



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN GEOCIENCIAS APLICADAS

**Caracterización hidrogeoquímica y diversidad microbiana en
ambientes extremos, casos: Villa Juárez, San Luis Potosí y
Rincón de Parangueo, Guanajuato.**

Tesis que presenta

María Elizabeth Hernández Zavala

Para obtener el grado de

Maestro(a) en Geociencias Aplicadas

Director (Codirectores) de la Tesis:

Dr. José Alfredo Ramos Leal

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., enero de 2016



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización Hidrogeoquímica y Diversidad Microbiana en Ambientes Extremos, casos: Villa Juárez, San Luis Potosí y Rincón de Parangueo, Guanajuato**” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Geociencias Aplicadas fue elaborada por **María Elizabeth Hernández Zavala** y aprobada el **29 de enero de 2016** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Geociencias Aplicadas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. José Alfredo Ramos Leal
(Codirector de la tesis)

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
(Codirector de la tesis)

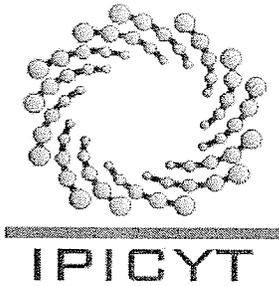
Dr. Pablo Dávila Harris
(Sinodal de la Tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Petrofísica de la División de Geociencias Aplicadas y el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. José Alfredo Ramos Leal y del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 130583 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

Fotografía

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 013 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Geociencias Aplicadas está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 29 días del mes de enero del año 2016, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. Pablo Dávila Harris	Secretario	IPICYT
Dr. José Alfredo Ramos Leal	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN GEOCIENCIAS APLICADAS

sustentó la C.

María Elizabeth Hernández Zavala

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización hidrogeoquímica y diversidad microbiana en ambientes extremos, casos: Villa Juárez, San Luis Potosí y Rincón de Parangueo, Guanajuato

que se desarrolló bajo la dirección de

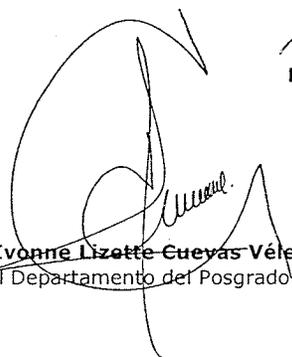
Dr. José Alfredo Ramos Leal
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 29 días del mes de enero de 2016.


Mtra. Ivonne Lizotte Cuevas Vález
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A Dios por acompañarme en cada paso que doy, agradecida por este proyecto que me dio muchas enseñanzas.

A mis papás les agradezco por el gran esfuerzo como el apoyo incondicional que me han dado durante todo el trayecto de mi vida y así realizar cada uno de mis proyectos.

A mi hermano Michael por apoyarme en momentos importantes de mi vida.

A mis sobrinas Fernanda, Daniela y Karla por ser la alegría de mí vida.

A la “Fundación JARAMOS” le estoy agradecida por depositar la confianza, tiempo, paciencia para la realización de este proyecto.

Agradecimientos

Dr. José Alfredo Ramos Leal por estar siempre allí para apoyarme y por su inagotable paciencia para enseñarme hidrogeología.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por quien adquirí el interés en la biología molecular, sus ideas, su energía y comentarios que me han contribuido en todo momento. Además de permitirme trabajar en su excelente equipo de trabajo.

Dra. Liliana Montoya Lorenzana por enseñarme y aprender de su disciplina, entrega, dedicación, tiempo y aplicar la filogenia en este proyecto.

Dra. Olga Araceli Patrón Soberano por apoyarme y compartirme nuevas ideas en el mundo de la microscopía.

Dr. Gerardo Argüello Astorga por enriquecer los momentos difíciles con gratos relatos.

Dr. Guillermo Pastor Palacios por dedicarme de tu tiempo y compartir de tus ideas en momentos clave de la investigación.

Mtro. Ulises Rodríguez Robles por vivir de cerca lo bueno y malo, gracias por haberme mantenido de pie. Por tu inagotable humildad en todo momento y por compartir tus conocimientos.

Mtra. Rosa María Fuentes Rivas por los consejos, por escuchar, por la ayuda.

Mtra. Mayra Janeth Esparza Araiza por la paciencia, tolerancia, por la ayuda en todo momento y por ser un ejemplo de trabajo.

Lic. A. María Isabel Isordia Jasso y QFB. Rosalba Castillo Collazo por estar ahí desde hace muchos años, por el apoyo incondicional.

Mtro. César Arturo Berzoza Gaytán por el apoyo, por escucharme, por las discusiones, por los ánimos.

Lic. Jesús Aarón Avalos Callenos, Mtra. Angélica Romero Osorio y Sra. Rosita por todos los días de compañía, por los ánimos, por escuchar, por reír.

Chicas LANBAMA Lic. Verónica Zárate Chávez, IQ Ma. del Carmen Rocha Medina, Dra. Mireya Edith Martínez Pérez, QFB. Elvira Hernández Rico, LQ. María Guadalupe Ortega Salazar por el apoyo, por las críticas y por las risas.

Janete Morán, por haber abierto la puerta del IPICYT. Gaby Pérez por el apoyo en trámites académicos, por los dulces.

Villa Juárez, S.L.P. y Cráter-Lago Rincón de Parangueo, Gto, por la perfección de su naturaleza por sus misterios que inspira conocerlos.

Índice general

Título	Pág.
Portada	i
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xii
Anexos	xv
Abreviaturas	xvi
Glosario	xvii
Resumen	xix
<i>Abstract</i>	xx
1.0 Generalidades	1
1.1 Introducción	1
1.2 Antecedentes	1
1.2.1 Historia de la geología y microbiología con orientación al estudio en sistemas hídricos	1
1.2.2 Introducción a los ambientes de interés	3
1.2.3 Introducción de la filogenética genómica	7
1.3 Área de estudio	8
1.3.1 Características de Villa Juárez, San Luis Potosí	8
1.3.2 Características del Cráter-Lago Rincón de Parangueo, Guanajuato	10
1.4 Objetivo general	12
1.4.1 Objetivos específicos	12
1.5 Justificación	13

1.6 Hipótesis	13
2.0 Marco Hidrogeológico	14
2.1.1 Geología de Villa Juárez, San Luis Potosí	14
2.1.2 Hidrogeología de Villa Juárez, San Luis Potosí	14
2.2.1 Geología del Valle de Santiago, Guanajuato	15
2.2.2 Hidrogeología del Valle de Santiago, Guanajuato	16
3.0 Metodología	17
3.1. Técnicas Analíticas	17
3.1.1 Espectroscopia de fluorescencia	19
3.1.2 Análisis experimental	21
3.2 Diagramas hidrogeoquímicos	23
3.3 Biología Molecular	24
3.3.1 Cepas de Referencia y condiciones de cultivo	27
3.3.2 Muestras analizadas	28
3.3.3 Métodos microbiológicos	31
3.4 Biología Molecular	34
3.4.1 Métodos de extracción de ADN	34
3.4.1.1 Método de extracción adaptado de Gabor por Gómez Rodríguez (2007)	35
3.4.1.2 Método de extracción adaptado de Hernández Rico (2004)	36
3.4.1.3 Método de extracción de ITS para hongos adaptado por Hernández Rico (2004)	37
3.4.1.4 Método de extracción de ITS de microalgas y cianobacterias adaptado en este trabajo	37
3.4.2 Protocolo de amplificación por PCR	38
3.4.2.1 Protocolo de amplificación por PCR	38
3.4.2.2 Protocolo de amplificación de PCR anidada con oligonucleótidos universales internos	39
3.4.2.3 Protocolo de amplificación de PCR de ITS para hongos	40
3.4.3 Protocolo para microalgas modificado en este trabajo	41
3.4.4 Protocolo de ligación con el vector de clonación <i>pGEM-T/p GEM-T</i> <i>Easy</i>	42
3.4.5 Preparación de células competentes	42
3.4.6 Protocolo para transformación de células competentes	42
3.4.7 Protocolo de extracción de ADN plásmidico (Miniprep) basado en el método de Birnboim, 1979	43

3.4.8 Protocolo para digerir ADN plásmidico	43
3.4.9 Protocolo de purificación por precipitación sin columna	43
3.4.10 Aislamiento de ADN plásmidico, digestión y purificación de las clonas seleccionadas	44
3.4.11 Análisis de secuencias y construcción de árboles filogenéticos	44
4.0 Resultados y Discusión	46
4.1.1 Hidrogeoquímica	46
4.1.2 Clasificación del agua	56
4.1.3 Procesos evolutivos	62
4.1.4 Diagrama de dispersión	65
4.1.5 Análisis experimental	71
4.1.6 Espectrofotometría de Fluorescencia 3D	73
4.2.1 Microbiología	76
4.2.2 Biología Molecular	79
4.2.2.1 Resultados de Métodos de Extracción	79
4.2.2.2 Obtención de copias de ADN por PCR con el método adaptado por Gómez Rodríguez	83
4.2.2.3 Obtención de copias de ADN por PCR adaptado por Hernández Rico (2004)	85
4.2.2.4 Obtención de copias de ADN por PCR adaptado por Pastor - Palacios en este trabajo	86
4.2.2.5 Protocolo para ITS para hongos adaptado por Hernández Rico (2004)	88
4.2.2.6 Protocolo para microalgas modificada en este trabajo	88
4.2.2.7 Síntesis de sitios con moos encontrados utilizando análisis molecular	89
4.2.2.8 Árbol filogenético de Bacterias	94
4.2.2.9 Árbol filogenético de Arqueas	102
5.0 Conclusiones y perspectivas	104
5.1 Conclusiones	104
5.2 Perspectivas	107
6.0 Bibliografía	111
7.0 Anexos	122

Lista de tablas

Título	Pág.
1.1. Los extremofilos sobre la Tierra y posiblemente sobre los cuerpos extraterrestres (Gunde-Cimerman <i>et al.</i> , 2005).	5
1.2. Resultados de metales en el río Tinto (López-Archilla, 2005).	6
3.1. Procariotes en diversos sitios (Whitman <i>et al.</i> , 1998).	22
3.2. Cepas de control utilizadas.	25
3.3. Vector utilizado en la digestión de la muestras de ADN.	25
3.4. Reactivos utilizados.	25
3.5. Equipos utilizados.	27
3.6. Nomenclatura de las muestras utilizadas.	30
3.7. Protocolos probados para la extracción de <i>ADN</i> .	35
3.8. Oligos empleados en los métodos de extracción.	41
4.1. Resultados de muestras de agua, sedimentos y 2 muestras diferentes con el método de espectrofotometría de fluorescencia 3D.	74
4.2. Métodos de extracción de ADN que funcionaron para las diversas muestras listadas y géneros detectados por métodos moleculares.	80
4.3. Ambiente extremo arroyo Carrizal con muestra, clona <i>16S rRNA</i> y microorganismo.	90
4.4. Ambiente extremo Buenavista con muestra, clona <i>16S rRNA</i> y microorganismo.	91
4.5. Ambiente extremo Rincón de Parangueo con muestra, clona <i>16S rRNA</i> y microorganismo.	92

Lista de figuras

Título	Pág.
1.1. Localización de los sitios con condiciones hidrológicas extremas extremos en el Estado de Guanajuato y San Luis Potosí.	3
1.2. Gráfica de iones con tendencia atalosalina y talasosalina (Grant, 2004)	6
1.3. Árbol filogenético universal de vida con sus dominios.	8
1.4. a) Arroyo Carrizal, Villa Juárez, San Luis Potosí. a la izquierda; b) Mina de Azufre abandonada, Villa Juárez, San Luis Potosí. a la derecha.	9
1.5. Manantial azufroso en el poblado de Buenavista, municipio de Villa Juárez, San Luis Potosí.	9
1.6. Cráter- Lago Rincón de Parangueo, Valle de Santiago, Guanajuato.	11
1.7. Volcanes localizados en el Valle de Santiago, Guanajuato. (Ordoñez, 1906 tomada de Aranda-Gómez <i>et al.</i> , 2013).	11
3.1. Diagrama Chen y Westerhoff para clasificación de materia orgánica por fluorescencia 3D.	20
3.2. Foto a) La campana de flujo laminar proporciona condiciones de esterilidad a las muestras en medio sólido; b) Cuarto con temperatura de 28 °C, se observan muestras en condiciones aerobias y anaerobias; c) Medios de cultivo líquidos Chu en una cámara ambiental.	32
4.1. Altitud vs. pH en ambientes extremos Villa Juárez y Rincón de Parangueo.	48
4.2. Ambientes extremos Villa Juárez y Rincón de Parangueo vs. Temperatura (°C).	49
4.3. Ambientes extremos vs. ORP (mV) en Villa Juárez y Rincón de Parangueo.	51
4.4. Ambientes extremos y sólidos totales disueltos (mg/L) en Villa Juárez y Rincón de Parangueo.	52
4.5. Conductividad Eléctrica $\mu\text{S}/\text{cm}$ vs. Temperatura (°C) en sitios extremos.	54
4.6. Diagrama de Piper en el sitio Villa Juárez.	56

4.7. Diagrama de Piper en el sitio Valle de Santiago.	57
4.8. Diagrama de Schoeller-Berkaloff en el sitio Villa Juárez.	59
4.9. Diagrama de Schoeller-Berkaloff en el sitio Valle de Santiago.	60
4.10. Diagrama de Mifflin en el sitio de Villa Juárez.	61
4.11. Diagrama de Mifflin en Rincón de Parangueo.	62
4.12. a) Diagrama de Gibbs de $\text{Na}^+ / (\text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+})$ vs. STD y b) Diagrama de Gibbs de $\text{Cl}^- / (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^{2-})$ vs. STD en el sitio de Villa Juárez.	63
4.13. a) Diagrama de Gibbs de $\text{Na}^+ / (\text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+})$ vs. STD y b) Diagrama de Gibbs de $\text{Cl}^- / (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^{2-})$ vs. STD en el sitio Rincón de Parangueo.	64
4.14. Gráficas de dispersión del sitio Villa Juárez.	67
4.15. Gráficas de dispersión del Rincón de Parangueo.	70
4.16. Correlación de carbono: nitrógeno en sitios Villa Juárez y Rincón de Parangueo.	72
4.17. Muestra RiPaAL-05 muestra de agua verde, en época de lluvia.	76
4.18. Microorganismos detectados en medios sintéticos. a) bacteria proveniente de organismo pegado a una roca, b) hongo proveniente de agua de la pared, c) muestra de agua blanca, la cual es la excepción en esta serie de fotos, pues si se logró detectar por métodos de biología molecular.	77
4.19. Bacteria proveniente de sedimento verde.	77
4.20. a) Muestra de sedimento; b) muestra de agua de la pared.	78
4.21. Gráfica de muestras en época de lluvia y estiaje vs. método de Gabor adaptado Gómez-Rodríguez (2007).	82
4.22. Gráfica de muestras en época de lluvia y estiaje vs. método adaptado por Hernández-Rico (2004).	83
4.23. Productos de una reamplificación de PCR de muestras de los sitios de ambientes extremos Villa Juárez y Rincón de Parangueo con oligos universales 533 F y 1391 R.	84

4.24. Digestión con enzima <i>EcoRI</i> de muestras de sitios extremos Villa Juárez y Rincón de Parangueo de clonas seleccionadas para comprobar la presencia del fragmento esperado.	84
4.25. Productos de una amplificación de PCR de muestras de los sitios de ambientes extremos Villa Juárez y Rincón de Parangueo con oligos universales 533 F y 1391 R.	85
4.26. Digestión con enzima <i>EcoRI</i> de la muestra RiPaSE-23 con sus clonas seleccionadas para comprobar la presencia del fragmento esperado.	86
4.27. Productos de una amplificación de PCR de muestras de los sitios de ambientes extremos Villa Juárez y Rincón de Parangueo con oligos universales 533 F y 1391 R.	87
4.28. Digestión con enzima <i>EcoRI</i> con sus clonas seleccionadas para comprobar la presencia del fragmento esperado.	87
4.29. Productos de una amplificación de PCR de ITS de hongos en muestras de los sitios de ambientes extremos Villa Juárez y Rincón de Parangueo con oligos ITS1 y ITS4.	88
4.30. Productos de una amplificación de PCR de ITS de microalgas en muestra (RiPaSL-07) de ambiente extremo Rincón de Parangueo con oligos ITS_f y ITS_r.	89
4.31. Árbol filogenético correspondiente al gen <i>16S rRNA</i> constituido por secuencias de clonas (filotipos) del dominio <i>Bacteria</i> en muestras de agua, sedimentos, alga blanca provenientes de ambientes extremos Villa Juárez, San Luis Potosí y Rincón de Parangueo, Guanajuato.	96
4.32. Árbol filogenético del gen <i>16S rRNA</i> del dominio <i>Archaea</i> que incluye las secuencias de clonas (filotipos) en muestras del ambiente extremo Rincón de Parangueo, Guanajuato.	103

Anexos

Título	Pág.
7.1. Tabla de Nomenclatura de las clonas secuenciadas utilizadas para árboles filogenéticos.	124
7.2. Tabla de Preparación de medios de cultivo.	125
7.3. Tabla de Preparación de soluciones.	128
7.4. Figura del Árbol filogenético correspondiente al gen 16S rRNA constituido por secuencias de clonas (filotipos) del dominio Bacteria en muestras de agua, sedimentos, alga blanca provenientes de ambientes extremos Villa Juárez, San Luis Potosí y Rincón de Parangueo, Guanajuato. en un tamaño que se pueda apreciar el contenido de su información.	130

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
°C	grados centígrados
DQO	demanda química de oxígeno
g	gramos
h	horas
HDLP	Polietileno de alta densidad
km	kilómetro
MPM	marcador de peso molecular
m	metros
µL	microlitros
mg	miligramos
min	minutos
moos	microorganismos
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	milimoles
mV	milivolts
M	moles
OD	Oxígeno disuelto
ORP	potencial óxido reducción
pb	pares de bases
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
STD	Sólidos totales disueltos
%	porcentaje

Glosario

ADN. El ácido desoxirribonucleico. Es una molécula que guarda la información y se transmite de generación en generación.

Agua subterránea. El agua que se encuentra bajo la superficie sólida de la Tierra. Además si se le agrega el significado geológico de la siguiente manera: forma parte del ciclo hidrológico; coloca y disuelve sustancias que se introducen a subsuelo (Longwell *et al.*, 1994).

Anticlinal. Pliegue hacia arriba en forma de arco (Longwell *et al.*, 1994).

Árbol filogenético. A través de las relaciones evolutivas entre especies distintas, se han separado a partir de un origen en común y son representadas por un gráfico. En nuestro caso se encuentran las diferencias entre las secuencias de nucleótidos de ADN.

Bioinformática. Es el uso de métodos computacionales orientados a la biología molecular (Claverie *et al.*, 2007).

Cráter volcánico. Es un sitio con una profundidad que adopta la forma de embudo por el que salen de manera explosiva material (Longwell *et al.*, 1994). Los volcanes que se consideran maar, son cráteres de explosión como producto de explosiones freatomagmáticas por la combinación de agua y magma (Cano-Cruz *et al.*, 2008).

Evolución. Es el desarrollo de organismos que tienen cambios a través del tiempo logrando nuevas variables. Puede pasar en cualquier ecosistema, donde las variaciones se deben a las mutaciones y su selección. Por lo tanto, evolucionan las especies.

Extremófilos. Aquellos organismos que crecen más allá de los parámetros ambientales "normales".

Halófilo. Organismo que requiere o tolera ambientes salinos.

Karst. Son las formas originales que tiene un relieve compuestas por rocas calizas, yeso, dolomías o sal.

Manantial. Es el escurrimiento de agua subterránea que emerge a la superficie de modo natural (Longwell *et al.*, 1994).

Sinclinal. Pliegue hacia abajo en forma de artesa (Longwell *et al.*, 1994).

Sintrofo. Es una especie que vive a expensas de los productos de otras especies.

Sitios con condiciones hidrogeológicas extremas. Son parámetros que pueden presentar temperaturas muy elevadas (55-121°C) o bajas (-2-20°C), alta salinidad (NaCl 2-5M) y alta alcalinidad (pH arriba de 8) o alta acidez (pH menor de 4). Las grandes profundidades a partir de 400 m hasta los 6000 m se considera otra condición extrema hidrogeológica, además los altos niveles de radiación. Estos parámetros pueden favorecer el desarrollo de microorganismos siendo localizados y distribuidos en diversas áreas en el planeta Tierra bajo ciertas condiciones de acuerdo a la hidrogeología que los rodee.

Resumen

Caracterización hidrogeoquímica y diversidad microbiana en ambientes extremos, casos: Villa Juárez, San Luis Potosí y Rincón de Parangueo, Guanajuato.

Palabras clave. Extremófilos, bacterias, hongos, arqueas, agua subterránea, ADN.

Desde que el hombre inició estudios en ambientes extremos, prestó atención en los factores que marcan los límites de la vida sobre todo en consorcios microbianos. Los microorganismos encontrados en estos ambientes, se les relaciona con los primeros seres que existieron bajo condiciones anóxicas en nuestro planeta Tierra y a lo largo del tiempo se han modificado. A través de la multidisciplinaria se estudian las condiciones fisicoquímicas, hidrogeológicas, fisiológicas, metabólicas y moleculares en la que los microorganismos se han adaptado en diversos lugares extremos como el Lago Tirez (España), el Rio Tinto (España), el Gran Lago salado (E.U.A.), Cuatro Ciénegas (México), el desierto de Atacama (Chile), entre otros.

Se analizaron dos zonas ubicadas en el Estado de San Luis Potosí (Arroyo Carrizal y Buenavista, en Villa Juárez) y en el Estado de Guanajuato (Cráter-Lago Rincón de Parangueo, Valle de Santiago). Nuestros resultados mostraron que Villa Juárez posee manantiales con aguas sulfatadas-magnésicas ($Mg-SO_4$), y procesos de interacción agua-roca. En arroyo Carrizal se identificó un flujo regional, caracterizado como un sitio poliextremo: ácido (pH menor de 2) y siderófilo (altas concentraciones de hierro). Por otro lado, Buenavista presenta un flujo intermedio, también poliextremo: neutrófilo y halófilo. En el Cráter-Lago Rincón de Parangueo destacan aguas cloruradas sódicas (Na-Cl), el cual presenta condiciones de alta evaporación e interacción agua-roca, domina el flujo regional, y se catalogó como una área alcalófila y halófila, debido a los gradientes tan altos de alcalinidad y solutos. Mediante herramientas de geociencias y métodos moleculares, fue posible descubrir a través de diversas muestras (agua, sedimentos, filamentos, estromatolito, sedimento verde), los microorganismos que se desarrollaron en época de lluvia y estiaje proceden de sitios extremos donde encontramos los phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Euryarchaeota*. En arroyo Carrizal sobresale *Hydrogenophaga*, con un pH ácido aunque su pH óptimo es entre 7 y 8. En Buenavista destaca *Brevundimonas* el cual mineraliza materia orgánica disuelta en los ambientes acuáticos. Por último, en Rincón de Parangueo se hallaron *Natronorubrum* (haloalcalifílica), *Thiohalobacter* (neutrófilo, halófilo moderado), *Salinimonas* (halófila), *Nitriliruptor* (alcalifílico), *Alterococcus* (halófila, anaerobia), *Halocella* (halófila, celulolítica, reportada previamente en Crimea), *Halorhodospira* (halófila extrema, bacteria fotótrofa púrpura del azufre) hallada en lugares alcalinos como Egipto y *Natronobacterium* (haloalcalifílico), encontrada en Kenia y China. En general, se concluye que la diversidad microbiana es condicionada por la geología, características fisicoquímicas del agua, el clima y la relación C:N.

Abstract

Hydrogeochemical characterization and microbial diversity in extreme environments, the case studies of Villa Juarez, San Luis Potosi. and Rincon de Parangueo, Guanajuato.

Key words. Extremophiles, bacteria, fungi, archaea, groundwater, DNA.

Since early studies in extreme environments, we have paid attention to the factors that define the limits of life especially in microbial consortia. Microorganisms are related to the first beings that existed in our planet Earth under anoxic conditions and they have evolved and changed over time. Based on multidisciplinary studies that can include physicochemical water analysis, hydrogeology, physiological, metabolic, and molecular conditions, we can learn how micro-organisms have adapted to various extreme environments like Lake Tirez (Spain), Rio Tinto (Spain), the Great Salt Lake (USA), Cuatro Ciénegas (Mexico), the Atacama Desert (Chile), among others.

