DE%20DESARROLLO%20URBANO%20Y%20ORDENAMIENTO%20ECOL%C3%93GICO%20TERRITORIAL%20DE%20APASEO%20EL%20ALTO%2C%20GUANAJUATO%20%28VERSI%C3%93N%20ABREVIADA%29.pdf>