We have studied two localities in the State of San Luis Potosi (Arroyo Carrizal and Arroyo Buenavista, at Villa Juarez) and in the State of Guanajuato (a Crater-Lake named Rincon de Parangueo, at the Valle de Santiago region). Our results showed that Villa Juarez has springs with sulfated-magnesium water ($Mg-SO_4$) and water-rock interaction processes and water evaporation processes; this is probably related to the dissolution of gypsums. Arroyo Carrizal has a regional groundwater flow; it is characterized as a poliextreme site acidic (pH less than 2) and siderophile (high concentrations of iron). Arroyo Buenavista includes an intermediate flow. Poliextreme also: neutrophil and halophilic. In the Crater-Lake Rincon de Parangueo surface waters containing sodium chloride (Na-Cl), introduced under high evaporation and water-rock interaction, it is dominated by regional flow and was classified as an alkaliphilic and halophilic area due to the very high gradients of alkalinity and solutes. Geosciences and molecular biology tools were applied to discover through various samples (water, sediments, filaments, stromatolites and green sediment), microorganisms developed in the rainy and dry season from extreme areas, where we found the following phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Euryarchaeota*. Arroyo Carrizal *Hydrogenophaga* excels with an acid pH although the optimum pH is between 7 and 8. In Buenavista stands out *Brevundimonas*, which mineralizes dissolved organic matter in aquatic environments. Finally, at Rincon of Parangueo we have found *Natronorubrum* (haloalkaliphilic), *Thiohalobacter* (neutrophil, moderate halophile), *Salinimonas* (halophyte), *Nitriiliruptor* (alkaliphilic), *Alterococcus* (halophilic, anaerobic), *Halocella* (halophilic, cellulolytic were previously reported in Crimea), *Halorhodospira* (extreme halophilic, phototrophic purple sulfur bacteria found in places like Egypt alkaline), *Natronobacterium* (haloalkaliphilic found before in Kenya and China), amongst others. Overall, we conclude that microbial diversity is conditioned by the hydrogeological, physical and chemical characteristics of water, climate and the C: N ratio.

Prólogo

"Cada vez que perdemos una especie rompemos una cadena de la vida que ha evolucionado durante 3,500 millones de años". Jeffrey McNeely, científico de la International Union for Conservation of Nature.

A partir de que el hombre logró observar microorganismos con la ayuda de la fabricación de las primeras lentes por el holandés Anton van Leeuwenhoek, se conocieron diferentes tamaños de microorganismos, dando inicio a la microbiología. Ahora, con el nacimiento de la geomicrobiología se sabe que se requiere de la multidisciplina para relacionar características de la Tierra y la vida. La geomicrobiología, implica el estudio de los microorganismos (moos) y sus actividades en diferentes etapas durante la escala geológica. Los moos actúan en los procesos de interacción agua-roca y transporte químico durante su trayecto, la formación y transición de minerales y rocas, entre otros. Sin embargo, los procesos geológicos y geoquímicos pueden ser determinantes en la diversidad microbiana en ambientes extremos. Con el descubrimiento de vida en ambientes extremos, se sabe ahora que los extremófilos son muy importantes como agentes geológicos, por ejemplo, en el desarrollo de crecimiento mineral y su disolución o la meteorización y alteración de rocas y minerales.

Por ello, se requiere conocer los métodos analíticos, técnicas moleculares y microbiológicas para estudiar a los moos, que sin duda, forman parte de sitios extremos que pueden ser comparados con organismos que pudieran habitar otros planetas. Un aspecto importante de los extremófilos es que por algunas de sus características especiales como: resistencia a las altas presiones, pH, temperaturas (altas y bajas), han sido utilizados en la biotecnología, agricultura, entre otras áreas.

En este trabajo se abordan dos sitios como ambientes extremos: Villa Juárez, San Luis Potosí y Rincón de Parangueo, Guanajuato. Cabe agregar, se contribuirá con información hidrogeológica, caracterización microbiológica y molecular de los moos presentes en dichos sitios y sus relaciones con las condiciones extremas en que habitan.

1. Generalidades

1.1 Introducción

Desde que el hombre inició estudios en ambientes extremos, prestó atención en los factores que marcan los límites de la vida (Montoya *et al.*, 2013), sobre todo en consorcios microbianos. A los microorganismos se les relaciona con los primeros seres que existieron y a lo largo del tiempo se han modificado, bajo condiciones anóxicas en nuestro planeta Tierra (Paerl *et al.*, 2000). Por ello, existen ambientes extremos, con condiciones que un organismo mesófilo (con crecimiento óptimo en condiciones normales) no podría tolerar. Las condiciones pueden ser en algunos parámetros con rangos extremadamente altos o bajos como la temperatura, radiación, presión, alcalinidad, disponibilidad de agua, salinidad, concentración de solutos, dióxido de carbono, azufre, entre otros. El ser humano no podría sobrevivir en ambientes extremos, pero organismos como los microorganismos extremófilos sí, consiguen adaptarse con facilidad a estas condiciones y logran multiplicarse.

Hoy se conocen hábitats como fuentes termales, depósitos de petróleo caliente, fumarolas marinas, lagos salados, minas, etc., que se consideran ambientes extremos.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Historia de la geología y microbiología con orientación al estudio en sistemas hídricos.

En 1917, Sherburne Rogers, geólogo, analizó las propiedades químicas de las salmueras; así como, de los hidrocarburos provenientes de un yacimiento de

petróleo en California (E.U.A.), y propuso que las bacterias reductoras de sulfato están involucradas en los procesos de consumo de sulfato y materia orgánica (Rogers, 1917). Por su parte, el geólogo Bastin supuso que las bacterias sulfato reductoras se agrupan en agua con aceite, a causa del bajo contenido de sulfato en las aguas (Bastin, 1926; Chapelle, 2001).

En 1962, el científico ruso Gurevich demostró que la presencia de bacterias y no la química de agua subterránea cambian la composición de la materia orgánica (Gurevich, 1962; Chapelle, 2001).

En ese mismo sentido, en 1967 Garrels y MacKenzie sugieren que la química del agua subterránea no surge por casualidad sino que tiene patrones predecibles. El concepto de equilibrio fue fundamental para conocer los patrones de flujos subterráneos (Garrels y MacKenzie, 1967; Chapelle, 2001).

Considerando lo anterior, Garrels y MacKenzie atribuyen a los microorganismos la facultad de involucrarse en procesos geoquímicos efectuando cambios en los sistemas hidrológicos. Se inicia el uso de técnicas microbiológicas en acuíferos profundos. Los microbiólogos de ese tiempo, aprueban la fusión de la microbiología con la geoquímica (Chapelle, 2001).

En este trabajo se pretende caracterizar las condiciones fisicoquímicas de los flujos subterráneos y, estudiar los sedimentos por métodos analíticos, de los sitios Villa Juárez (Arroyo Carrizal y Buenavista en San Luis Potosí) y Valle de Santiago (Cráter-Lago Rincón de Parangueo en Guanajuato) (Fig. 1.1). Además, se proyecta estudiar la diversidad microbiana, que se desarrolla en condiciones ambientales extremas, como lo son el pH ácido, alcalino, y la salinidad y explicar su presencia en el sitio de estudio.

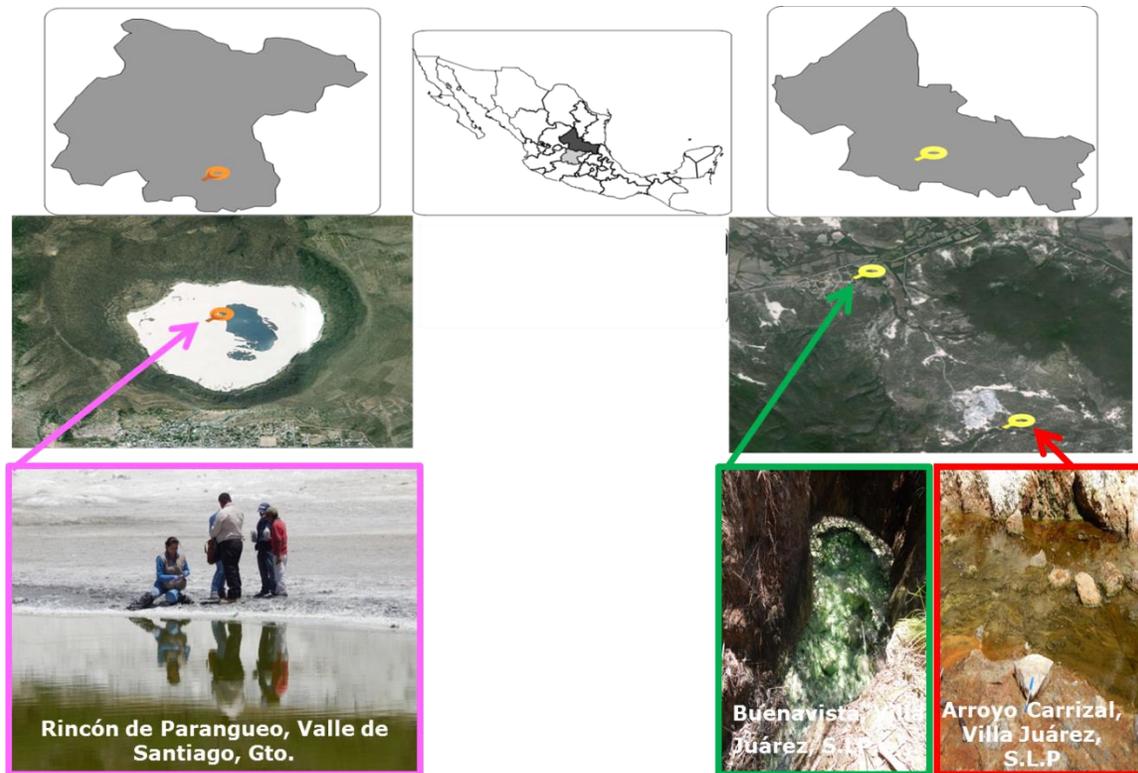


Figura 1.1. Localización de los sitios con condiciones hidrogeológicas extremas en el Estado de Guanajuato y San Luis Potosí.

1.2.2 Introducción a los ambientes de interés

Un aspecto importante acerca de los ambientes extremos es que han existido desde el Precámbrico y que están distribuidos alrededor del mundo. Algunos ejemplos de lugares con altas concentraciones de solutos (hipersalinos) son el Gran Lago Salado (E.U.A.), el Mar Muerto (Israel-Jordania), el lago de Magadi (Kenya) y Guerrero Negro (México). Tanto los lugares hipersalinos como los sitios ácidos, por ejemplo, el Rio Tinto (España), son lugares donde albergan moos extremófilos. De acuerdo al parámetro del entorno o lugar toman diferentes nombres los moos, como se observa en la Tabla 1.1. Para ese tipo de sitios es muy importante el parámetro pH para el desarrollo de ciertos microorganismos. Para el caso de los acidófilos quimiolitotrófos, son moos capaces de adquirir energía por medio de minerales para sobrevivir, lo que los hace atractivos para considerarlos aspirantes primarios sobre los inicios de la vida en el planeta Tierra

(Amils *et al.*, 2004). De acuerdo a la alta concentración de metales (Tabla 1.2), se les clasifica según su origen, el primero se le relaciona con el azufre elemental y el segundo con actividades de tipo minero.

Por otro lado, cada área es extremadamente diversa pero limitada para el crecimiento de algunos organismos, como es el caso de los sitios donde se encuentran los moos halófilos clasificados de acuerdo al tipo de agua hipersalina (agua que contiene altas cantidades de sales comparada con el agua de mar, Fig. 1.2) en la que subsisten: talasohalinas procedentes de aguas de mar que contienen iones similares a los del agua de mar pero que son precipitados por la alta evaporación de tal forma que al final tiene concentraciones diferentes, un ejemplo son los solares salinos como Guerrero Negro (México); atalashalinos, aguas sometidas a una alta evaporación, pero rodeadas de sitios con altas concentraciones de iones característicos del lugar, un ejemplo es el mar Muerto (Grant, 2004).

Además, debido a los avances de la tecnología se sabe que los microorganismos tienen una gran relevancia con su presencia y actividad en los sedimentos. Recientemente se le ha tratado de vincular el agua, los sedimentos y los moos para precipitar organosedimentos (Guerrero y Berlanga, 2006).

Tabla 1.1. Clasificación de moos extremófilos sobre la Tierra y posiblemente sobre cuerpos extraterrestres (Gunde-Cimerman y Oren., 2005).

Parámetro del entorno	Tipo	Localización y condiciones	Ejemplos
Salinidad	Hálofilos	En lagos salinos (pH neutros y alcalinos). En soluciones salinas hasta la saturación. Síntesis de glicerol para equilibrar la presión osmótica externa.	Cianobacterias, diatomeas, flagelados, <i>Dunaliella</i> , <i>Halobacteriaceae</i>
pH	Ácidofilos	pH 0-4 algunas aguas termales	<i>Picrophilus oshimae</i> , <i>Cyanidium caldarium</i> , <i>Dunaliella acidophila</i> .
	Alcalófilos	pH>9 en lagos salinos en África	<i>Natronobacterium</i> , <i>Spirulina sp</i> , hongos.
Temperatura	Psicrófilos	-20 °C - < 15 °C	<i>Psychrobacter</i> , <i>Polaromonas</i> , cianobacterias, diatomeas, algas verdes congeladas, algunos insectos.
	Termófilos	50 °C – 80 °C	<i>Cyanidium</i> , procariotes como <i>Mastigocladus</i>
	Hipertermófilos	80 °C - > 100 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i> (113 °C)
Presión hidrostática	Barófilos Piezófilos	Amantes del peso Amantes de la presión	Cepa procariote MT41 tolerante > 100 MPa
Radiación, Radiación ultravioleta y ionizada		Altos niveles de radiación	Cianobacterias, plantas desérticas <i>Deinococcus radiodurans</i>
Prospera en disolventes orgánicos y bajo ciertas	CO ₂ gas	Prospera solo en gas	<i>Cyanidiaceae</i> (crece bajo CO ₂ puro)

atmósferas			
Gravedad	Hipergravedad Hipogravedad	>1 g <1 g	Tales microorganismos son conocidos sobre la Tierra (este factor puede ser relativo en ambientes extraterrestres)
Desecación	Xerófilos	Condición anhidrobiótica Actividad baja de agua	Procariotes, halófilos extremos o endófilos, hongos, líquenes (sistema simbiótico), nemátodos.

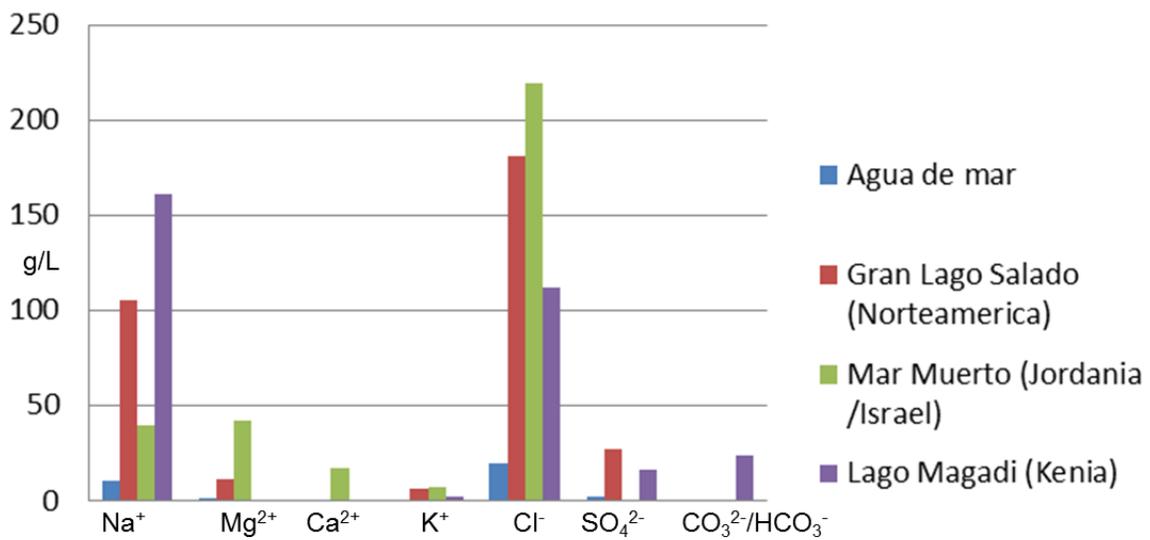


Figura. 1.2. Gráfica de iones con tendencia atalasalina y talasalina (Grant, 2004).

Tabla 1.2. Resultados de metales en el río Tinto (López-Archilla, 2005).

Muestra	pH	Fe	Cu	Zn	Ar	Mn	Mg	SO ₄ ²⁻
M3	1.16	47600	1700	1170	ND	ND	ND	30500

Las concentraciones están en mg/L. Nd, se refiere a los datos no determinados.

1.2.3 Introducción de la filogenética genómica

La taxonomía bacteriana se usó muy ampliamente en el siglo XX. Durante este siglo los avances científicos dieron lugar a la nomenclatura y clasificación de las bacterias que se usa actualmente. Los rasgos metabólicos y fisiológicos se combinan con la morfología para establecer las primeras clasificaciones localizadas en el Manual de Bergey de determinación de la bacteriología, publicado en 1957. Con el tiempo, se han desarrollado diversos avances que han transformado la taxonomía bacteriana, por ejemplo, el microscopio electrónico fomentó el conocimiento de la célula microbiana, las computadoras ayudaron a analizar las secuencias del ADN. A mitad del siglo XX, con el descubrimiento de microorganismos fósiles (Barghoorn y Tyler, 1965) por primera vez los microbiólogos pudieron estudiar microorganismos en un contexto evolutivo. Trabajos posteriores realizados por geoquímicos hasta la fecha estudian las actividades microbianas y la vida que se desarrolló en años anteriores, incluso siglos atrás. Otro avance muy importante fueron los análisis filogenéticos para conocer la evolución por medio de secuencias proteínas y ADN introducido por Zuckerkandl y Pauling (1965). Con el análisis de secuencias moleculares se desarrolló el enfoque filogenético, por ejemplo, el uso de la subunidad pequeña ARN ribosomal (*rRNA* 16S y 18S *rRNA*) revolucionó la clasificación de todos los organismos agrupándolos en un solo árbol filogenético (Woese *et al.*, 1990) (Fig. 1.3). Con el apoyo del registro fósil, el árbol de la vida muestra evidencias adicionales e independientes de que la vida microbiana se originó primero en la Tierra (Staley, 2006).

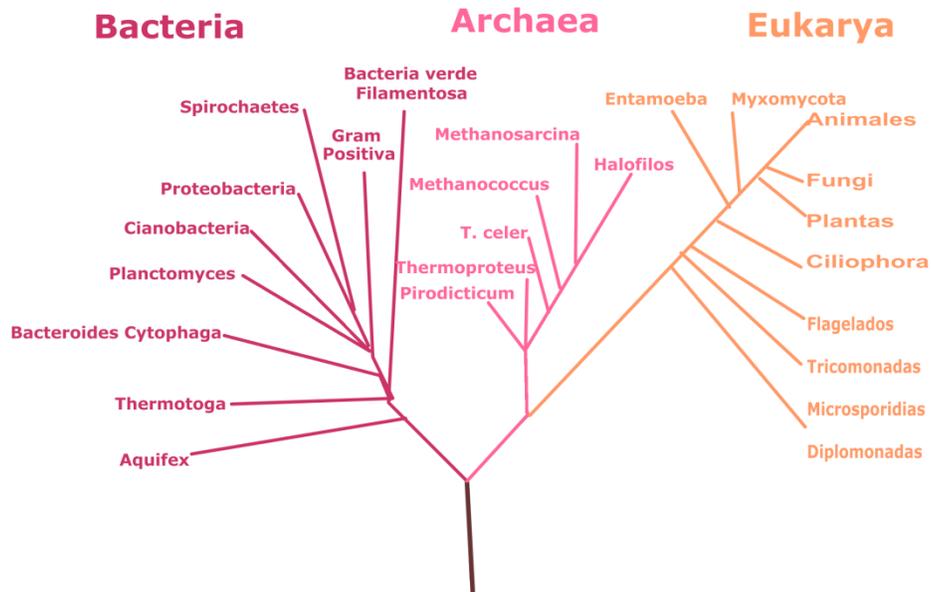


Figura 1.3. Árbol filogenético universal de vida con sus dominios (Woese *et al.*, 1990).

1.3 Área de estudio

1.3.1 Características de Villa Juárez, San Luis Potosí

En el municipio de Villa Juárez (San Luis Potosí) se encuentra la localidad de Guaxcamá, también llamada Guaxcamán o Huaxcamá y es una de las 18 comunidades pertenecientes al municipio de Villa Juárez. Guaxcamá se localiza a 22° 19' 26" de latitud norte, 100° 15' 58" de longitud oeste y 1100 m sobre el nivel medio del mar, por lo que forma parte de la zona media del estado.

La localidad cuenta con yacimientos de azufre, famosa desde tiempos prehispánicos, por sus minas y aguas a las que se les atribuía propiedades curativas. En 1808, una compañía alemana fundó una mina para extraer azufre. Años después, Mariano Niño obtuvo los derechos para trabajar la mina a favor de la empresa Sulphur Mining and Railway, ahora con el nombre actual de Negociación Minera de Azufre, S.A. de C.V. Posteriormente, el 18 de noviembre de 1972 ocurrió una explosión en uno de los tiros de la mina lo que provocó el desalojo de la comunidad a causa del fuego. Actualmente, la mina, las casas y la capilla están en ruinas (Figs. 1.4 a y 1.4 b).

En relación a las aguas subterráneas, cercanas a la mina, existen numerosos manantiales (Monroy-Castillo *et al.*, 1997), por ejemplo: Buenavista con agua azufrosa (Fig. 1.5).

En el área no existen corrientes superficiales de carácter perenne para fines de riego, solamente se detectan diversos arroyos como el Carrizal de condición intermitente en todo el territorio.



Figura 1.4. a) Arroyo Carrizal, Villa Juárez San Luis Potosí. a la izquierda; b) Mina de Azufre abandonada, Villa Juárez a la derecha.



Figura 1.5. Manantial azufroso en el poblado de Buenavista, Villa Juárez, San Luis Potosí.

Clima

La temperatura media anual se establece entre los 18 y 22 °C. La precipitación anual es de 300 a 600 mm siendo más húmedo en Cerritos y Río Verde, mientras que más seco al Norte de la región. El régimen de lluvias es en verano, aunque en los últimos años se ha modificado. Los principales tipos de vegetación en el arroyo Carrizal son: el matorral inerme, matorral espinoso, matorral subtropical. Siguiendo un gradiente altitudinal, en el manantial sulfuroso se presenta una vegetación riverense y selva mediana (subcaducifolia).

Hidrografía

El área de estudio pertenece al acuífero Río Verde, ubicado dentro de la Región Hidrológica 26, Pánuco, y emplazado en la Cuenca del Río Verde.

El Río Verde nace 35 kilómetros al oriente de la Ciudad de San Luis Potosí, con una elevación promedio de 2,600 metros sobre el nivel del mar, se localiza en la cordillera que divide la cuenca del Pánuco de la Región Hidrológica 37, Salado.

Los principales tributarios del Río Verde son el Río Santa Catarina, Río Caracol, Arroyo Rayón, y otros afluentes menores de la región de El Refugio-Ciudad Fernández, son el Arroyo Morales, Arroyo Grande, Arroyo El Sauz y Arroyo San Rafael (Korenfeld-Federman, 2000).

1.3.2 Características del Cráter-Lago Rincón de Parangueo, Guanajuato

El Cráter-Lago Rincón de Parangueo, Valle de Santiago, Gto., (Fig. 1.6) posee una altitud aproximada de 2075 m, y dadas las condiciones, su acceso es por medio de un túnel que mide 400 m. El Cráter-Lago fue aprovechado por los primeros pobladores del territorio; sin embargo, el lago se ha ido reduciendo por la evaporación ambiental, por el acarreo y el relleno con los materiales volcánicos de la región y con el descenso en el nivel freático regional. Además, su agua guarda una concentración alta en sales (Aranda-Gómez *et al.*, 2013) que impide utilizarse

para el riego, aunque tiempo atrás, la gente refiere que existían norias que permitían practicar la agricultura de temporal.



Figura 1.6. Cráter- Lago Rincón de Parangueo, Valle de Santiago, Guanajuato.

Dentro del municipio de Valle de Santiago se localizan 12 cráteres volcánicos (Fig. 1.7), situados en una superficie de 14 km², que abarca la laguna de Yuriria al Cráter-Lago Rincón de Parangueo. Este Cráter-Lago Rincón de Parangueo está situado en los límites de la Mesa Central Mexicana y el Eje Neo-volcánico Transversal, que atraviesa la República Mexicana.

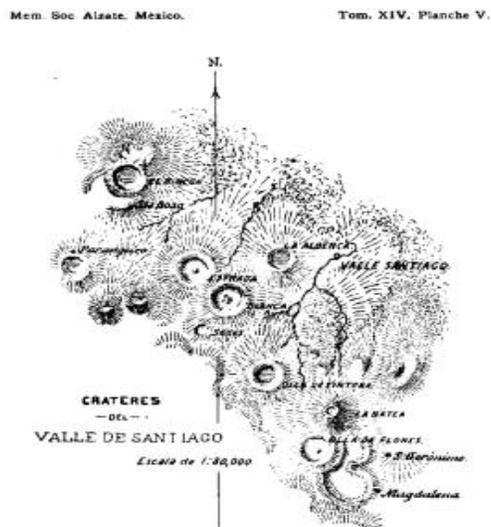


Figura 1.7. Volcanes localizados en el Valle de Santiago, Guanajuato. (Ordoñez, 1906 tomada de Aranda-Gómez *et al.*, 2013).

Clima

La temperatura media anual oscila entre los 18 y 20 °C. La precipitación media anual varía entre los 600 y 800 mm.

Vegetación

Los principales tipos de vegetación son: pastos, matorral espinoso, matorral inerme y espinoso.

Hidrografía

El lago pertenece a la Región Hidrológica Lerma-Santiago de la cuenca del Río Lerma-Salamanca. Hasta hace algunas décadas el acuífero regional alimentaba al lago, por otro lado, debido a la intensa extracción del agua subterránea en el valle, algunos lagos de la región se secaron y otros como el Cráter-Lago Rincón de Parangueo, disminuyó su volumen. Tiempo después se prohibió la extracción de agua subterránea.

1.4 Objetivo General

Establecer las características físicas, químicas y factores ambientales de sitios extremos tomando los casos de estudio en Villa Juárez, San Luis Potosí y Rincón de Parangueo, Guanajuato, en agua, sedimento, florecimientos, filamentos, organismo pegado a la roca, sedimento verde, estromatolito y alga blanca favoreciendo el desarrollo y la diversidad de microorganismos extremófilos.

1.4.1 Objetivos Específicos

- Identificar los procesos bioquímicos del agua subterránea.
- Determinar el cociente carbono:nitrógeno (C:N) en muestras sólidas, para relacionarlo con la presencia de microorganismos.
- Evaluar la materia orgánica disuelta en sistemas acuáticos naturales y sedimentos mediante espectroscopia de fluorescencia 3D para identificar los productos microbianos hidrosolubles.

- Tipificar microorganismos a partir de muestras de agua, sedimentos u otros con técnicas de biología molecular y microbiológicas, que estén ubicados en los dos sitios de estudio de acuerdo a su entorno y tiempo.

1.5 Justificación

En México existen sitios extremos pero aún poco estudiados, por lo que se desconoce su diversidad microbiana, factores físicos y químicos que la originan.

Es por ello, que en el presente proyecto se estudió la química del agua de ambientes extremos como el caso Villa Juárez (Arroyo Carrizal y Buenavista), San Luis Potosí, y Rincón de Parangueo, Guanajuato, para indagar su riqueza de microorganismos.

En este trabajo se usó la hidrogeoquímica para estudiar aspectos geoquímicos del agua, así como su relación con las rocas del entorno. Con la determinación de varios parámetros fisicoquímicos se estudió el agua subterránea, para conocer su calidad, distribución, fenómenos de salinización y probable tipo de roca por donde circula el agua. Se analizaron los sedimentos por diferentes métodos analíticos; así como, otro tipo de muestras como floramientos, filamentos, organismo pegado a la pared, sedimento verde, estromatolito y alga blanca que no son clasificadas como agua o sedimentos.

Con el apoyo de técnicas analíticas, moleculares y microbiológicas, se analizaron las muestras con el fin de determinar las características físicas de los sitios extremos y tipos de moos presentes y sus posibles relaciones bioquímicas.

1.5 Hipótesis

En sitios con condiciones extremas, la diversidad de microorganismos capaces de desarrollarse en condiciones óxicas y/o anóxicas está condicionada por la química

del agua, clima, geología del sitio y la relación C:N entre otros, que podrían ser similares a las condiciones primarias durante la evolución de la Tierra.

2.0 Marco Hidrogeológico

2.1.1 Geología de Villa Juárez, San Luis Potosí

La geología en el acuífero Río Verde, implica rocas que abarcan en la escala geológica del Cretácico al Reciente.

La zona hidrogeológica de Río Verde, forma parte de la Plataforma Valles-San Luis Potosí, creada a inicios del período Cretácico Inferior. Así mismo, la plataforma dio origen a una secuencia evaporítica, denominada Formación Guaxcamá, compuesta por una alternancia de capas de dolomía y yeso, de baja permeabilidad conformada por rocas de mayor antigüedad en la región. Además, sobre esta secuencia evaporítica se depositó la Formación El Abra, la cual está integrada por calizas de estratificación mediana a gruesa, con cavidades de disolución que dan comienzo a la karsticidad, con una alta permeabilidad por donde el agua subterránea fluye a grandes velocidades y llega a formar manantiales de caudales abundantes, como la Media Luna.

Estas rocas cretácicas fueron plegadas por la Orogenia Laramide, lo que dio inicio a la formación de anticlinales y sinclinales, siendo estos últimos rellenados por materiales sedimentarios de los períodos geológicos Terciario y Cuaternario.

Además de la formación de anticlinales regionales con orientación norte-sur y noroeste-sureste, se originó un gran diapiro de yesos en la Formación Guaxcamá (López-Doncel, 2003).

2.1.2 Hidrogeología de Villa Juárez, San Luis Potosí

El acuífero Río Verde, clave 2415, es un acuífero superior libre, establecido en los valles, emplazado en materiales granulares y porosos, conformado por

sedimentos aluviales, fluviales y lacustres, así como conglomerados, areniscas, riolitas y basaltos. El acuífero profundo está formado por calizas fracturadas que hospedan karsticidad.

De acuerdo con su inicio geológico y su permeabilidad, el acuífero Río Verde, está distribuido en dos unidades hidrogeológicas, la unidad compuesta por rellenos granulares, donde se concentran pozos que aportan agua de buena calidad y una unidad de rocas calcáreas, originadas en las infiltraciones que ocurren en las calizas kársticas en las montañas del sur, canalizadas por un sistema de flujo regional desplazada a través de conductos de disolución y que se manifiestan como descarga en manantiales, por ejemplo el de la Media Luna, donde la concentración de sólidos totales disueltos es superior a los 1,500 mg/L (Hernández-Martínez, 2008). Estas unidades se encuentran interconectadas y forman parte del mismo acuífero. El basamento hidrogeológico está conformado por yesos con ausencia de fracturadas y oquedades de disolución. En el caso específico del área de estudio de arroyo Carrizal y manantial Buenavista, el agua circula en los yesos de la Formación Guaxcamá, lo hace a través de fracturas y cavidades de disolución. Los flujos observados en ambos sitios, muestran componentes de flujo vertical ascendente, lo cual indica la presencia de un acuífero confinado en esta unidad.

2.2.1 Geología del Valle de Santiago, Guanajuato

El Valle de Santiago es una región importante del Altiplano Mexicano por la presencia del Cinturón Volcánico Trasmexicano, comenzando su actividad en el Mioceno hasta el presente. Se ubica en el campo volcánico de Michoacán-Guanajuato. Su composición es basáltica-andesítica. Las rocas volcánicas están ubicadas en una meseta ancha y plana, con una elevación aproximada de 1,720 m. Basados en fechamientos de K-Ar y estudios volcáno-estratigráficos Murphy (1982) propone una cronología preliminar para la actividad volcánica de la región, e identificó dos periodos de vulcanismo 1) periodo temprano del vulcanismo

basáltico y andesítico del Plioceno-Mioceno; 2) periodo de vulcanismo formador de maares del Cuaternario con edades de 1.175 millones de años (e.g., Hoya Rincón de Parangueo, La Alberca, Blanca, Cíntora, Álvarez). La región contiene siete conos volcánicos dispuestos en el terreno, que se asemejan al acomodo de las siete estrellas de la Osa Mayor; nombrado como la región de “las siete luminarias”. A continuación se mencionan de norte a sur: Hoya Rincón de Parangueo, Hoya de San Nicolás de Parangueo (San Nicolás Parangueo o San Nicolás), Hoya Estrada, Hoya La Alberca, Hoya Blanca, Hoya Cíntora (Zintora o La Cintura) y Hoya Álvarez. El fondo de cuatro de los cráteres es profundo, para alcanzar el manto freático de la región, que dieron origen a los Cráteres-Lagos (Maars) como Rincón de Parangueo, San Nicolás de Parangueo, La Alberca y Cíntora. Hoy en día, los lagos se encuentran desecados, en sus áreas superficiales y volúmenes reducidos (Cano-Cruz, 2008; Valerdi-Negreros *et al.*, 2013). El Cráter-Lago Rincón de Parangueo es considerado una área natural protegida del Estado de Guanajuato en la categoría de “Monumento Natural”, promulgado por el Instituto de Ecología en 1997, para resguardar volcanes inactivos, zonas arqueológicas y culturales; así mismo impulsar las actividades turísticas, recreativas, educativas y de investigación aptas para estos sitios, como la explotación sustentable de sus recursos naturales (Arriaga-Becerra, 1997).

2.2.2 Hidrogeología del Valle de Santiago, Guanajuato

En el área de estudio se han reconocido dos tipos de materiales que funcionan como acuíferos. Un medio granular, constituido por arenas, limos y arcillas de origen sedimentario; así como, material volcánico (tobas). El otro medio está compuesto por rocas volcánicas fracturadas (andesitas y basaltos). El acuífero granular es el más explotado, localizado en la parte superior de la región y debajo de estos se encuentran las rocas fracturadas. El Cráter-Lago Rincón de Parangueo es alimentado por el agua subterránea de la unidad granular (Rocha-Treviño, 2015).

Localmente, el agua del Cráter-Lago Rincón de Parangueo está almacenada sobre sedimentos lacustres.

A pesar de que en el arroyo Carrizal, el agua circula muy rápidamente a diferencia del Rincón de Parangueo en donde el agua superficial no tiene circulación, el Rincón de Parangueo es considerado como un sitio conservado, debido a que a través del tiempo geológico se acumulan altas concentraciones de sales (Dilek *et al.*, 2008), permitiendo que los moos estén en estado latente durante un tiempo, sobreviviendo en condiciones extremas debido a diversos parámetros. Su supervivencia se relaciona con las condiciones al inicio del origen de la vida de la Tierra.

3.0 Metodología

3.1 Técnicas Analíticas

El muestreo fisicoquímico de este estudio se realizó en el 2011. Durante este periodo se tomaron 13 muestras de manantiales del sistema Villa Juárez, S.L.P., para determinar cationes y aniones mayoritarios. En Valle de Santiago, Gto., se colectaron 12 muestras de agua subterránea.

Todas las muestras de agua fueron colectadas en botellas de polietileno de alta densidad (HDLP), lavadas y enjuagadas 7 veces con agua desionizada. Los recipientes para recolección de muestras de agua para la determinación de cationes y elementos traza fueron lavadas, con HCl al 10 %. Para cada muestra colectada, se hizo la determinación *in situ* de pH, conductividad eléctrica, temperatura, potencial rédox (ORP), oxígeno disuelto (OD), sólidos totales disueltos (STD) y alcalinidad.

Inmediatamente después de ser colectadas, las muestras se acidificaron con ácido nítrico puro hasta alcanzar un pH < 2, para cationes y elementos traza. Posteriormente, las muestras se almacenaron a una temperatura menor a 4°C. Los iones mayores y elementos traza se determinaron en el Laboratorio de Geoquímica Ambiental (Centro de Geociencias, UNAM). Las concentraciones de

cationes mayores (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) y elementos traza fueron determinadas con un espectrómetro de plasma de acoplamiento inductivo óptico (Termo ICAP 6500 Duo de última generación), utilizando estándares internacionales SLRS-4 y NIST 1640.

Los aniones mayores (SO_4^{2-} y Cl^-) se analizaron usando un colorímetro (Smart 2 Lamotte), que mide de forma fotoeléctrica la cantidad de luz absorbida por una muestra coloreada con respecto a una muestra incolora (blanco).

La alcalinidad y HCO_3^- se determinaron en el sitio por titulación. El error de equilibrio iónico (electro neutralidad) de las muestras, para el control de calidad de los datos fue menor a 5 %.

Hay que mencionar, que se efectuaron después otras colectas de muestras en otras fechas para especificar las propiedades fisicoquímicas de los flujos subterráneos, complementados por métodos analíticos, microbiológicos, moleculares considerando la época (lluvia y estiaje): Villa Juárez el 26 de septiembre del 2013 y Rincón de Parangueo el 27 de septiembre del 2013 para época de lluvia; Villa Juárez el 21 de abril del 2014 y Rincón de Parangueo el 23 de abril del 2014 para época de estiaje. Las muestras fueron separadas de la siguiente manera: 13 muestras de agua (cinco en época de lluvia y ocho en época de estiaje); 6 muestras de sedimento (dos en época de lluvia y cuatro en época de estiaje) y 6 muestras con características diferentes al agua y sedimento. A las muestras se les aplicaron diversas metodologías analíticas, herramientas de biología molecular o microbiológicas de acuerdo a su cantidad y características físicas.

Diez muestras de agua subterránea y colectadas de los sitios Buenavista, Arroyo Carrizal Villa Juárez y Rincón de Parangueo, fueron analizadas con un multiparámetro para determinar pH, potencial oxido reducción (ORP), conductividad eléctrica, temperatura, solidos totales disueltos (STD) y oxígeno disuelto (OD). Tres muestras de agua fueron colectadas en septiembre del 2013 (época de lluvia) y el resto en abril del 2014 (época de estiaje).

3.1.1 Espectroscopía de fluorescencia

Para estudiar las características de la materia orgánica disuelta (MOD) se utilizó espectroscopía de fluorescencia de la matriz excitación-emisión en 3D, debido a que es una herramienta sensible, selectiva; asimismo, aporta información sobre la composición, concentración, distribución; así como, la dinámica de la MOD, utilizada para la detección de contaminación en aguas de ríos, estuarios, por ejemplo (Hudson *et al.*, 2007; Henderson *et al.*, 2009). Las aguas naturales, contienen materia orgánica disuelta que puede variar de acuerdo al sitio, además viajan por sistemas hidrológicos donde puede influir la geología, su origen. Su aportación depende de la ubicación y del medio ambiente. La actividad microbiana se produce *in situ*, originando materia orgánica de manera independiente o bien reusan la que se encuentra en el flujo de agua (Hudson *et al.*, 2007). La MOD originada por moos, inicia cuando los moos fotótrofos fijan el bióxido de carbono atmosférico, constituyen parte de tejidos vegetales y de algunos moos que se transforman en carbono orgánico. Los moos fotótrofos emplean los compuestos orgánicos y sus remanentes se mineralizan durante la descomposición de la materia orgánica, posteriormente desprenden bióxido de carbono a la atmósfera (Stevenson, 1982). También, influyen las labores del hombre, para que se genere materia orgánica como descargas sobre las aguas superficiales de origen doméstico, industrial, lixiviados o aéreo (Hudson *et al.*, 2007).

Uno de los componentes fluorescentes son las sustancias húmicas, que son generados por procesos biológicos, químicos y material vegetal, los aminoácidos, proteínas y péptidos. Las sustancias húmicas se dividen químicamente en: ácidos húmicos insolubles a un pH inferior de 2 en soluciones acuosas, pero a un pH mayor son solubles; ácidos fulvicos a cualquier rango de pH son solubles; huminas son insolubles a lo largo de la escala de pH (Aiken *et al.*, 1985).

La fluorescencia se debe a la emisión de moléculas excitadas por la absorción de radiación, para este fin se puede usar moléculas orgánicas e inorgánicas que liberan energía en forma de luz, siempre y cuando se emplee una energía mayor. La espectroscopía de fluorescencia de la matriz excitación-emisión en 3D, dispone

de un conjunto de espectros de emisión reunidos en diferentes longitudes de excitación. Se recogen 45 espectros de emisión a longitudes de onda (λ_{em}) entre 250 y 600 nm, para longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) cada 5 nm entre cada 200 y 420 nm. Para las perturbaciones Rayleigh y Raman del agua se impiden, utilizando un filtro a 290 nm y se aparta un blanco de agua desionizada, respectivamente. Para graficar los espectros de emisión en 3D, convirtiendo el eje x en la λ_{em} el eje y en la λ_{exc} y el plano z, que sobresale perpendicularmente al plano x-y, en la intensidad de fluorescencia (IF) se obtiene un mapa de contorno. El mapa de contorno en 3D revela la localización e intensidad de los fluoróforos que podrían estar presentes en la muestra. La localización de los picos dentro de la EEM-3D indica el tipo de fluoróforo presente (Ventura-Cruz *et al.*, 2014). En la Figura 3.1 se encuentra un diagrama en donde se puede ubicar la clasificación de la materia orgánica. Se utilizó un Fluorómetro Perkin Elmer modelo LS-55.

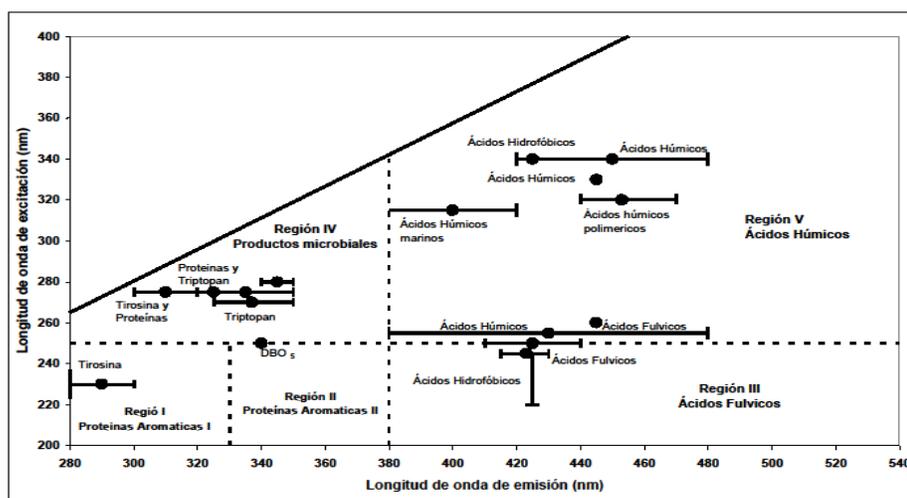


Figura 3.1. Diagrama Chen y Westerhoff para clasificación de materia orgánica por Fluorescencia 3D (Chen *et al.*, 2003).

Para la determinación de espectrometría de fluorescencia 3D se consideraron 11 muestras de agua (tres en época de lluvia y ocho de la época de estiaje), 6 sedimentos (dos en época de lluvia y cuatro en época de estiaje). Se pusieron a prueba dos muestras que no se les considera ni agua ni sedimento (dos muestras que se colectaron en época de estiaje).

3.1.2 Análisis experimental

El analizador experimental determina el análisis de carbono, hidrógeno, nitrógeno, azufre y oxígeno en muestras sólidas. En este caso, solo se determinó el coeficiente de carbono:nitrógeno. Respecto a la materia orgánica del suelo es una mezcla de organismos vivos, de residuos orgánicos muertos y de origen antropogénico. También se han identificado otras moléculas como lípidos, fenoles, entre otros (Schnitzer, 1991). La materia orgánica del suelo es considerada la reserva más importante de carbono edáfica, atmosférica y su circulación se le relaciona con el uso de suelo (Llorente-Sánchez, 2011).

Debido a la proximidad de agua-sedimento, se desarrollan condiciones anóxicas, que incluyen precipitación y disolución, relacionándose con la actividad biológica propia de cada sitio. Referente a componentes importantes en un sedimento están los microorganismos (fitoplanctónicos o no); carbonato cálcico; oxihidroxidos como Fe y Mn; aluminosilicatos (Rodríguez-Mellado *et al.*, 1999).

Concerniente a los moos, absorben elementos traza como parte de sus nutrientes esenciales. Posteriormente, perecen los moos con los elementos establecidos da como resultado la mineralización en la columna de agua. Los grupos funcionales que tienen los moos, pueden adsorber iones metálicos localizados en la superficie, favorecidos por el alto pH del agua.

El fitoplancton puede también absorber o asimilar a los metales considerados como nutrientes. Riedfield propuso una proporción de la relación C:N:P estequiométrica proveniente de seres vivos, relacionada con la remineralización consecutiva del fallecimiento del moo (Rodríguez-Mellado *et al.*, 1999).

Es por ello, que grupos de investigación han tratado de descubrir directamente la cantidad de carbono (nutriente esencial) que proviene de microorganismos, pero aún no se logra porque se requiere compilar más información de los diversos ecosistemas que existen alrededor del planeta Tierra (involucra a procariontes) para estimar esa cifra. Solo del 60 al 100% se aprecia el carbono proveniente de plantas que equivale a la cantidad total de carbono en los procariontes, además debe considerarse la cantidad que se alberga en organismos vivos (termitas, pájaros, humanos, etc.) de esa manera se duplicaría la cifra en la estimación de

las cifras totales. Con esto, se sabe que la mayor parte del carbono proviene de los procariontes. Por ello, Redfield hizo énfasis en los procesos biológicos en el mar con la siguiente relación C:N. la cual indica que una colonia de bacterias consume átomos de carbono y de nitrógeno. La relación de carbono: nitrógeno es de 1:0.25 (Whitman *et al.*, 1998). Además, que los microorganismos son los únicos que llevan a cabo reacciones que favorecen a los ciclos biogeoquímicos, provocando diversos productos hacia la atmosfera y así obtener grupos de ambientes que dan vida a la gran diversidad seres vivos como los moos. Se han valorado lugares como el agua de mar, suelo, sedimentos, subsuelo, para demostrar la cantidad de procariotes en diversos hábitats observar la Tabla 3.

Tabla 3.1. Procariotes en diversos sitios (Whitman *et al.*, 1998).

Ambiente	Células x10 ²⁹ /año
Heterótrofos marinos arriba de 200 metros	8.2
Autótrofos marinos	7.1
Suelo	1.0
Subsuelo	0.03
Animales domésticos	0.02

Para el estudio de la relación C:N se usaron 6 muestras de sedimentos (dos en época de lluvia y 4 en época de estiaje) y una muestra (estromatolito) que no es considerada como sedimento. Posteriormente, en el laboratorio se secaron las muestras en un horno. Para conocer el total del carbono y nitrógeno particulado se empleó el analizador experimental ECS 4010 que consta de tres módulos: el de combustión, el sistema de detección y el sistema de manejo de datos. En el módulo de combustión cuenta con un carrusel de 147 posiciones, además que esta sellado a la atmósfera, posteriormente pasan a un reactor las muestras donde se someten a 1,100 °C, el material rápidamente pasa a un segundo reactor de 650 °C y por último pasa a una temperatura de 60 °C para seguir al siguiente módulo. El segundo módulo detecta y mide los productos de la combustión, que pueden ser separados para el análisis de carbono y nitrógeno. En el tercer módulo se controla la captura de datos y generación de informes.

3.2. Diagramas hidrogeoquímicos

Los datos de hidrogeoquímica del agua subterránea de las zonas de estudio fueron usados para identificar procesos de evolución del agua subterránea, entre ellos la interacción agua-roca, disolución, precipitación, dilución e intercambio iónico que ocurren en el acuífero con la ayuda de diagramas hidrogeoquímicos. Otros procesos son explicados con ayuda de la geomicrobiología.

Con los datos de iones mayores se elaboraron diagramas de Piper. Estos diagramas están formados por dos triángulos equiláteros, donde muestran, respectivamente, la composición aniónica y catiónica del agua, luego en un campo central romboidal se interpreta la composición del agua deducida a partir de aniones y cationes. Es necesario incorporar las concentraciones de los iones expresadas en $\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$ a porcentaje (%). En particular, sólo se pueden reunir en cada triángulo tres aniones y/o tres cationes. A cada vértice le corresponde el 100 % de un anión o catión. Los aniones suelen representarse por $\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$, SO_4^{2-} , y $\text{Cl}^- + \text{NO}_3^-$ y como cationes: $\text{Na}^+ + \text{K}^+$, Ca^{2+} y Mg^{2+} . Los puntos de los dos triángulos inferiores se proyectan al rombo superior y se grafica el punto en la intersección (Morán-Ramírez, 2012).

Con los diagramas de Piper es posible identificar las variaciones causadas por mezclas de aguas, precipitaciones-disoluciones, procesos de intercambio iónico; en igual forma, permiten ilustrar la evolución hidrogeoquímica de las aguas y establecer de forma directa el tipo de agua en relación a las facies hidroquímicas (Cheng, 1988).

El diagrama de Miffilin (1988) ilustra una clasificación de las muestras basada en la creciente concentración de los iones Na^+ , K^+ , Cl^- y SO_4^{2-} a lo largo del flujo. La clasificación muestra puntos regionales, que corresponden a la descarga en un sistema regional, mientras que, los puntos locales e intermedios se caracterizan por el flujo de descarga de un sistema que limita a las cuencas hidrográficas. Con referencia a la química del agua subterránea es producto del agua penetrada en un área y su litología. Estos productos se complementan desde la zona de

recarga, en su recorrido hasta llegar a un pozo o salir a través de un manantial. El trayecto que tiene el agua subterránea da origen a flujos, que pueden ser locales, intermedios y regionales. Por ello, dependen de la longitud, profundidad y tiempo en el que se encuentre en el subsuelo el agua. En cuanto al flujo local predomina el HCO_3^- , se distingue por su recorrido pequeño; el flujo intermedio se encuentra SO_4^{2-} como principal componente en los aniones, debido a que ha aumentado su recorrido y el flujo regional predomina el ion Cl^- y su trayecto es mayor. Al mismo tiempo, al trabajar con los cationes se puede investigar la litología del sitio (mineralogía) (González-Abraham *et al.*, 2012). El diagrama se construye utilizando los iones en miliequivalentes, sumando cationes ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) y aniones ($\text{Cl}^- + \text{SO}_4^{2-}$) por separado; asimismo, estos datos se grafican sobre la ordenada, los cationes y aniones en la abscisa en escala logarítmica. La gráfica está dividida en tres secciones que representan los distintos flujos local, intermedio y regional (Mifflin, 1988).

Los diagramas de dispersión son métodos simples de interpretación de datos hidrogeoquímicos dado que permiten una evaluación preliminar con relación de iones y se puede establecer balances estequiométricos entre los iones e identificar procesos como el intercambio iónico, dilución y evolución de las aguas subterráneas en el estudio sitio de estudio (Lloyd Heathcote, 1985).

3.3 Biología Molecular

En el presente trabajo se utilizaron material biológico como cepas de control positivo para realizar comparaciones en los protocolos de amplificación de ácidos nucleicos por PCR (Tabla 3.2). También se utilizaron enzimas para la digestión de fragmentos de las muestras de ADN (Tabla 3.3).

Tabla 3.2. Cepas de control utilizadas.

Material biológico	Proveedor
<i>Escherichia coli</i> F ⁺ {lacIq Tn 10 (TetR)} mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZ.M15.lac ⁺ 74recA1 de OR ara D139. (ara-leu) 7697 ga/U ga/K rpsL(StrR) endA1 nupG	Donadas por el Dr. Gerardo Argüello Astorga, investigador del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
<i>Alternaria solani</i>	IFO 5924
Control positivo de bacterias para 16S rRNA, fue proporcionado de una muestra de un proyecto	María Isabel Isordia Jasso.

Tabla 3.3. Vector utilizado en la digestión de las muestras de ADN.

Vector y sus características	Proveedor
pGEM-T y pGEM-T Easy = vector de clonación EcoRI de clonación para productos de PCR	Promega (Instituto Pro Mejoramiento de la Ganadería) Panamá.

Los reactivos utilizados en los diferentes ensayos de este trabajo se listan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Reactivos utilizados.

Reactivo	Marca
Acetona	Sigma-Aldrich
Acetato de sodio	CTR científico
Ácido bórico	CTR
Ácido láctico	Karal
Agar Papa Dextrosa	MCD LAB
Agar líquido Extracto de levadura-papa-dextrosa (YPD)	MP
Agar Bacteriológico	MCD Lab
Agarosa	Nara Biotec
Alcohol isopropílico	Fermont
Ampicilina	IBI scientific
Azul algodón	Fermont

Buffer de ligación 2X rápido	Promega Madison
Carbonato de sodio	Sigma Aldrich
Bromuro de amonio cetiltrimetil (CTAB)	Aldrich
Bromuro de etidio	Promega
Cloruro de calcio dihidratado	Riedel de Haën
Cloruro de Hierro	No tiene marca.
Cloruro manganoso	Fermont
Cloruro de sodio cristal	JT Baker
Cristal violeta	Sigma- Aldrich
Etanol	Golden Bell
Extracto de carne	BD Bioxon
Extracto de levadura	MO BIO Laboratories, Inc.
Ácido etilendiaminotetraacético. (EDTA dihidratado).	USB
Fenol	Research organics
Fosfato de potasio	Fluka
Glicerol	Caledon
HEPES sal de sodio (ácido sulfónico etano 1 piperizina (2 hidroxyetil)-4)	USB
1 Kb Plus DNA ladder 250 µg (1.0 µg/µl)	Invitrogen
Ligasa T4 DNA	Promega Madison
Lisozima 50µl (80 mg/ml)	Amersham, Acceso Lab, Cd. de México
Molibdato de sodio dihidratado	SIGMA
Nitrato de calcio tetrahidratado	Fermont
Perlas de vidrio	Sigma
Peptona	MCD LAB
Proteinasa K (20 mg/ml)	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, USA.
Rosa de bengala	Hycel de México
Safranina	Aldrich
SDS (gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)	
Sulfato cúprico	Phyto technology laboratories
Sulfato de magnesio	Fluka
Sulfato de Zinc	Phyto technology laboratories.
Triptona	MO BIO laboratorios, Inc.
Tris- HCl	Intra pure

Yodo	Fermont
Yoduro de potasio	Riedel de Haën

Durante los ensayos de este trabajo se utilizaron diversos equipos en los Laboratorios del IPICyT (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Equipos utilizados.

Equipo	Marca
<i>Baño seco incubador</i>	Fisher Cientific
<i>Cámara digital</i>	Software ZEN
<i>Campana de extracción de humos</i>	F. Aldher Línea 2000. Tecno Lab.
<i>Campana de flujo laminar</i>	Tecno Lab Fisher Alder
<i>Carga de poder</i>	Thermo EC 105
<i>Carrusel</i>	New Brunswick an Eppendorf company
<i>Centrífuga Avanti J-30I</i>	Beckman Coulter Made in USA
<i>Centrífuga de mesa</i>	Megafuge 1.0. Heraeus
<i>Centrífuga</i>	Mikro20, 13000 u/min
<i>Congelador -20°C</i>	Nieto
<i>Horno Hibridiser HB-ID</i>	Techne
<i>ICP-19 c/ip humedad=44 temperatura= 24.5°C</i>	Lumistell MR
<i>Microscopio Triocular compuesto DME</i>	Marca Leica
<i>Microscopio Zeiss Image M2 AXIO</i>	Zeiss
<i>Nanodrop 2000</i>	Thermo científico
<i>Refrigerador 4 °C</i>	Nieto
<i>Thermo agitador R eppendorf 1.5 ml</i>	
<i>Termociclador DNA Engine Peltier</i>	Bio Rad
<i>Termociclador 2720 applied</i>	Biosystems
<i>Termociclador de gradiente Touchgene</i>	Techne
<i>Ultracongelador -86°C</i>	Nuaire
<i>Vórtex</i>	Genie 2

3.3.1 Cepas de referencia y condiciones de cultivo

La cepa de referencia (*Alternaria solani* IFO 5924) para hongos fue adquirida al Institute of Fermentation de Osaka, Japón (IFO) por el grupo del Dr. Alpuche del

IPICYT. Cuando es reactivada se desarrolla a 28 °C en medio Agar Papa Dextrosa.

La cepa bacteriana de referencia fue donada por Isabel Isordia Jasso. Se encontraba en el congelador a -20 °C. Se puede comparar por pertenecer a un sitio extremo.

3.3.2 Muestras analizadas

Para colección de las muestras de agua se colocaron en botes de plástico, lavados y esterilizados. En el sitio de estudio se llenaron dentro de los cuerpos de agua con guantes de látex (cambiando en cada muestra). Se cerró la botella, se cubrió con papel aluminio y se metió en bolsas de plástico, a 4 °C aproximadamente. Para las muestras de sedimentos, se llevó una espátula limpia, estéril, se tomó la muestra y se guardó en una bolsa de plástico nueva, se selló el aire. La bolsa se depositó en un plato de aluminio y a su vez se envolvió en papel aluminio y en otra bolsa. Las muestras de sedimento se guardaron también a 4 °C aproximadamente.

Los otros tipos de muestra florecimiento, filamentos, algas blancas, sedimento verde se tomaron con unas pinzas limpias, se envolvieron en las pinzas y se colectaron en tubos falcón limpios y estériles. Los tubos se sellaron y se protegieron con papel aluminio. La temperatura de traslado fue también de 4 °C aproximadamente. El estromatolito se extrajo con la pica limpia, y se guardó en una caja de plástico, limpia y en una bolsa. La muestra se rodeó con geles para mantener una temperatura baja. En el laboratorio, se resguardó la hielera en el cuarto de 4 °C. Al día siguiente se resguardaron todas las muestras en glicerol al 50 % en tubos Eppendorf y se resguardo en el ultracongelador a -70 °C. El resto de las muestras se guardó a 4 °C.

Para esta esta sección se consideraron 25 muestras agrupadas de la siguiente manera:

a) Época de lluvia.

5 muestras de cuerpos de agua: 1 de Buenavista, 3 de Arroyo Carrizal y 1 del Rincón de Parangueo.

2 muestras de sedimentos: 1 de Arroyo Carrizal y 1 del Rincón de Parangueo.

b) Época de estiaje.

8 muestras de cuerpos de agua: 1 de Buenavista, 3 de Arroyo Carrizal y 4 del Rincón de Parangueo.

4 muestras de sedimentos: 3 de Arroyo Carrizal y 1 del Rincón de Parangueo.

c) Sin clasificar.

6 muestras: 4 de Buenavista y 2 del Rincón de Parangueo.

A continuación la Tabla 3.6 presenta la nomenclatura de las muestras analizadas:

Tabla 3.6. Nomenclatura de las muestras utilizadas.

	Clave	Observaciones
1	BuVi A L-01	Manantial Azufroso. *
2	ArCa A L-02	Pared.*
3	ArCa A L-03	Agua Roja, Arroyo Mixto. Fue muy poca cantidad colectada por su escenario*
4	Ar Ca A L-04	Agua lechosa, Arroyo mixto, fue muy poca cantidad coleccionada por su escenario.*
5	RiPa A L-05	Agua verdosa. *
6	ArCa S L-06	Sedimento rojo/negro. *
7	RiPa S L-07	Sedimento blanquecino, fino y negro en su interior.*
8	Bu Vi A E-08	Manantial azufroso. **
9	ArCa A E-09	Pared .**
10	ArCa A E-10	Agua roja , a mitad del ArCa.**
11	ArCa A E-11	Agua blanca esta al inicio del camino del ArCa.**
12	RiPa A E-12	Agua verde.**
13	RiPa A E-13	Agua verdosa nueva.**
14	RiPa A E-14	Agua negra.**
15	RiPa A E-15	Agua Roja.**
16	ArCa S E-16	Sedimento cercano a la muestra de agua roja de época de estiaje.**
17	ArCa S E-17	Sedimento cercano a la pared.**
18	ArCa S E-18	Sedimento nuevo proviene del agua roja, a mitad del Ar Ca.**
19	RiPa S E-19	Sedimento.**
20	BuVi O E-20	FloreCIMIENTO, nata superficial.**
21	BuVi O E-21	Filamentos.**
22	BuVi O E-22	Organismo pegado a la roca.**
23	RiPa S E-23	Es un sedimento verde que se forma entre el agua y sedimento.**
24	RiPa OE-24	Es la única muestra que se tomo en época de estiaje.**
25	BuVi OE-25	Algas blancas.**

Código nomenclatura: abreviatura del

sitio: (ArCa, BuVi, RiPa)

agua, sedimento o sin clasificar (A, S, O)

número de muestra

lluvia (L), estiaje (E)

*=Primer monitoreo, **=segundo monitoreo

3.3.3 Métodos microbiológicos

Se prepararon los siguientes medios (sólidos) de agar papa dextrosa PDA (Medios de cultivo deshidratados para microbiología y biología molecular Tabla 7.2) para el enriquecimiento de hongos, medio Extracto de Levadura-Papa-Dextrosa YPD (Medios de cultivo deshidratados para microbiología y biología molecular Tabla 7.2) para el enriquecimiento de bacterias y medio nutritivo específico para organismos halófilos y alcalófilos (Castro-Piña *et al.*, 2011). El medio Chu 10 D modificado para cianobacterias y microalgas (Gómez *et al.*, 2009) se preparó sólido y líquido.

También se prepararon los medios Garrod para aislamiento de actinobacterias, medio avena jitomate para activar hongos, medio rosa de Bengala para el aislamiento de hongos de sustratos contaminados (Hernández-Zavala, 2004). Se agregó 1 µL de agua, en sedimentos se utilizaron con una espátula se toma 0.5 g (cada muestra) y en las muestras sin clasificar se depositó el material con una pinza sobre el medio de cultivo. Todas las inoculaciones se realizaron por duplicado. Los cultivos se incubaron a 28 °C en condiciones aerobias para todos los medios mencionados excepto en los siguientes casos el medio nutritivo que se empleó solo en muestras del Rincón de Parangueo, bajo condiciones aerobias y anaerobias; el medio Chu 10 D modificado no se utilizó en condiciones anaerobias. Las cianobacterias se incubaron a 24 °C con una humedad de 44%, iluminadas con luz blanca que se enciende cada 12 h simulando la iluminación del día y la noche.

Para obtener la anaerobiosis se utilizó un frasco de plástico, en su interior se colocaron las cajas Petri y encima de ellas una vela encendida que consumió el oxígeno presente. Se cerró el frasco herméticamente y alrededor se selló con una cinta plástica. Se observó que se apagara la vela (Fig. 3.2).

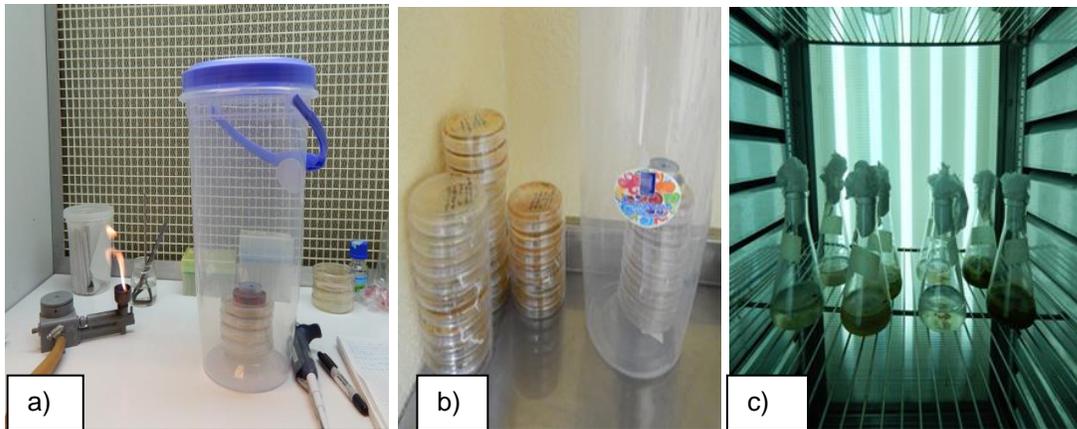


Figura 3.2. a) La campana de flujo laminar proporciona condiciones de esterilidad a las muestras en medio sólido. b) Cuarto con temperatura de 28 °C se observan muestras en condiciones aerobias y anaerobias. c) Medios de cultivos líquidos Chu en una cámara ambiental.

Tinción de Gram

Es una tinción diferencial, basada en la estructura y arquitectura de las paredes microbianas. La pared de las bacterias Gram positivas (G+) consta de un tipo de molécula el péptidoglicano (llamado mureína), formado por dos cadenas de aminoazúcares: N- acetilglucosamina (G) y ácido N-acetil murámico (M). El péptidoglicano no se encuentra en eucariontes con puentes transpeptídicos de aminoácidos que le dan a esta molécula una estructura de malla y gran rigidez. El ácido pimélico es un aminoácido presente en todas las bacterias Gram negativas y en algunas especies de Gram positivas. Una célula bacteriana tiene diversas estructuras, La diferencia radica en la estructura y el contenido de las paredes bacterianas. La reacción de la tinción de Gram puede ser Gram positivas donde las bacterias se tiñen de color púrpura-violeta y Gram negativas las bacterias se colorean de color rosado.

Las siguientes características están presentes generalmente en una bacteria Gram-positiva:

- Membrana citoplasmática.
- Capa gruesa de peptidoglicano.

- Ácidos teicoicos y lipoteicoicos.
- Polisacáridos de la cápsula.

Si algún flagelo está presente, este contiene dos anillos como soporte en oposición a los cuatro que existen en bacterias Gram-negativas porque las bacterias Gram-positivas tienen solamente una capa membranal (Frioni, 1999).

Para la tinción de Gram se utilizó un portaobjetos, agregándole una gota de agua destilada estéril, una asada de la muestra, fijándola con calor, tres a cuatro veces. Se colocó el portaobjetos en un puente para cubrirlo con cristal violeta por un minuto. Lavarlo con agua, posicionando la laminilla de forma vertical. Se acomodó la laminilla en el puente y se cubrió con lugol por un minuto. Lavarlo con agua, ubicando la laminilla de manera vertical. En la posición vertical, se decoloró con alcohol acetona y enjuagó con agua corriente. Acomodada la laminilla en el puente, se tiñó con safranina por 30 s. Se lavó con agua, dejando la laminilla de manera vertical (Hernández-Zavala, 2004). Se dejó secar al medio ambiente o agregarle 5 μ L de glicerol al 50 % adicionándole un cubreobjetos; sellarlo en las orillas del cubre objetos con el portaobjetos con pintura de uñas, observarlo al microscopio con aceite de inmersión a 100X. Se sugiere que se observe en un microscopio con el modo contraste de fases. Los microscopios que se emplearon fueron el *microscopio triocular compuesto DME (Leica)* y el *microscopio Zeiss Image M2 AXIO (Zeiss)*.

Tinción de azul algodón láctofenol.

Es una tinción utilizada para observar hongos hialinos, demateaceos, que cuentan con estructuras que requieren se vean con alta calidad y con contraste, por eso se emplean diversos compuestos químicos que permiten ver entre la pared y el citoplasma de las células fúngicas. El fenol inactiva las enzimas líticas de las células e impide que no se rompa; además destruye la flora acompañante e inactiva a la célula. El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas al tener un cambio de gradiente osmótico con relación al interior fúngico, protege a la célula.

El azul de algodón es un colorante ácido que tiñe el citoplasma y la quitina en las células fúngicas (López-Jácome *et al.*, 2014). El glicerol mantiene húmeda la preparación. El procedimiento para preparar la muestra es tener un portaobjetos limpio, agregar una gota del azul algodón lactofenol. Con un asa micológica, previamente estéril por el mechero se adhiere una cinta adhesiva en su punta y la cinta se pega a una colonia fúngica de preferencia elegirse la periferia de la colonia porque es donde se encuentran colonias más jóvenes, retirarlo con cuidado la cinta. Con la ayuda de tijeras o con una pinza despegar la cinta del asa micológica y ponerla sobre el portaobjetos. Se colocó encima un cubreobjetos. Observarlo en un objetivo de 10X y 40X.

Si no se llegara a observar el origen de las estructuras fúngicas, realizarle la técnica de microcultivo de Riedell o cultivo en Block (Checarse en el apéndice).

Para microalgas y cianobacterias.

Solo se requiere que se tenga un portaobjeto, agregarle una gota de la muestra que se encuentra en un medio líquido o de la muestra si está en estado líquido, después colocarle un cubreobjetos. Moverle el micrómetro del *microscopio*. Las estructuras suelen esconderse en los sustratos o se mueven muy rápidamente. Se observan en *microscopio óptico* con el método de iluminación de campo claro y objetivos de 10X y 40X.

3.4 Biología Molecular

3.4.1 Métodos de extracción de ADN

En el presente trabajo se utilizaron protocolos probados para la extracción de ADN, algunos fueron modificados y adaptados en el presente trabajo (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Protocolos probados para la extracción de ADN.

No	Protocolo de métodos de extracción
1	Protocolo adaptado por Isabel de Gabor <i>et al.</i> 2003 (Perlas de circonia y sílice)
2	Protocolo adaptado de Hernández-Rico (2004), modificado de Alpuche-Solis (1999)
3	Protocolo de ITS para hongos adaptado por Hernández-Rico (2004)
4	Protocolo para microalgas modificado de Liu <i>et al.</i> 2014 en este trabajo.

Los protocolos 1 y 2 fueron eficientes para cierto tipo de muestras. El segundo protocolo fue modificado por Pastor-Palacios en este trabajo para algunas muestras.

3.4.1.1 Método de extracción adaptado de Gabor por Gómez-Rodríguez (2007)

Se requiere romper los microorganismos por medios químicos y enzimáticos por lo que se necesitan 0.5 mL de agua y 2 g de sedimento. Se utilizaron tubos Falcon, estériles, se les agregaron 2 mL de buffer de lisis [[100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA de sodio, 1.5 M NaCl, 1 % bromuro de hexadecimetilamonio (CTAB)], pH 8 y la muestra. Para el buffer de lisis se preparó soluciones por separado y fueron esterilizados. Se le adicionó el CTAB al final, no se esteriliza porque es un detergente.

Se pesó 0.5 g de perlas de vidrio. Se añadió perlas de vidrio en ambiente de esterilidad. Se adicionó lisozima 50 µL (80 mg/mL), agitándose en el *vórtex*, por 5 min por cada muestra. Se colocó en el cuarto de 37 °C en agitación lenta por toda la noche. Se sacó y se añadió 500 µL SDS (20 %) y 20 µl de proteinasa K (20 mg/mL). Colocándose las muestras en el *horno de hibridación* a 65 °C por 3 h y se agitaron cada 30 min en el *vórtex* por 30 s. Se le adicionó 3 mL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se agitó utilizando el *vórtex* (velocidad máxima por 30 s). Se usó una *centrífuga de mesa* 4,000 rpm por 25 min. Se recolectó la fase acuosa y fue colocada en otro tubo Falcon de 15 mL. Se agregó

isopropanol en volumen similar a la fase colectada. Se le retiró la fase acuosa utilizando una micropipeta, cuidando de no tocar la fase de separación. Se dejó en el *congelador* a -20 °C toda la noche o pudo permanecer 20 min en el *congelador*. Se sacó del *congelador* el tubo Falcon, se movió suavemente el tubo Falcon y se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. De acuerdo a la cantidad, se repitió en numerosas ocasiones. Se agitó en el *vórtex*. Los tubos se colocaron en la *centrífuga*, por 20 min a 13,000 rpm. Una vez formada la pastilla de ADN, se desechó el líquido restante, cuidando que la pastilla no se desprege. Si la pastilla llega a desprenderse, será conveniente utilizarse una micropipeta para eliminarse el líquido. Se agregó 750 µL de alcohol etílico al 70 %. Luego se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. Se le quitó el exceso de líquido cuidando que la pastilla de ADN no se pierda. Se acomodaron las muestras para que se secan a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 25 µL de agua milli Q estéril. Moverlo suavemente para disolver el ADN. Se realizó una cuantificación de ADN en el *nanodrop* y se guardaron las muestras en el *congelador* -20 °C.

3.4.1.2 Método de extracción adaptado de Hernández Rico (2004)

Se pesó aproximadamente 0.5 g de suelo, en el caso de agua se necesitó 1 mL de muestra, centrifugarse a 13,000 rpm por 2 min (se repitió el proceso 3 veces si se tiene suficiente muestra). Se le agregó 500 µL de buffer de extracción. Se mezcló en *vórtex* 20 s. Se incubó a 65 °C por 15 min (se agitó cada 5 min en *vórtex*). Centrifugarlo a 13,000 rpm por 10 min y llevarlo a un nuevo tubo el sobrenadante. Se adicionó 500 µL de cloruro de bencilo, mezclarlo en el *vórtex* por 1 min. Se incubó a 65 °C por 15 min (agitarlo cada 5 min en *vórtex*). Se centrifugó 10 min a 13,000 rpm. Se colectó la fase acuosa en un tubo de 1.5 mL, agregándole un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló con *vórtex*. Se le incubó en hielo por 10 min. Después se centrifugó 10 min a 13,000 rpm, se observaron dos fases. Debe separarse la fase acuosa, por lo que se pasó a un tubo nuevo de 1.5 mL. Se adicionaron 2 µL de RNAsa 10 mg/mL, mezclarlo manualmente. Se le dejó por 20 min a temperatura ambiente. Se precipitó el ADN

con un volumen igual de isopropanol y se mezcló por inversión. Se dejó la muestra en hielo por 15 min. Después se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm, se eliminó el sobrenadante (vertirlo en un recipiente). Se lavó la pastilla con 300 µL de etanol 70 %. Se le centrifugó 5 min a 13,000 rpm y se eliminó el etanol. Se secaron a temperatura ambiente (invertir los tubos por 30 min aproximadamente) y se resuspendieron con 50 µL de agua milli Q. Se cuantificó el ADN en el *nanodrop*. Posteriormente fueron almacenadas las muestras a -20 °C en el *congelador*.

3.4.1.3 Método de extracción de ADN para amplificación de ITS para hongos adaptado por Hernández Rico (2004)

El cultivo del hongo se obtuvo a partir de medio sólido agar papa dextrosa, se dejó incubar el tiempo necesario. Se agregó 500 µL del buffer de extracción (usado en el protocolo de extracción de Elvira modificado de la tesis del Alpuche Solís 1999 (Hernández-Rico, 2004). Se incubó a 65 °C por 40 min (Se agitó en el *vórtex* cada 10 min). Se agregó 500 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló con el *vórtex* y se le centrifugó 10 min a 13,000 rpm. Se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo. Se le adicionó 2 µL de ARNsa 10 mg/mL, se le incubó por 20 min a temperatura ambiente. Se precipitó el ADN con un volumen igual de isopropanol frío y se mezcló por inversión. Se dejó la muestra en hielo por 5 min. Después se le centrifugó por 10 min a 13,000 rpm y eliminó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con etanol 70 % con 500 µL. Se le centrifugó 5 min a 6,000 rpm. Se eliminó el etanol. Se expuso a temperatura ambiente para que se secase y se resuspendió a 50 µL de agua Milli Q. Se cuantificó en el *nanodrop* y se guardó en el *congelador* a -20 °C.

3.4.1.4 Método de extracción de ADN para amplificación de ITS para microalgas y cianobacterias adaptado en este trabajo

Se preparó medio sólido y líquido Chu 10 D modificado (Gómez *et al.*, 2009) incubado los microorganismos durante aproximadamente 3 meses para tener suficiente inóculo y extraer su ADN (Liu *et al.*, 2014). Para el caso del medio sólido, con un palillo de madera previamente esterilizado se raspó la muestra y se

colocó en un tubo Eppendorf agregándole 15 μL de buffer de extracción 5X (1.5 mM), el cual se describe en la sección 3.4.1.3; posteriormente se colocó en un termociclador, donde se realizaron pruebas previas con diferentes temperaturas (60 a 100 $^{\circ}\text{C}$) y tiempos de incubación (15 a 20 min), se optó por usar la condición en que la muestra no se deshidratava (60 $^{\circ}\text{C}$ y 15 min). Para el medio líquido se tomó con una micropipeta 5 μL de alícuota del microorganismo crecido, y se colocó en un tubo Eppendorf agregándole 10 μL de Buffer de extracción con una concentración de 2X (1.5 mM). Los mejores resultados tanto para medio sólido y líquido fueron a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min. La muestra seleccionada fue la RiPaSL-07, por tener suficiente crecimiento. Se sacaron las muestras del termociclador, para agregarles 10 μL de la mezcla de PCR a cada muestra.

3.4.2 Protocolo de amplificación por PCR

Para este método se utilizó el protocolo adaptado de Gabor por Gómez-Rodríguez (2007) y el protocolo adaptado de Hernández Rico (2004). Los genes que transcriben el *rRNA 16S* se amplificaron en un PCR con un total de 25 μL , incluyendo 2 μL ADN genómico directo, en algunos casos se utilizó diluciones 1:10, 1:50, 1:100 ó se agregó 1 μL de ADN genómico directo, en algunos casos se utilizó diluciones 1:10, 1:100 se ajustó el agua inyectable a la reacción final o se calculó exactamente la cantidad de ADN para agregar a la reacción; buffer de PCR 5X, dNTPs 10 μM , MgCl_2 2.5 mM, oligo 533 10 μM , oligo1391 10 μM , 0.2 μL de Taq polimerasa (Go) 5U/ μL , agua inyectable. Para la preparación de la reacción se usó una campana que tenga luz UV para la esterilización del lugar y material (puntillas, tubos, micropipetas). Se utilizó en un *termociclador DNA Engine Bio Rad Peltier Thermal Cycler* las siguientes reacciones de ciclado; la desnaturalización inicial 95 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min, consecutivamente se realizaron 30 ciclos 95 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, seguida de una extensión final 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min. Para observar los productos de las reacciones de PCR se ponen en un gel, en una *cámara de electroforesis*, cargando 10 μL de la muestra (7 μL de PCR y 3 μL de buffer de carga Orange G corrido en una fuente de poder a 70 mV por aproximadamente 45 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/mL, 80

μL en 400 mL de agua destilada) y se observó inmediatamente en el *fotodocumentador (UVP Epi chemi Darkroom, USA, Chemi System Bioimaging Systems)*. El tamaño esperado del amplicón es de 858 pb.

3.4.2.1 Protocolo de amplificación por PCR

Se utilizó el protocolo adaptado de Hernández Rico (2004), modificado en este trabajo por Pastor-Palacios, los genes que transcriben el ARNr 16S se amplificaron en un PCR con un total de 50 μL, incluyendo 2 μL ADN genómico directo, buffer de PCR 5X, dNTPs 0.2 μM, MgCl₂ 2.5 mM, oligo 533 0.5 μM, oligo 1391 0.5 μM, 0.2 μL de Taq polimerasa (Go) 5U/μL, agua inyectable. Se realizó la preparación de la reacción en una *campana* que tenga luz UV. Se utilizó en un *termociclador DNA Engine Bio Rad Peltier Thermal Cycler* las siguientes reacciones de ciclado; la desnaturalización inicial 95 °C por 2 min, consecutivamente se realizan 30 ciclos 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, seguida de una extensión final 72°C por 5 min. Para la observación de los productos de las reacciones de PCR se colocaron en un gel, en una *cámara de electroforesis*, cargando 10 μL de la muestra (7 μL de PCR y 3 μL de buffer de carga Orange G corrido en una *fuentes de poder* a 70 mV por aproximadamente 45 min. El gel se tiñe con bromuro de etidio (10 mg/mL) y se observa inmediatamente en el *fotodocumentador (UVP Epi chemi Darkroom, USA, Chemi System Bioimaging Systems)*. El tamaño esperado del amplicón es de 858 pb.

3.4.2.2 Protocolo de amplificación por PCR anidada con oligonucleótidos universales internos

A las muestras que no se obtuvo producto de amplificación usando los oligos 533 F y 1391 R, tanto en los protocolos Protocolo adaptado de Gabor por Gómez-Rodríguez (2007) y Protocolo adaptado de Hernández Rico (2004), se realizó un segundo PCR agregando 1 μL directo del producto de amplificación del primer PCR efectuado. Los oligonucleótidos fueron diseñados (Gómez, 2007), se les llama U1840F y U1840R formando los siguientes pares U1840F y 1391 R, ó 533F y U1840R para la reacción anidada. Se incluyen 1 μL ADN genómico directo, buffer de PCR 1X, dNTPs 200 μM, MgCl₂ 1.5 mM, oligo U1840R 1 μM, oligo

U1840F 1 μ M, 0.1 μ L de Taq polimerasa (Go) 5U/ μ L, agua inyectable, y se realizó en *campana con lámpara UV* para esterilizar previamente el lugar donde se trabajó. Se utilizó en un *termociclador DNA Engine Bio Rad Peltier Thermal Cyclers* para las siguientes reacciones de ciclado; la desnaturalización inicial 95 °C por 5 min, consecutivamente se realizan 30 ciclos 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, seguida de una extensión final 72 °C por 1 min. Para observar los productos de las reacciones de PCR se ponen en un gel, en una cámara de electroforesis, cargando 10 μ L de la muestra (7 μ L de PCR y 3 μ L de buffer de carga Orange G) en un gel de agarosa 1X corrido en una *fuentes de poder* a 70 mV por aproximadamente 45 min. El gel se tiñe con bromuro de etidio (10 mg/mL) y se observa inmediatamente en el *fotodocumentador (UVP Epi chemi Darkroom, USA, Chemi System Bioimaging Systems)*. El tamaño esperado de la banda es de 500 pb aproximadamente.

3.4.2.3 Protocolo de amplificación por PCR para ITS para hongos

Este método se usó en protocolo adaptado de Hernández-Rico (2004), los genes transcriben el *rARN 16S* se amplificaron en un PCR con un total de 25 μ L, incluyendo 1 μ L ADN genómico directo, buffer de PCR 10X, dNTPs 10 μ M, MgCl₂ 1.5 mM, oligo 533 10 μ M, oligo 1391 10 μ M, 2.5 μ L de Taq polimerasa (Go) 5U/ μ L, agua inyectable. Se realizó la preparación de la reacción en una *campana que tenga luz UV*. Se efectuó en un *termociclador DNA Engine Bio Rad Peltier Thermal Cyclers* con las siguientes reacciones de ciclado; la desnaturalización inicial 94 °C por 2 min, consecutivamente se realizó 30 ciclos 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72°C por 1 min, seguida de una extensión final 72 °C por 7 min. Para la observación de los productos de las reacciones de PCR se pusieron en un gel, en una *cámara de electroforesis*, cargando 10 μ L de la muestra (7 μ L de PCR y 3 μ L de buffer de carga Orange G corrido en una fuente de poder a 70 mV por aproximadamente 45 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/mL) y se observó inmediatamente en el *fotodocumentador (UVP Epi chemi Darkroom, USA, Chemi System Bioimaging Systems)*. El tamaño esperado es relativo.

3.4.3 Protocolo de amplificación por PCR para microalgas

El protocolo reportado por Liu *et al.* (2014) fue adaptado en este trabajo. Para la mezcla de PCR de 10 μ L para cada muestra, se agregó 1 mM de cada uno de los oligos, 0.2 μ L de Taq (Go) de 5U/ μ L, de dNTPs 400 mM, de MgCl₂ 25 mM, agua inyectable y buffer de PCR 2X. Se realizó un gradiente de temperatura de 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C agregando 1.5 mM o 2 mM de MgCl₂ para medio sólido y líquido.

Las condiciones para el termociclador fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial 98 °C por 3 min; y 30 ciclos con desnaturalización 98 °C por 1 min, alineamiento de 55 a 60 °C por 50 s, extensión de 72 °C por 1 min; la extensión final fue a 72 °C por 5 min.

Las muestras de PCR se corrieron en gel de agarosa 1% con TEB 1X, las muestras se prepararon con 3 μ L de buffer de carga más 5 μ L de muestra; se puso 2 μ L de marcador de peso molecular. Se observó solo una banda tenue que correspondió al medio sólido a 58 °C con 1.5 mM de MgCl₂. En las demás condiciones no se observó amplificación.

A continuación la Tabla 3.8 de los oligos que se utilizaron en los métodos de PCR.

Tabla 3.8. Oligos empleados en los métodos de extracción.

No.	Nombre del oligo (secuencia)	Autor
1	533F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')	Bond <i>et al.</i> , 2000
2	1391R (5'-GACGGGCGGTGTGTRCA-3')	Barns <i>et al.</i> , 1994
3	U1840F (5'-AAC TYA AAG GAA TTG RCG GG-3')	Gómez-Rodríguez, 2007
4	U1840R (5'-CCC GYC AAT TCC TTT RAG TT-3')	Gómez-Rodríguez, 2007
5	ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')	Hernández-Rico, 2004
6	ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	Hernández-Rico, 2004
7	ITS_f (5'-AGGAGAAGTCGTAACAAGGT-3')	Liu <i>et al.</i> , 2014
8	ITS_r (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	Liu <i>et al.</i> , 2014

3.4.4 Protocolo de ligación con el vector de clonación *pGEM-T/ pGEM-T Easy*

Para cada reacción se mezclaron los reactivos en el siguiente orden: agua inyectable PISA 3.0 μL , Buffer de ligación 2X PROMEGA 5.0 μL , Vector *pGEM-T Easy* 50 ng/ μL PROMEGA 0.5 μL , producto de PCR 0.5 μL , T4 DNA Ligasa 3 μL PROMEGA 1.0 μL , para un volumen final de 10 μL . Dejar a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 h. Se sacaron las muestras ligadas a temperatura ambiente y se les agregó 0.3 μL de ligasa. En caso de no usarse inmediatamente se guarda a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.5 Preparación de células competentes

Se creció 1 mL de preinóculo durante toda la noche en un matraz de 250 mL con 50 mL medio LB a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se inoculó con 50 μL al medio LB de 500 mL, se agitó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 90 a 100 min (hasta obtener una absorbancia de 0.2 a 0.3 λ). Se colocaron en botellas Sorval de 50 mL el cultivo. (Se mantuvieron los tubos en hielo, se trabajó rápidamente). Después se centrifugó a 8,000 rpm por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Se eliminó el sobrenadante). Se le adicionaron 7.7 mL de solución CaCl_2 frío, se resuspendió la pastilla de 5 a 10 s en el *vórtex*. Se centrifugó 10 min a 9,000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 1.27 mL de solución de CaCl_2 (enfriada previamente) y se resuspendió en el *vórtex* durante 5 a 10 s. Finalmente se alicuotó 60 μL , colocado en nitrógeno líquido rápidamente. Se llevó de inmediato a ultracongelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Checar en el anexo la preparación de la solución de CaCl_2 .

3.4.6 Protocolo para transformación de células competentes

Se colocaron los tubos que contienen las células competentes (Células top 10 F de *E. coli*) en un baño de hielo durante 10 min. Una vez descongeladas las células se les agregó 5 μL de cada muestra que tiene vector ligado con el fragmento de interés, no mezclar, dejarlo 20 min, se lleva a un *baño María* de $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 50 s para provocar el choque térmico. Sacar de inmediato. Regresarlo de inmediato al baño de hielo por 10 min y se adicionó 500 μL de medio líquido LB, colocándose en el *Thermomixer R. Eppendorf* 1.5 μL por 600 rpm a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h. Transcurrido el tiempo de agitación de las muestras ligadas, se centrifugaron durante 3 min a 5,000 rpm para concentrar el cultivo. Se desechó sobrenadante hasta que

restaran 100 μL aproximadamente. Los 100 μL recuperados se inocularon en placas de medio LB-IPTG-XGal. Las placas se incubaron a 37 °C durante la noche. Las cajas de medio sólido LB se prepararon con carbenicilina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Una vez solidificado el medio, se le adicionaron 20 μL de XGal (40 mg/mL) y, 40 μL de IPTG (0.36 g en 1.5 mL).

3.4.7 Protocolo de extracción de ADN plasmídico (Miniprep) Basado en el método de Birnboim, 1979

Una vez que las bacterias fueron transformadas ubicadas en tubos Falcón de 15 mL con 3 mL de medio LB líquido con carbenicilina durante 18 h a 37 °C. Se trasladaron a tubos Eppendorf de 1.5 mL, centrifugándolos a 4,000 rpm por 3 min, se repitió las veces necesarias hasta tener la muestra concentrada en el tubo. Añadirle 150 μL de la solución I (Anexo), mezclar con *vórtex* (ver que se deshaga la pastilla por completo). Añadirle 300 μL de la solución II (Anexo), mezclarlo por inversión. Se incubó 5 min a temperatura ambiente. Añadirle 225 μL de la solución III (Anexo), se mezcló bien por inversión. Dejarlo en hielo 5 min. Se centrifugó 5 min a 13,000 rpm y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Adicionarle 10 μL de ARNsa Roche (0.1g/mL se prepara con agua inyectable).

Se dejó incubando por 30 min a 37 °C en el *horno de hibridación*. Adicionarle un volumen aproximado al de la muestra de isopropanol frío, dejarlo precipitar a -20 °C en el *congelador* por 30 min. Centrifugarlo 10 min a 13000 rpm. Eliminarle el sobrenadante. Se añadió 1 mL de etanol al 70 %. Centrifugarlo por 2 min a 5,000 rpm, se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla, en el *baño incubador en seco*. Adicionarle 50 μL de agua inyectable estéril.

3.4.8 Protocolo para digerir ADN plasmídico

Para cada reacción se agregó 1 μL de Buffer 10X Biolabs, 6.7 μL agua inyectable PISA, 0.3 μL Enzima *EcoRI* 20,000 U/mL Biolabs con un volumen total de 10 μL . La reacción se dejó incubar por 1 h. Se le realizó un gel de agarosa para observar las digestiones de las reacciones.

3.4.9 Protocolo de purificación de plásmidos por precipitación sin columna

En un tubo Eppendorf se le agregó 300 µL de agua inyectable, se agregaron 50 µL de miniprep. Agregarle etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio. Se incuban por 2 h a -20°C o puede ser toda la noche a -20°C. Se sacó del congelador y centrifugarlo a 13,000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con 500 µL de etanol al 70 %. Centrifugarlo a 7,000 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y dejar secar la pastilla. Se resuspendió en 30 µL de agua inyectable. Se corrió un gel de agarosa 1X y por último cuantificarlo en el nanodrop (ng/µL).

3.4.10 Aislamiento de ADN plasmídico, digestión y purificación de las clonas seleccionadas

A las clonas se les realizó la extracción del ADN plasmídico, siguiendo el protocolo de Birnboim, 1979. A los plásmidos se les realizaron digestiones con la enzima de restricción usando *EcoRI* (Promega Invitrogen) para confirmar la presencia y el tamaño esperado del fragmento esperado. Se purificó por precipitación. Las muestras se cuantificaron para saber su concentración, se corren en un gel utilizando un marcador de peso molecular de 1Kb ADN ladder (Biolabs). La secuenciación de las clonas obtenidas se realizó en el *Genetic analyzer 3130 de Applied Biosystems* en el LANBAMA-IPICYT.

3.4.11 Análisis de Secuencias y construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias de las clonas obtenidas se observan con el electroferograma, se compararon por el método del paquete Blast del sitio de NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> con el apoyo de la base de datos para nucleótidos. Posteriormente se determinó el contiguo fasta con la ayuda de DNA baser (www.DNAbaser.com). Se orientan las secuencias y las quimeras se identifican utilizando Pintail. Los filotipos redundantes ($\geq 97\%$) se eliminan con la unidad taxonómica operativa (OTUS) de distancia en los análisis con el proyecto Base de Datos RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>). Las secuencias de genes fueron alineados con el algoritmo ClustalW. Alineaciones incluyen los filotipos y el más cercano en géneros el proyecto del árbol de vida para todas las especies.

Posteriormente la probabilidad y la topología de los arboles filogenéticos se utilizó el método bayesiano, con el Mega.

Las secuencias de genes 16S rRNA serán depositadas en la base de datos GenBank.

4.0 Resultados y Discusión

4.1.1 Hidrogeoquímica

Las características fisicoquímicas de los sitios extremos estudiados en el presente trabajo se describen a continuación.

Respecto al pH, es un parámetro básico que indica el grado de acidez o basicidad del agua. Influye en una serie de reacciones que ocurren en el agua. Por lo general, un pH menor a 6 es considerado agresivo y corrosivo para los metales. Concerniente a la medición del pH debe realizarse *in situ*, ya que conforme pasa el tiempo se modifica por diversas causas, por ejemplo reacciones químicas fomentadas por la sobresaturación de CO₂ y la presencia de plantas acuáticas además de la temperatura.

En el caso del Arroyo Carrizal, se identificó un sitio clasificado como siderófilo y otro acidófilo, debido a las altas concentraciones de Fe y pH cercano a 1. En cambio, el manantial de Buenavista se clasificó como neutrófilo y halófilo debido a su pH circumneutral y a su salinidad (Fig. 4.1).

Así como, el Rincón de Parangueo fue clasificado como un sitio poliextremo, debido a que tiene valores de alcalinidad extremadamente altos (alcalófilo) y muy salino (halófilo) (Fig. 4.1).

Otros sitios en el mundo, como la fuente termal “el Jordan” (Colombia), tiene un pH de 5.6 a una altitud de 2,240 msnm (Garzón-Valencia, 2001). “El Aguacatal”, en el mismo país con un pH de 6.3 a una altitud de 2680 msnm (Garzón-Valencia, 2001). “La Calera” (Colombia), con un pH de 6.8 a una altitud de 2,690 msnm (Garzón-Valencia, 2001); con ello se puede decir que existen lugares con diferente altitud pero con pH neutros, para el caso del pH del manantial de Buenavista va de 6.18 a 6.46 a una altitud de 1,200 msnm.

Asimismo, otros grupos de investigación reportaron en “el Hotel Termal del Ruiz” (Colombia), un pH de 1.8 a una altitud de 3,530 msnm (Garzón-Valencia, 2001),

“Aguas Calientes” (Colombia), presentó un pH de 1.6 a una altitud de 3,793 msnm (Garzón-Valencia, 2001), “Guali” (Colombia) sostuvo un pH de 2.7 a una altitud de 4,700 msnm (Garzón-Valencia, 2001). El Rio Tinto (España) tuvo un pH de 1.16 con una altitud de 416 msnm aproximadamente (López-Archilla, 2005). En igual forma, los datos de la muestra de arroyo Carrizal estimó un pH que fue de 1.43 a 1.6 a una altitud de 1,236 msnm.

Además, otros grupos de investigación mencionan el Cráter-Lago de Alchichica (México) tiene un pH de 8.5 con una altitud de 2,340 msnm aproximadamente (Mancilla-Villa *et al.*, 2014). El Lago Tirez (España) alcanza un pH de 9.08 con altitud aproximada de 663 msnm (Montoya *et al.*, 2013), el lago Natrón (Kenia) conserva un pH entre 10.7 con una altitud de 610 msnm (Luque, 1995). En el caso de los sitios en estudio, la muestra del Rincón de Parangueo obtuvo pH de 9.47 a 10.16 en una altitud de 1,638 msnm.

A pesar de haber sitios ubicados en latitudes cercanas, sus pH cambian y esto puede afectar al tipo de moos que vive en ese entorno, por este motivo en particular marcan los límites de la vida adaptados a esas condiciones.

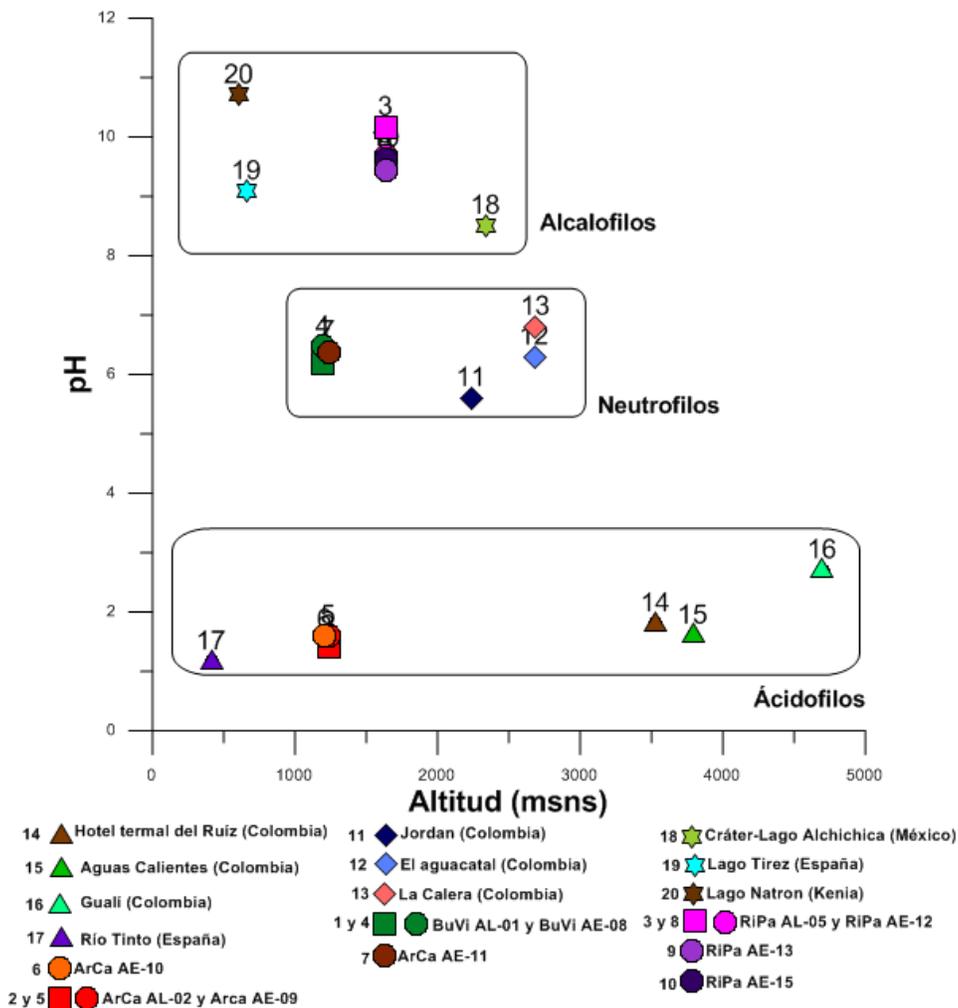


Figura 4.1. Altitud vs. pH en Villa Juárez , San Luis.Potosí. y Rincón de Parangueo , Guanajuato.

En igual forma, la temperatura es otro de los parámetros más importantes en los flujos subterráneos, porque puede influir en las tasas de la actividad biológica, solubilidad del oxígeno, la precipitación de compuestos y la formación de depósitos, por ejemplo (Aznar-Jiménez, 2000). Múltiples factores, principalmente los ambientales, pueden modificar la temperatura del agua continuamente. Respecto a Buenavista hubo un pequeño aumento de temperatura entre la temporada de lluvia y estiaje. Mientras que en arroyo Carrizal se estudiaron tres muestras de agua subterránea, donde una de ellas fue monitoreada en época de lluvia y estiaje. Se reconoció una disminución en la temperatura desde el estiaje a la lluvia (25.7 °C y 24.74 °C) (Fig. 4.2).

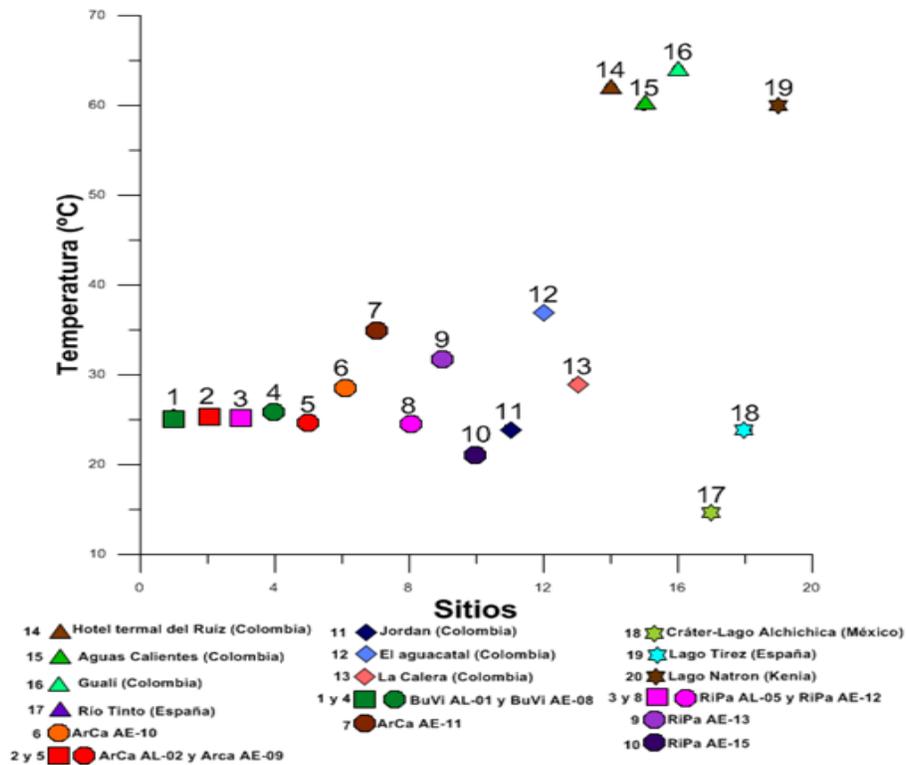


Figura 4.2. Ambientes Extremos Villa Juárez, San Luis Potosí. y Rincón de Paranguero, Guanajuato. vs. Temperatura (°C).

Particularmente otra muestra BuVi AE-08 se encontró en los 26 °C; así como, otro flujo subterráneo ArCa SE-17 presentó una temperatura que casi llegó a los 36 °C. En relación a este sitio se pudo observar un pronunciado gradiente de temperatura durante la época de estiaje. En cambio, en Rincón de Paranguero, se determinó la temperatura de tres muestras de agua subterránea, una de ellas fue monitoreada en época de lluvia y estiaje, al mismo tiempo se observó que disminuyó ligeramente la temperatura de una temporada a otra (25.4 °C a 24.61 °C RiPa AL-05 y RiPa AE-12 respectivamente). Las otras muestras Rincón de Paranguero se colectaron y midieron solamente en época de estiaje y se determinaron temperaturas de 32 y 22 °C (Fig. 4.2). Se puede resaltar que durante la época de estiaje se observaron cambios de temperatura en un mismo sitio, así como por ejemplo en arroyo Carrizal tuvo 24.74, 28.81 y 35.22 °C, mientras que en Rincón de Paranguero 24.61, 31.97 y 21.46 °C.

Sin embargo, han reportado que en otros lugares como “El Jordan” (Colombia) una temperatura de 24 °C (Garzón-Valencia, 2001), “El Aguacatal” (Colombia) con una temperatura de 37 °C (Garzón-Valencia, 2001), “La Calera” (Colombia) tuvo una temperatura de 29 °C (Garzón-Valencia, 2001).

En igual forma, otros investigadores informan datos del “Hotel Termal del Ruiz” (Colombia) conservó una temperatura de 62 °C (Garzón-Valencia, 2001), “Aguas Calientes” (Colombia) con una temperatura de 60 °C (Garzón-Valencia, 2001), “Guali” (Colombia) estimó una temperatura de 64 °C (Garzón-Valencia, 2001).

Así mismo, otros grupos reportaron en el Cráter-Lago de Alchichica (México) una temperatura de 14.7 °C (Mancilla-Villa *et al.*, 2014), en el lago Tirez (España) su temperatura reporta variaciones de 10.1 °C a 23.8 °C (Montoya *et al.*, 2013), el lago Natron alcanza temperaturas de 40 a 60 °C en el verano (Barba-Egido *et al.*, 2015).

En cuanto a el potencial óxido reducción (redox, ORP) es un valor que se asocia con el intercambio de energía química que puede liberarse o acumularse en compuestos químicos contenidos en algún proceso (Albarrán-Zavala, 2008), es un valor relativo medido contra el punto cero del electrodo normal de hidrógeno. A fin de entender el concepto, es necesario definir otros conceptos como respecto a la reducción que es la ganancia de electrones por parte de un átomo, molécula, grupo de átomos o de moléculas; acerca de la oxidación se refiere a la pérdida de electrones por parte de un átomo, molécula, grupo de átomos o de moléculas (Albarrán-Zavala, 2008). Las reacciones de óxido reducción son importantes en procesos de meteorización o alteración de los minerales en el suelo y de las rocas que se originan, dando características específicas en cada tipo de suelo; así como, la función biológica que se pueda desarrollar (Ibáñez, 2008), además regulan el comportamiento de muchos compuestos químicos presentes en cuerpos de agua naturales. Procesos como la reactividad, solubilidad y movilidad cíclica de elementos esenciales para los sistemas biológicos (e.g. Fe, N, S, C, P y otros elementos metálicos) son afectados los cambios en el potencial redox. Así mismo, el potencial redox modifica la distribución y la actividad metabólica de los

microorganismos (<http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p2-redox.pdf>). Con referencia a lo anterior, se analizó las muestras de agua subterránea (Fig. 4.3) de los sitios en estudio, que tanto en época de lluvia como estiaje en el manantial de Buenavista el potencial rédox fue negativo.

No obstante, en arroyo Carrizal se monitorearon tres puntos, una fue monitoreada en época de lluvia y estiaje que disminuyó entre una época y otra se distinguió por tener ambos potenciales positivos; en el resto de los puntos (época de estiaje) el potencial también fue positivo. En Rincón de Parangueo se obtuvieron 3 muestras, una de ellas se monitoreo durante lluvia y estiaje, se observó que su potencial rédox va de positivo a negativo, (e.g. RiPa AL-05 112.9 mV y RiPa AE-12 -214.1 mV) las otras dos muestras pertenecen a la época de estiaje en donde se observan potenciales positivo y negativo.

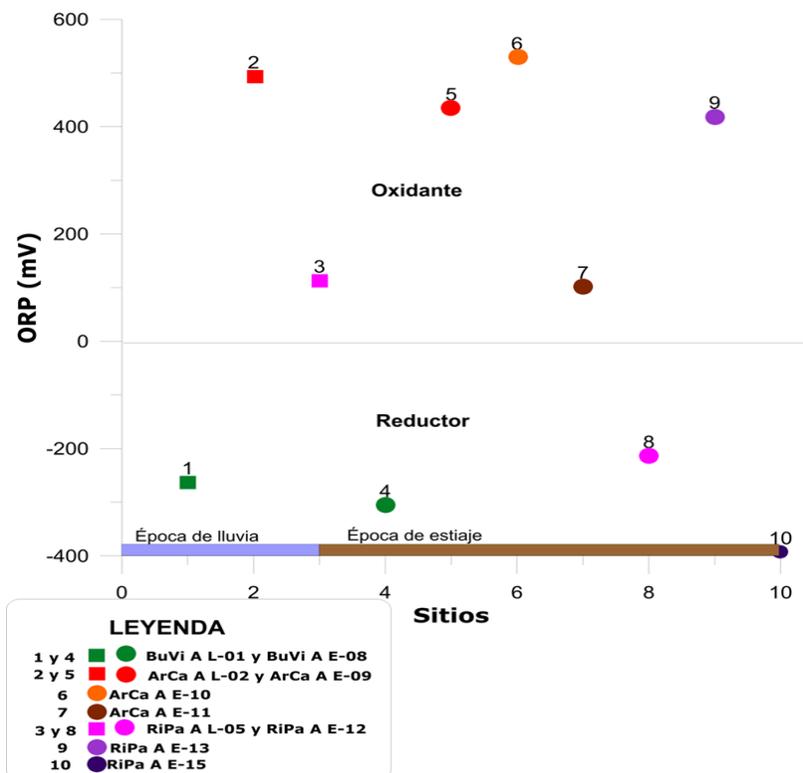


Figura 4.3. Ambientes extremos vs. ORP (mV) en Villa Juárez, San Luis Potosí y Rincón de Parangueo, Guanajuato.

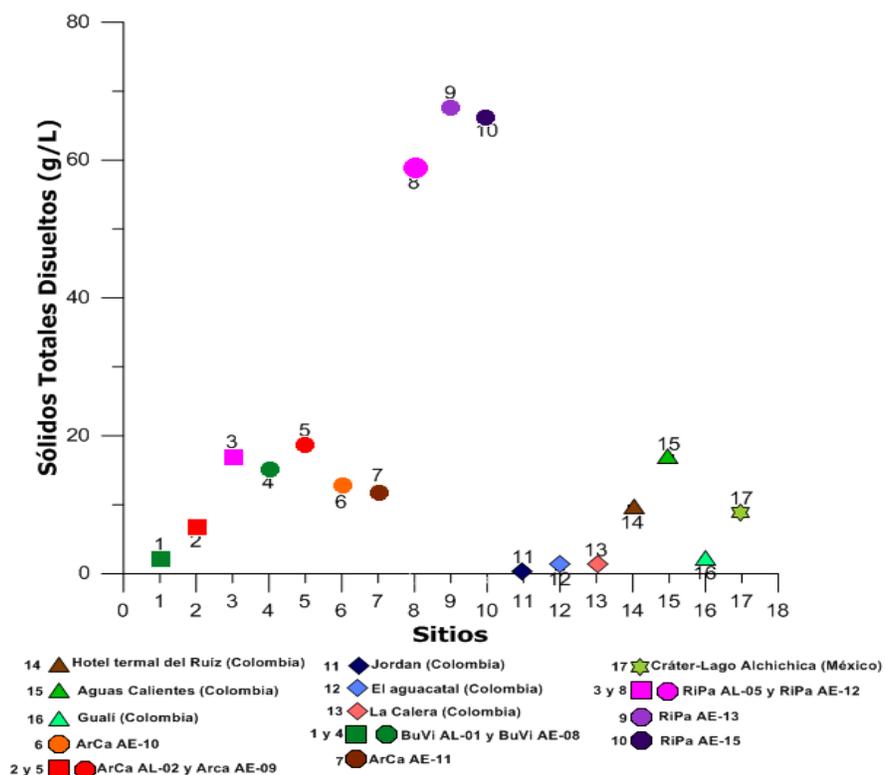


Figura 4.4. Ambientes Extremos y cantidad de sólidos totales disueltos (mg/L).

En cambio, el agua de procedencia natural puede transportar materiales de forma disuelta o sólida, aunque su separación no es definitiva (Elosegi *et al.*, 2009). Los sólidos totales disueltos describen la concentración total de minerales presentes en las aguas naturales, a la salinidad y a la concentración total de los componentes sólidos (Roldán-Pérez, 2003), son utilizados como un parámetro para conocer las relaciones edáficas y la productividad de un cuerpo de agua natural (Roldán-Pérez *et al.*, 2008) (Fig. 4.4). Los sólidos totales disueltos y la conductividad están estrechamente relacionados. Cuanto mayor sea la cantidad de sales disueltas en agua, mayor es el valor de la conductividad eléctrica. La temperatura del agua (°C) afecta a la conductividad eléctrica, aumentando de un 2 al 3 %. En Buenavista las muestras monitoreadas en época de lluvia y estiaje, indican que la cantidad de sólidos totales, aumentó en la segunda época en 15.13 mg/L. Cerca de arroyo Carrizal se observaron tres muestras, se analizó que la cantidad de sólidos totales incrementó de la época de lluvia a la de estiaje

(ArCaAL-02 6.613 mg/L ArCa-09 18.73 mg/L). Las otras dos muestras aunque son de época de estiaje tuvieron un contenido de sólidos totales ligeramente menor con aquél encontrado en las muestras monitoreadas en el primer muestreo y en la misma época. Respecto a Rincón de Parangueo existen tres muestras, una fue monitoreada en época de lluvia y estiaje, se apreció su aumento enormemente (RiPaAL-05 17.01 mg/L) y RiPaAE-12 58.6 mg/L) hacia la época de estiaje. Las otras dos muestras obtuvieron una concentración de sales elevada considerando que aunque las muestras están cercanas existen cambios evidentes (RiPa AE-13 67.69 mg/L y RiPa AE-15 66.17 mg/L).

Por otra parte, en otros sitios otros investigadores han reportado los siguientes resultados: “El Jordan” (Colombia) tuvo STD de 287 mg/Kg (Garzón-Valencia, 2001), “El Aguacatal” (Colombia) presentó STD de 1,082 mg/Kg (Garzón-Valencia, 2001), “La Calera” (Colombia) conservó STD de 1,321 mg/Kg (Garzón-Valencia, 2001).

Concerniente a, “Hotel termales de Ruiz” (Colombia) con STD de 9,310 mg/Kg (Garzón-Valencia, 2001), “Aguas Calientes” (Colombia) alcanzó STD de 16,712 mg/Kg (Garzón-Valencia, 2001), “Guali” (Colombia) obtuvo STD de 1,949 mg/Kg (Garzón-Valencia, 2001).

Referente al Cráter-Lago de Alchichica (México) obtuvo STD de 8,853 mg/L (Kazmierczak *et al.*, 2011).

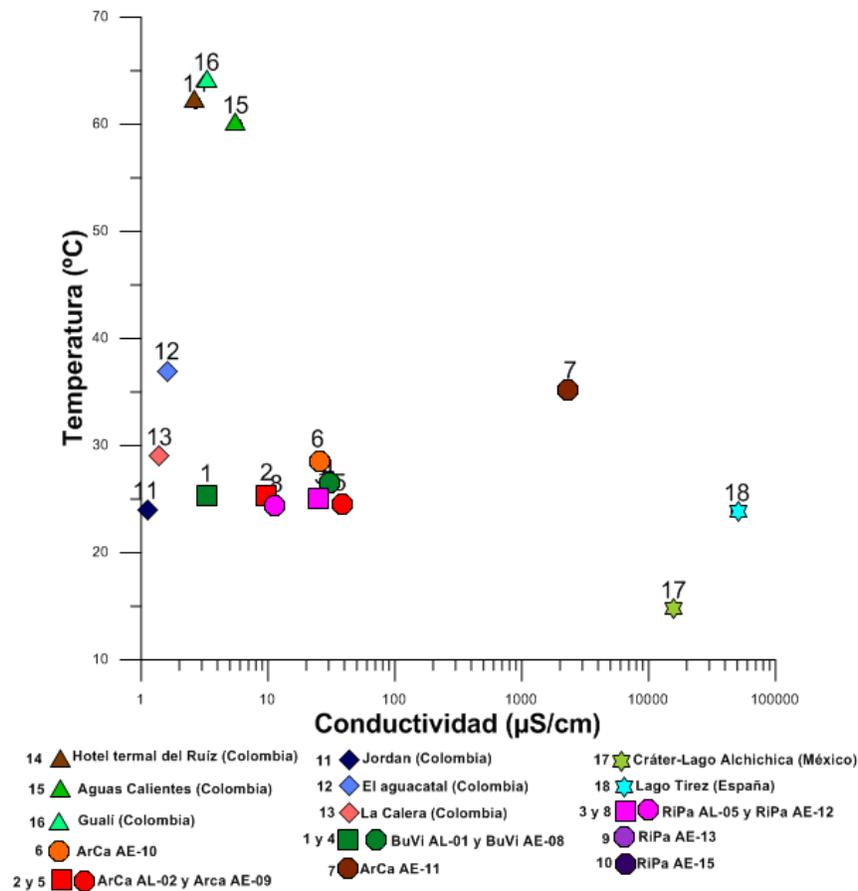


Figura 4.5. Conductividad $\mu\text{S/cm}$ vs. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) en sitios extremos.

La conductividad eléctrica (CE) es la capacidad que tiene una sustancia para conducir la corriente eléctrica y es inversamente proporcional a la resistencia. Mide la cantidad total de iones presentes en el agua, y por ende, se le relaciona con la salinidad (Roldán-Pérez, 2003). Es directamente proporcional con los sólidos totales disueltos. Tiene ciertos conductores iónicos y los acarreadores de electrones son los iones, por lo que se hace una transferencia de cargas a través de la masa, en el caso de sitios, el agua contiene la solución de sales disueltas, mientras que el suelo, sedimento, sales representan los conductores. Se aumentara la conductividad eléctrica si la temperatura aumenta. Por lo que al realizar el estudio de la conductividad, se podría hacer una relación indirecta por medio de los iones que se encuentran (iones mayoritarios). Un ejemplo de un agua dulce que pasa por un área granítica tendrá menor conductividad eléctrica por ser un material que no ioniza, mientras que un agua que provenga de aguas

con altas cantidades de sales será mayor su conductividad, a causa de la concentración de los iones (Fig. 4.5).

Con referencia al arroyo Carrizal tuvo una lectura de CE en época de lluvia de 9.835 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y en época de estiaje 37.2 $\mu\text{S}/\text{cm}$. En otros puntos del arroyo Carrizal se vio que en época de estiaje se obtuvieron resultados de 24.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 24.35 $\mu\text{S}/\text{cm}$. En cuanto al manantial de Buenavista en época de lluvia se tuvo registro de 3.301 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 30.2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en época de estiaje. En Rincón de Parangueo se obtuvieron resultados en época de lluvia de 26.37 $\mu\text{S}/\text{cm}$ mientras que en época de estiaje en esa muestra fue de 11.72 $\mu\text{S}/\text{cm}$, este resultado se debe a la disminución de la solución acuosa y al aumento de la evaporación en ese lugar. Otras muestras colectadas en época de estiaje no se lograron determinar su lectura, por la razón expuesta anteriormente, ya que además en esas zonas se observan láminas muy finas formadas por cristales o bien cristales en la superficie del sedimento.

Asimismo, ejemplos de otros sitios investigadores reportan como en “El Jordan” (Colombia) su CE es de 1.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Garzón-Valencia, 2001), “El Aguacatal” (Colombia) tiene 1.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Garzón-Valencia, 2001), “La Calera” (Colombia) obtuvo 1.4 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Garzón-Valencia, 2001).

En cuanto al “Hotel Termales del Ruiz” (Colombia) obtuvo una CE de 2.7 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Garzón-Valencia, 2001), “Aguas Calientes” (Colombia) tuvo 5.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (dilución de 10/100) (Garzón-Valencia, 2001), “Guali” (Colombia) obtuvo 3.3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Garzón-Valencia, 2001).

Referente al Cráter-Lago Alchichica tuvo una lectura de 15850 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Mancilla-Villa *et al.*, 2014), Lago Tirez 50,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ aproximadamente (García-Amilivia, 2009).

4.1.2 Clasificación del agua

El agua subterránea fue representada por los diagramas de Piper y Schoeller-Berkaloff para cada región.

Diagrama de Piper

El Diagrama de Piper sirve para clasificar el tipo de agua de las muestras analizadas: consta de dos triángulos equiláteros uno usado para aniones y el otro para cationes. En el centro se encuentra un diamante donde se ubica el tipo de agua que tiene la muestra en estudio (Martínez-Alfaro *et al.*, 2006).

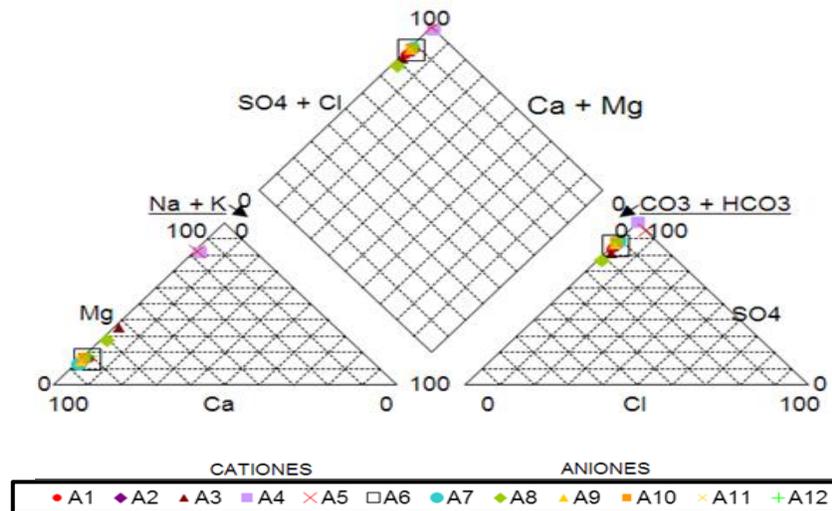


Figura 4.6. Diagrama de Piper en el sitio Villa Juárez. (A1: Manantial la cueva Ejido Villa Vista, A2: manantial Buenavista, A3: manantial Buenavista dos, A4: mina de Azufre Carrizal, A5: Carrizal, A6: noria Guaxcamá, A7: Agua de en medio, A8: Puerta del Río, A9: El Saus, A10: El Saus dos, A11: La Lagunita, A12: Las Pozas).

Se muestra en la parte superior del diamante una alta concentración de sulfatos, mientras en los cationes se notó una alta concentración de magnesio (muestras A4 y A5), clasificándose como sulfatadas magnésicas. En cambio, el resto de las muestras obtuvieron alta concentración de calcio, clasificándose como sulfatadas calcicas (Fig. 4.6).

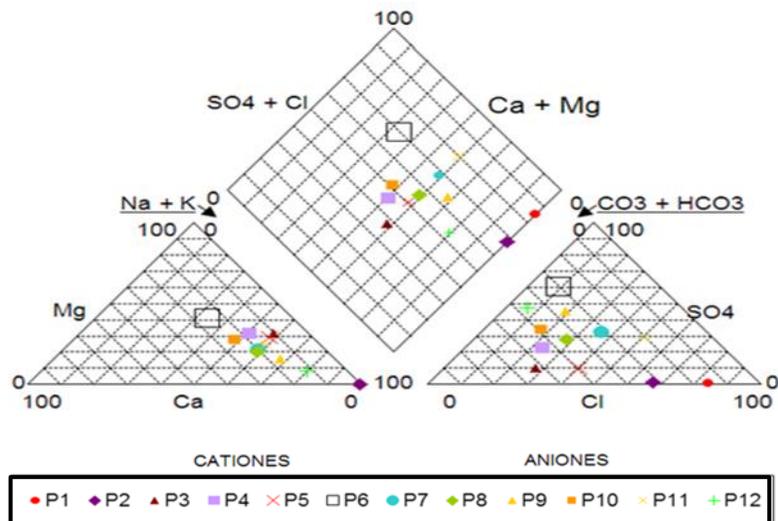


Figura 4.7. Diagrama de Piper en el sitio Valle de Santiago. (P1: Rincón de Parangueo lago uno, P2: Rincón de Parangueo lago dos, P3: Pozo Ojo de Agua, P4: Las Tinajas, P5: Pozo de agua potable, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12).

Las muestras P1 y P2 de Valle de Santiago obtuvieron altas concentraciones de cloruros observadas a la derecha parte inferior del diamante (círculo rojo y rombo morado), al mismo tiempo con una alta concentración de sodio y potasio, por tanto son aguas cloruradas sódica-potásica (Fig. 4.7). Las muestras restantes cercanas al lugar, son mixtas.

En cuanto a otros casos reportados por otros grupos de investigación como “El Jordan” (Colombia) estimaron aguas ligeramente bicarbonatadas (Garzón-Valencia, 2001), “El Aguacatal” (Colombia) incluyó aguas ligeramente bicarbonatadas (Garzón-Valencia, 2001), “La Calera” (Colombia) conservó aguas neutras bicarbonatadas sódicas (Garzón-Valencia, 2001).

Con referencia al “Hotel Termales del Ruiz” (Colombia) tuvo aguas ácidas sulfatadas (Garzón-Valencia, 2001), “Aguas Calientes” (Colombia) obtuvo aguas ácidas sulfatadas (Garzón-Valencia, 2001), “Guali” (Colombia) posee aguas ácidas sulfatadas cálcicas (Garzón-Valencia, 2001).

Respecto al Cráter-Lago de Alchichica se reportaron aguas bicarbonatadas magnésicas (Mancilla-Villa *et al.*, 2014), Lago Tirez localizaron aguas

bicarbonatadas cálcicas (Montoya *et al.*, 2013), el Lago Natrón incluyó aguas bicarbonatadas sódicas (Machorro, 2015).

Diagrama de Schoeller-Berkaloff

El diagrama de Schoeller-Berkaloff permite agrupar a las muestras según los iones mayoritarios. La gráfica consta del eje x que señala los iones mayoritarios (Ca^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^{2-}). En el eje y, en escala logarítmica presenta la concentración (meq/L) (Martínez-Alfaro *et al.*, 2006).

En Villa Juarez, las muestras A4 y A5 predominan sulfatos y no tienen alcalinidad, por lo tanto es sulfatada (Fig. 4.8). Las muestras restantes tienen alta concentración de sulfatos y altas en calcio y magnesio por lo tanto son sulfatadas cálcicas-magnésicas.

En Rincon de Parangueo, en la muestra P1 y P2 predominan los iones cloruro y sodio por lo que el agua es clorurada sódica (Fig. 4.9). El resto de las muestras son bicarbonatadas sódicas, en un sitio fue sulfatado sódico.

Diagrama de Mifflin

El diagrama de Mifflin está proyectando en escala logarítmica, en el eje x se encuentran los aniones $\text{Cl}^- + \text{SO}_4^{2-}$ (meq/L) y en el eje y tengo $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ (meq/L). Es conveniente aclarar que va de un flujo local, flujo intermedio y flujo regional. En el sitio de Villa Juárez se analizó que la muestra 4 se encontró dentro del flujo regional, mientras que en la muestra 5 se localizó en el flujo intermedio (Fig. 4.10). El resto de las muestras se encontraron entre el flujo local e Intermedio, excepto una que está dentro del flujo regional.

Con referencia al diagrama de Mifflin (que va de un flujo local, flujo intermedio y flujo regional) las muestras 1 y 2 de Valle de Santiago estuvieron dentro del flujo

regional. El resto de las muestras se encontraron entre el flujo local e intermedio (Fig. 4.11).

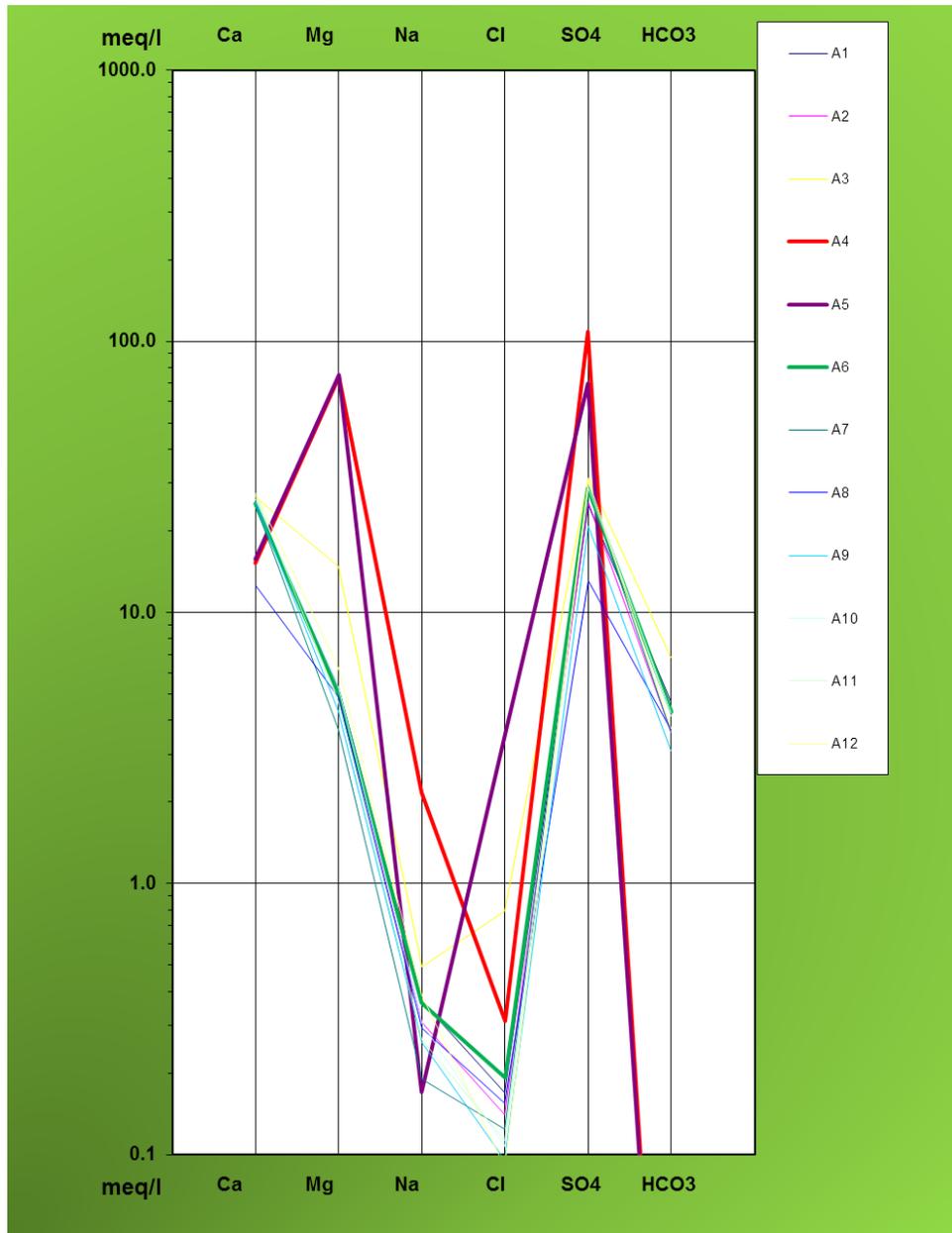


Figura 4.8. Diagrama de Schoeller- Berkaloff en el sitio Villa Juárez. (A1: Manantial la cueva Ejido Villa Vista, A2: manantial Buenavista, A3: manantial Buenavista dos, A4: mina de Azufre Carrizal, A5: Carrizal, A6: noria Guaxcamá, A7: Agua de en medio, A8: Puerta del Rio, A9: El Sauz, A10: El Sauz dos, A11: La Lagunita, A12: Las Pozas).

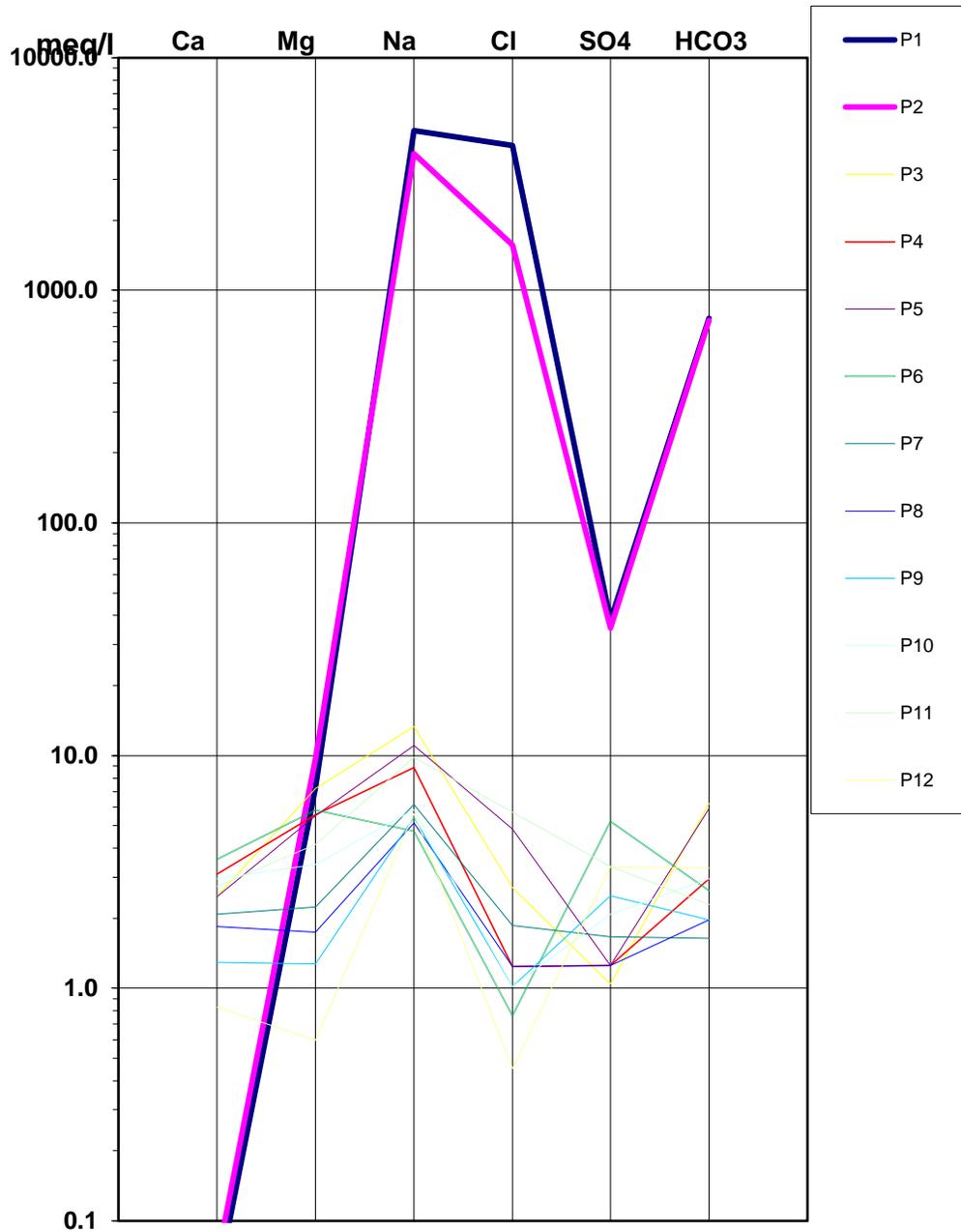


Figura 4.9. Diagrama de Schoeller- Berkaloff constituido con las muestras del Valle de Santiago. (P1: Rincón de Parangueo lago uno, P2: Rincón de Parangueo lago dos, P3: Pozo Ojo de Agua, P4: Las Tinajas, P5: Pozo de agua potable, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12).

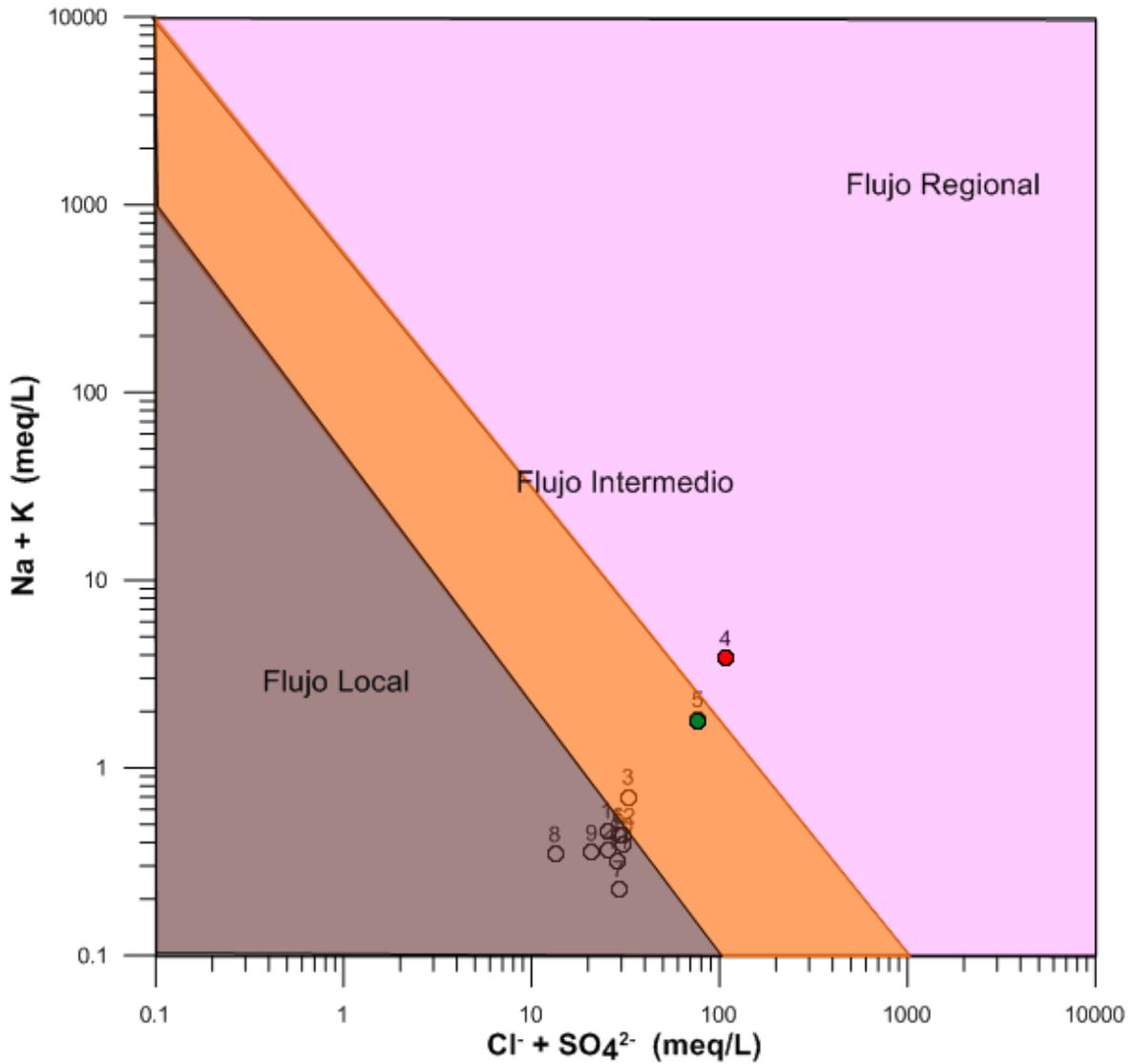


Figura 4.10. Diagrama de Mifflin en el sitio de Villa Juárez. (1: Manantial la Cueva Ejido Villa Vista, 2: manantial Buenavista, 3: manantial Buenavista dos, 4: mina de Azufre Carrizal, 5: Carrizal, 6: noria Guaxcamá, 7: Agua de en medio, 8: Puerta del Rio, 9: El Saus, 10: El Saus dos, 11: La Lagunita, 12: Las Pozas).

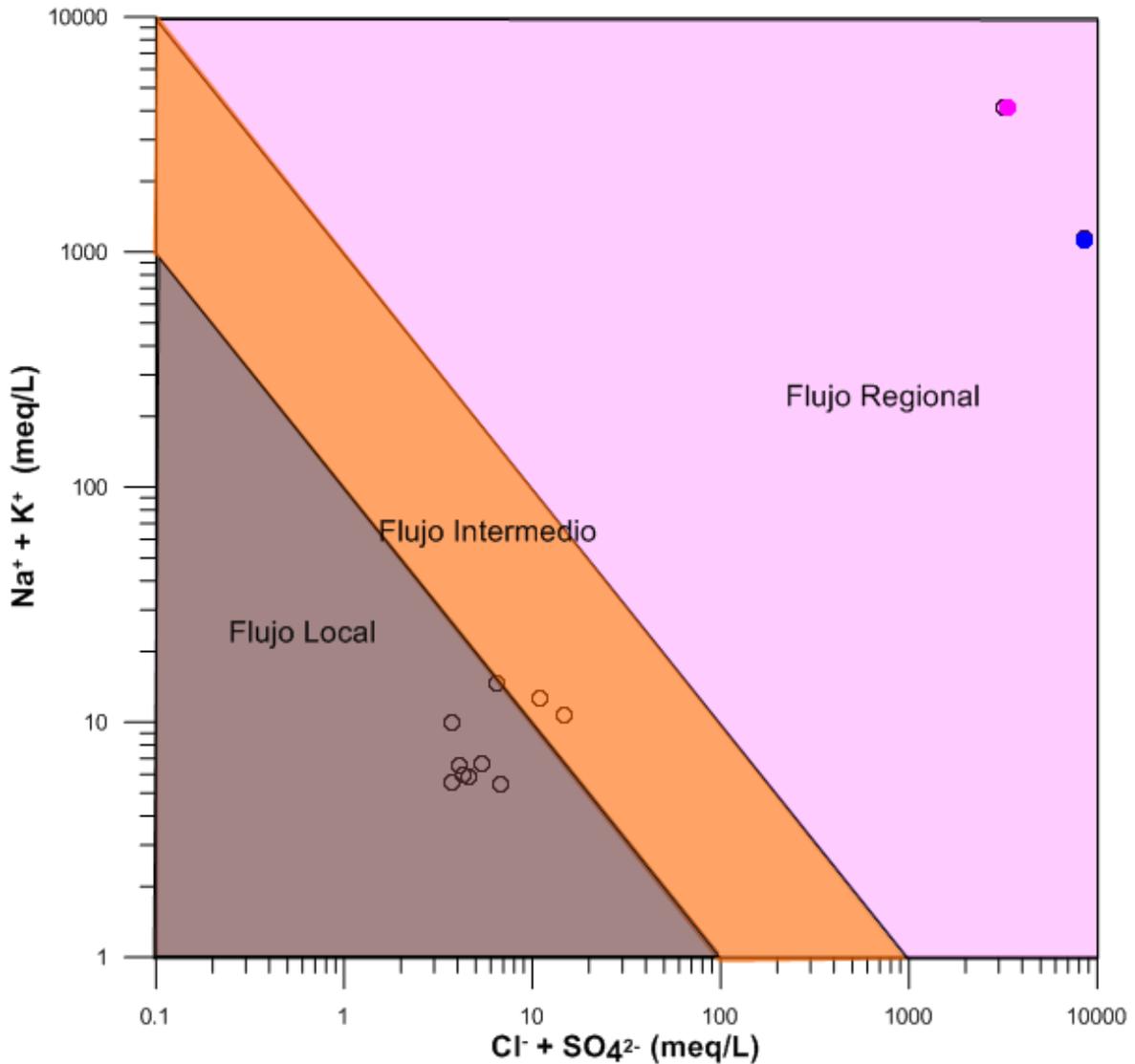


Figura 4.11. Diagrama de Mifflin en Rincón de Paranguero. (1: Rincón de Paranguero lago uno, 2: Rincón de Paranguero lago dos, 3: Pozo Ojo de Agua, 4: Las tinajas, 5: Pozo de agua potable, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

4.1.3 Procesos Evolutivos

a) El diagrama de Gibbs de cationes es una gráfica en donde se encuentran Na⁺/ (Na⁺+Ca²⁺) en el eje x y sólidos totales disueltos (STD) en el eje y. En la parte superior se ubica la evaporización, en la parte intermedia esta la interacción agua-roca y en la parte inferior la precipitación atmosférica. Referente a Villa Juárez las muestras 4 y 5 se observaron con una baja evaporación e interacción agua-roca

(Fig. 4.12a). El resto de las muestras se encontraron dentro de ese rango de evaporación, excepto una de ellas (muestra 11) que se relaciona con la precipitación o lluvias.

b) El diagrama de Gibbs de aniones se ubican los aniones $\text{Cl}^- / (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^{2-})$ en x y se encuentran los sólidos totales disueltos. Las muestras 4 y 5 se observó poca evaporación e interacción de agua-roca (Fig. 4.12b). El resto de las muestras se encuentran dentro de ese rango entre poca evaporación e interacción agua-roca.

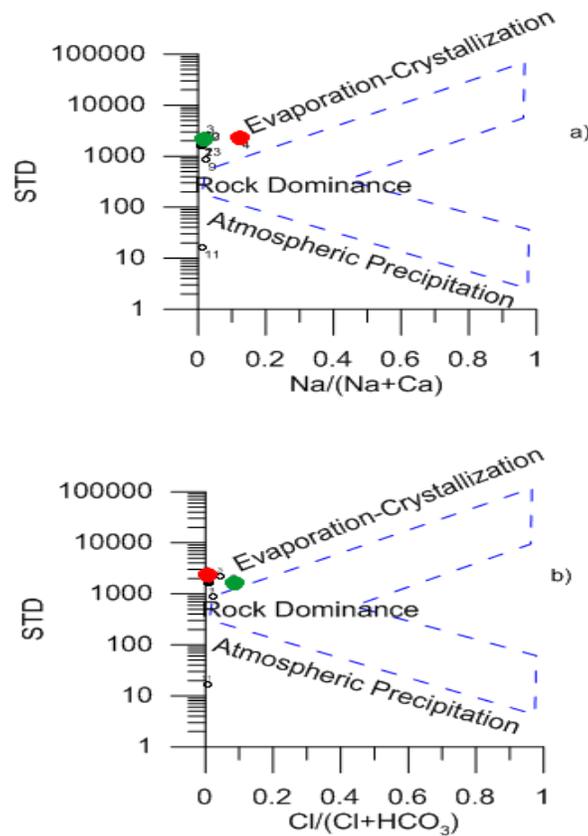


Figura 4.12. a) Diagrama de Gibbs de $\text{Na}^+ / (\text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+})$ vs. sólidos totales disueltos. Y b) Diagrama de Gibbs de $\text{Cl}^- / (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^{2-})$ vs. sólidos totales disueltos en el sitio de Villa Juárez. (1: Manantial la cueva Ejido Villa Vista, 2: manantial Buenavista, 3: manantial Buenavista dos, 4: mina de Azufre Carrizal, 5: Carrizal, 6: noria Guaxcamá, 7: Agua de en medio, 8: Puerta del Rio, 9: El Saus, 10: El Saus dos, 11: La Lagunita, 12: Las Pozas).

a) El diagrama de Gibbs de los cationes $\text{Na}^+ / (\text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+})$ provenientes de las muestras 1 y 2 del Rincón de Paranguero demostraron una alta evaporación. El

resto de las muestras se evaporan en menor proporción e indicaron una interacción agua-roca (Fig. 4.13a).

b) El diagrama de Gibbs de aniones $\text{Cl}^- / (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^{2-})$ las muestras 1 y 2 denotan baja evaporación e interacción agua-roca. El resto de las muestras se encontraron dentro de ese rango o inclusive mayor en la evaporación, asimismo indicaron una mayor concentración interacción roca-agua. No obstante, una de las muestras se presentó dentro del rango de precipitación atmosférica. (Fig. 4.13b).

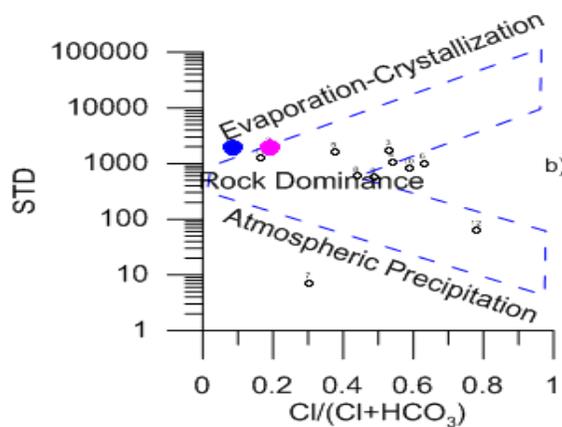
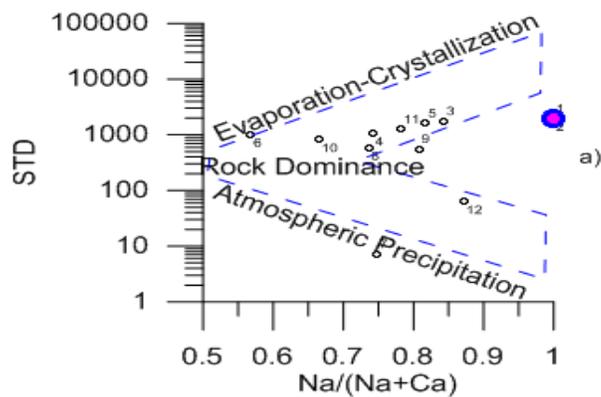


Figura 4.13. a) Diagrama de Gibbs de $\text{Na}/(\text{Na}+\text{Ca})$ vs sólidos totales disueltos y b) Diagrama de Gibbs de $\text{Cl}/(\text{Cl}+\text{HCO}_3)$ vs sólidos totales disueltos en Rincón de Paranguero. (1: Rincón de Paranguero lago uno, 2: Rincón de Paranguero lago dos, 3: Pozo Ojo de Agua, 4: Las Tinajas, 5: Pozo de agua potable, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

4.1.4 Diagrama de Dispersión

Debido a que las aguas dan origen a la dilución de sustancias y sales en su propia atmósfera, luego en el suelo, y posteriormente en el subsuelo, sufren modificaciones (Pulido-Bosch, 2014). Por ello, a continuación se muestran las gráficas de la Figura 4.14, que describen la dispersión considerando diferentes parámetros en Villa Juárez. En la gráfica a) se encuentra el cloruro vs. boro (meq/L), la muestra 4 corresponde al arroyo Carrizal, se distinguió de las demás por tener una mayor concentración del boro y baja concentración en el cloruro. Mientras la muestra 6 en el manantial de Buenavista, se reconoció por tener una mayor concentración del cloruro y ser escasa en el boro. En el resto de las muestras se notó muy limitada la cantidad del boro y el cloruro.

En la Figura 4.14b), se graficó calcio vs. cloruro (meq/L). La muestra 4 del arroyo Carrizal se identificó por tener una menor concentración del cloruro y una pequeña concentración de calcio. La muestra 6 de Buenavista se caracterizó por tener una mayor cantidad del cloruro y una escasa cantidad del calcio. El resto de las muestras tuvieron altas concentraciones en el calcio y bajas en el cloruro.

En la 4.14c) se tiene cloruro vs. bicarbonato (meq/L). La muestra 4 se distinguió por tener una baja concentración en el cloruro y nula en el bicarbonato, por el contrario la muestra 6 conservó una mayor concentración del cloruro y ninguna en el bicarbonato. Para el resto de las muestras presentaron una importante concentración del bicarbonato y bajas en el cloruro.

En la 4.14d) se observa CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$) vs. sulfato (meq/L). La muestra 4 se separa del resto por presentar alta conductividad eléctrica y tener alta concentración del sulfato. Sin embargo, la muestra 6 fue alta en el sulfato y menor CE. La conductividad eléctrica fue más alta en la muestra 4 que en la muestra 6. El remanente de las muestras tuvo una menor cantidad del sulfato y baja en la conductividad eléctrica.

La Figura 4.14e) se tiene el calcio vs. magnesio (meq/L). Tanto las muestras 4 y 6 tuvieron concentraciones altas del magnesio, sin embargo fueron bajas en el

calcio. El resto de las muestras retuvieron una mayor cantidad del calcio y bajas en el magnesio. La muestra 9 fue baja en calcio y magnesio.

En general, las Figuras, muestran que el agua de arroyo Carrizal y Buenavista se distinguen como aguas anómalas o exóticas dentro del sistema hidrogeológico de Villa Juárez.

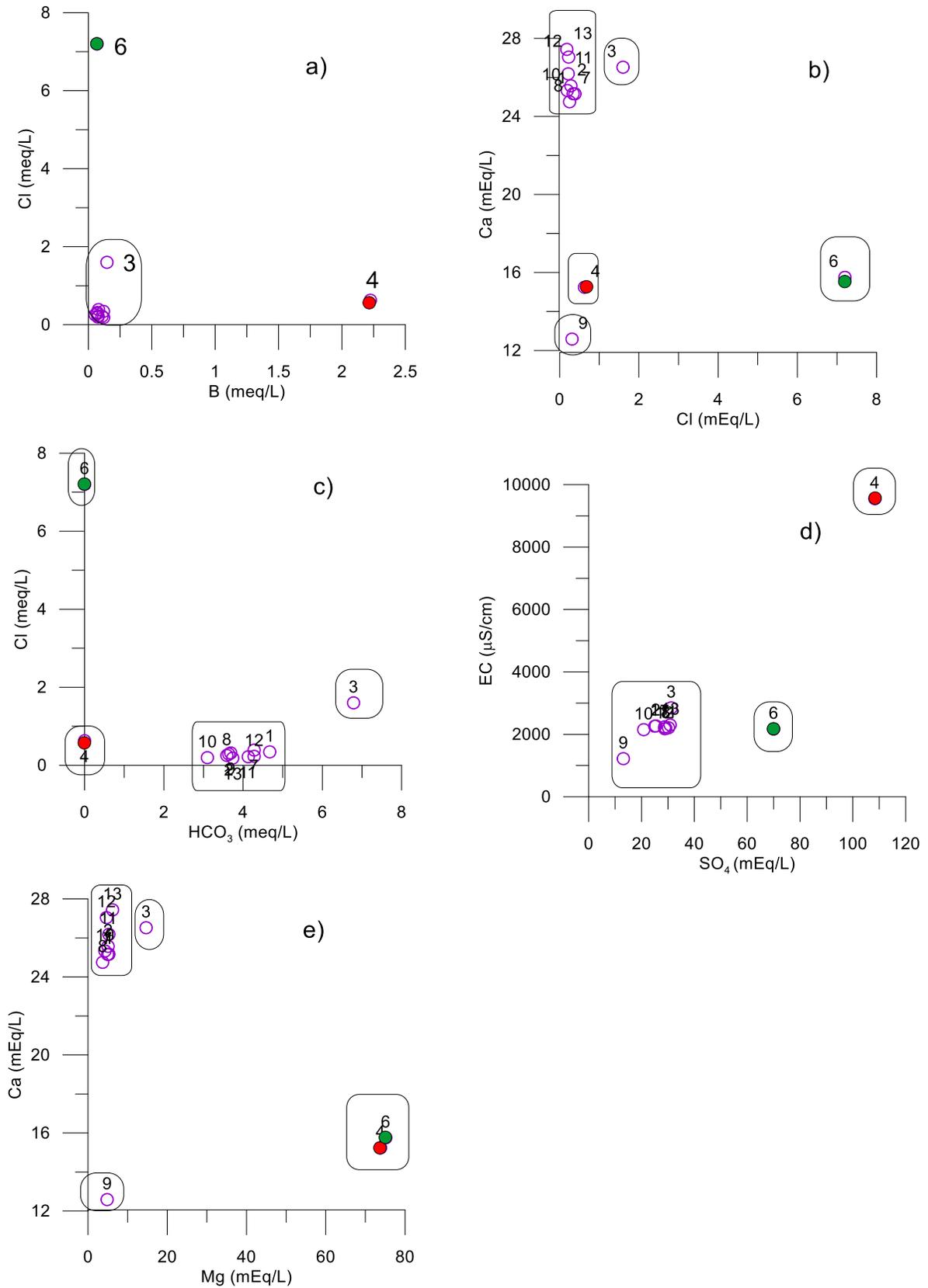


Figura 4.14. Gráficas de dispersión del sitio Villa Juárez.

Las gráficas de la Figura 4.15, describen la dispersión considerando diferentes parámetros en Rincón de Parangueo. En la Figura 4.15a), se encuentra el cloruro vs. boro (meq/L), la muestra 1 tuvo una mayor concentración del cloruro, y nula en el boro. No obstante, la muestra 2 conservó una menor concentración del cloruro y nula en el boro. El resto de las muestras se estimaron desde una pequeña a una gran cantidad del boro y limitada en el cloruro.

En la Figura 4.15b), se graficó el calcio vs. cloruro (meq/L), la muestra 1 presentó una mayor concentración del cloruro y muy baja concentración del calcio. En la muestra 2, se estimó una menor cantidad del cloruro y una depreciación en la cantidad del calcio. El resto de las muestras, conservaron una mayor concentración del calcio y una disminución en la concentración de cloruro.

En la Figura 4.15c), se tiene el cloruro vs. bicarbonato (meq/L). La muestra 1 se le consideró una concentración alta en el cloruro y bicarbonato, por el contrario la muestra 2 conservó una reducida concentración del cloruro y alta en el bicarbonato. Las muestras restantes presentaron muy baja concentración del cloruro y bicarbonato.

En la Figura 4.15d) se analiza CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$) vs. sulfato (meq/L), con referencia a las muestras 1 y 2 presentaron una cantidad importante del sulfato y conductividad eléctrica, el resto de las muestras obtuvieron una cantidad mínima del sulfato y conductividad eléctrica.

La Figura 4.15e) se compara el calcio vs. magnesio (meq/L), concerniente a la muestra 2 obtuvo una mayor concentración del magnesio y fue muy limitado en el calcio. La muestra 1 tiene una concentración menor de magnesio, y muy bajo en concentración de calcio. Asimismo, el resto de las muestras en su concentración de estos dos iones fueron proporcionales.

La Figura 4.15f) se observa el bicarbonato vs. STD (mg/L), en cuanto a las muestras 1 y 2 posee altas concentraciones de estos componentes. El resto de las muestras, es baja concentración del bicarbonato y es variable en STD. Por estas condiciones, la localidad del Rincón de Parangueo en el Estado de Guanajuato es

clasificada como alcalófilo y halófilo, debido a las concentraciones tan altas de alcalinidad y solutos.

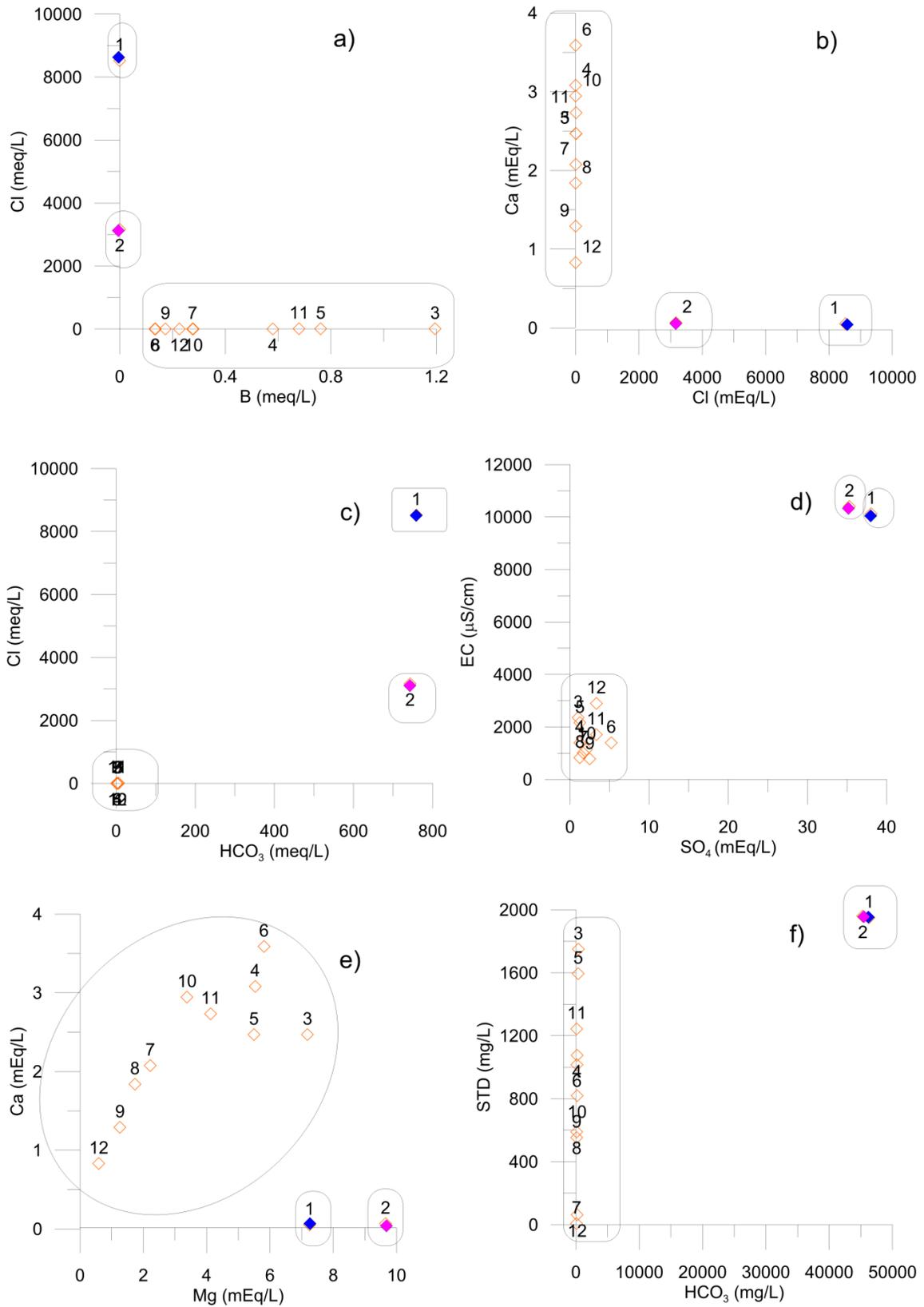


Figura. 4.15. Gráficas de dispersión del Rincón de Parangueo.

4.1.5 Análisis experimental

El carbono y el nitrógeno son indispensables para la vida. En procariontes se ha observado que dominan en gran cantidad los elementos citados, además considerando a los animales domésticos, aumenta la cantidad de carbono.

Diversos autores argumentan que la relación de nitrógeno y materia orgánica, influye por la lluvia, temperatura, el contenido de arcilla sobre los contenidos de materia orgánica, el nitrógeno orgánico del suelo. El factor principal importante en la relación del contenido de materia y del nitrógeno orgánico es la precipitación, le siguen en menor trascendencia la altitud y el contenido de arcilla.

En el presente estudio se utilizaron 7 muestras que fueron duplicas o triplicadas, 4 del sitio Villa Juárez y 3 del sitio Rincón Parangueo, Guanajuato, (Fig. 4.16). Como se puede ver en la gráfica, existe muy buena correlación entre C:N en ambas regiones, teniendo mayor contenido de C y N en la muestras del Rincón Parangueo, Guanajuato.

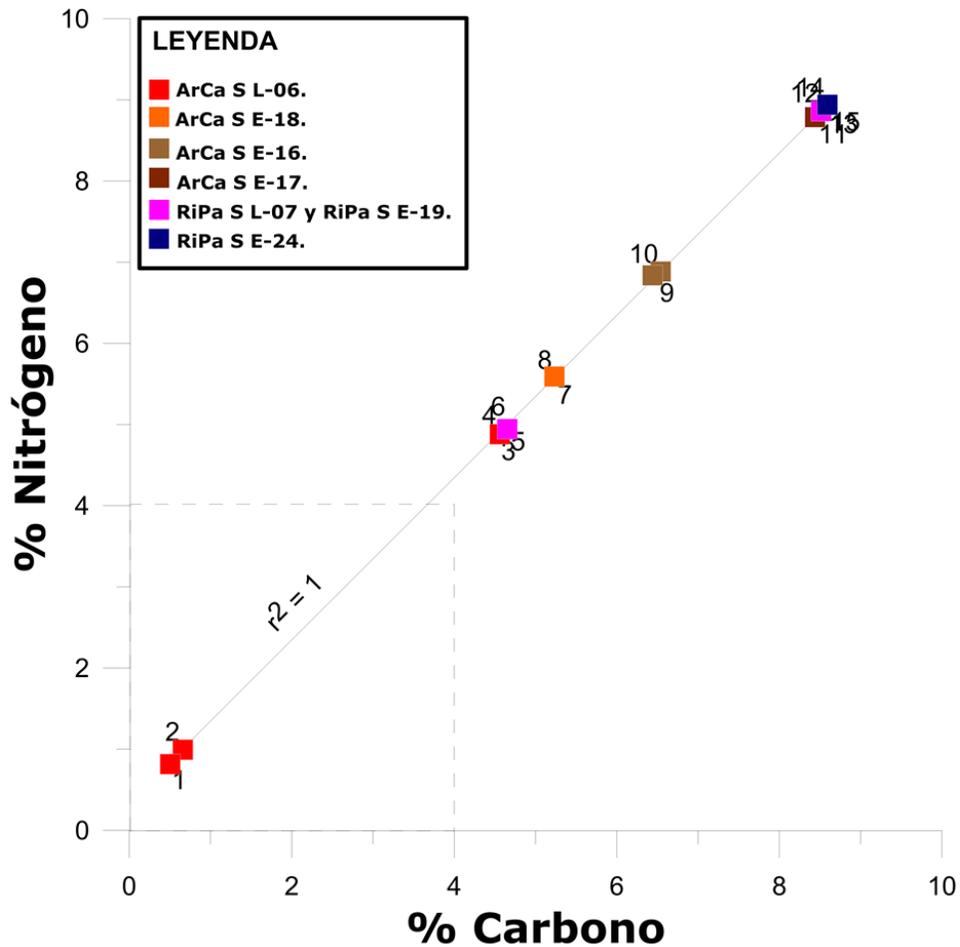


Figura 4.16. Correlación de carbono:nitrógeno en sitios Villa Juárez y Rincón de Paranguero.

En sitios con una relación baja de C:N, prevalece una microdiversidad restringida, como en los sitios 1 y 2 de arroyo Carrizal, no obstante en ambientes con una relación alta de C:N, persevera una mayor diversidad microbiana como en el Rincón de Paranguero. También, cuando la relación de carbono y nitrógeno es mayor, otra causa es la entrada de materia orgánica fresca depositada en la superficie del suelo, o agua que originan o generan más procesos orgánicos. Cuando la materia orgánica por la fuerza de gravedad baja, beneficia a organismos mientras migra de forma vertical. Además, se produce entre cada capa un fraccionamiento diferencial, así caracterizando sus propiedades que pueden o no conservarse (Redfield *et al.*, 1960). Esos componentes son disueltos y son transportados por advección.

Los procesos microbiológicos que se llevan a cabo en el suelo pueden estar sujetos a la temperatura, precipitación, condiciones físicas y la relación carbono-nitrógeno que intervienen en la constitución de la materia orgánica. El calcio es un elemento importante que proporciona estabilidad a las sustancias húmicas. En Rincón de Parangueo existen condiciones naturales que favorecen de manera importante la generación materia orgánica, aunque debido a las actividades del hombre han generado contaminación al sitio como se describe en los resultados de espectrometría de fluorescencia más adelante.

4.1.6 Espectrofometría de Fluorescencia 3D

Para el análisis de los resultados, depende la ubicación, condiciones ambientales dentro y fuera del flujo subterráneo, suelo u otra muestra en estudio. No hay muchos reportes en agua dulce examinadas por este tipo de técnica. Por otro lado, sus resultados se le relacionan con la velocidad de flujo, el impacto de humedecimiento y secado en la tierra, pH, son los adecuados para el proceso de humificación con lo que favorece una ágil mineralización (Zamboni *et al.*, 2006).

Para el siguiente estudio se consideraron 19 muestras divididas en: 11 muestras de aguas (3 de época de lluvia, 8 de época de estiaje), 6 sedimentos (2 de época de lluvia y 4 de época de estiaje) y 2 muestras que no se clasifican como agua o sedimento, colectadas en época estiaje (Tabla 4.1). En la Tabla 4.1 se observa que el manantial de Buenavista en época de lluvia (01), fue afectado por contaminación antropogénica, en tanto que el agua de arroyo Carrizal y Rincón de Parangueo (02 y 05) tuvieron materia orgánica de origen natural. Las muestras 06 y 07 corresponden a sedimento en época de lluvia, la muestra 06 no fue posible determinar la materia orgánica, no obstante en la muestra 07 se le determinó materia orgánica de origen natural. Las muestras 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15 representan muestras de agua en época de estiaje, la muestra 08 fue afectada por materia orgánica de origen antropogénico, las muestras 09, 10, 11, 13, 14 y 15 tienen materia orgánica natural, en tanto que, la muestra 12 presentó materia orgánica natural y antropogénica. Las muestras 16, 17, 18 y 19 representaron

sedimentos en época de estiaje, las tres primeras contiene materia orgánica natural, mientras que la muestra 18 tiene ácidos húmicos de origen natural y las proteínas de origen antropogénico. La muestra 24 corresponde al estromatolito, en el cual la materia orgánica identificada fue de origen antropogénico. La muestra 25 correspondiente a época de estiaje, se determinó materia orgánica de tipo natural y antropogénica. Posteriormente, se indica un análisis para la muestra de agua en Rincón de Parangueo para la temporada de lluvia. En la figura se observa un pico entre las longitudes de onda λ_{em} 400-430 y λ_{exc} 200-240, que corresponde a ácidos fúlvicos en la materia orgánica natural (Fig. 4.17).

Tabla 4.1. Resultados de muestras de agua, sedimentos y 2 muestras diferentes con el método de espectrofotometría de fluorescencia 3D.

Nombre de la muestra	Descripción	Resultado final
BuVi A L-01	Tirosina y proteínas.	Materia orgánica de origen antropogénico.
ArCa A L-02	Ácidos húmicos, ácidos fúlvicos.	Materia orgánica natural.
RiPa A L-05	Ácidos fúlvicos.	Materia orgánica natural.
ArCa S L-06	Ningún pico definido.	No se distingue pico.
RiPa S L-07	Ácidos húmicos, ácidos fúlvicos.	Materia orgánica natural.
BuVi A E-08	Proteínas aromáticas tipo I.	Materia orgánica de origen antropogénico.
ArCa A E-09	Ácidos húmicos, ácidos fúlvicos	Materia orgánica natural.
RiPa A E-12	Ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, productos microbiales, Proteínas aromáticas tipo II.	Materia orgánica natural y de posible origen antropogénico.
ArCa A E-10	Ácidos húmicos, ácidos fúlvicos.	Materia orgánica natural.
ArCa A E-11	Ácidos húmicos, ácidos fúlvicos.	Materia orgánica natural.
RiPa A E-13	Ácidos fúlvicos.	Materia orgánica natural.
RiPa A E-14	Ácidos húmicos.	Materia orgánica natural.
RiPa A E-15	Ácidos húmicos, ácidos fúlvicos.	Materia orgánica natural.
ArCa S E-16	Ácidos húmicos y ácidos fulvicos.	Materia orgánica natural.
ArCa S E-17	Ácidos húmicos y ácidos fulvicos.	Materia orgánica natural.
ArCa S E-18	Ácidos húmicos y proteínas aromáticas.	Ácidos húmicos de origen natural y las proteínas de origen antropogénico.
RiPa S E-19	Ácidos fúlvicos.	Materia orgánica natural.
BuVi 0 E-25	Ácidos húmicos, ácidos	Materia orgánica de origen

	fúlvicos, proteínas y triptófano.	natural y antropogénico.
RiPa O E-24	Proteínas aromáticas tipo II.	Materia orgánica de origen antropogénico.

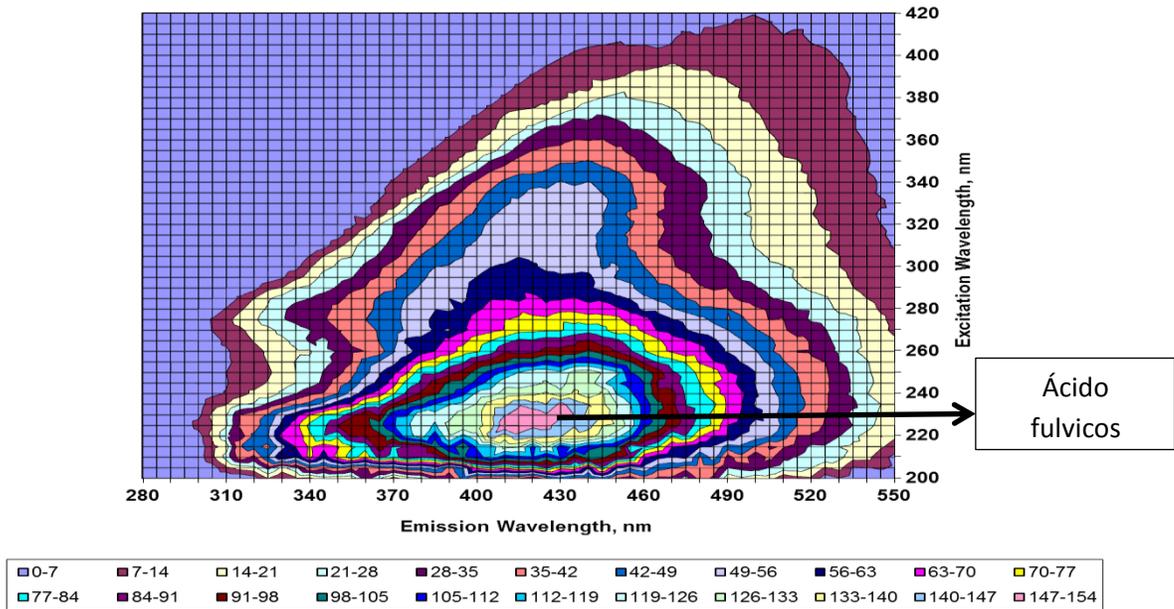
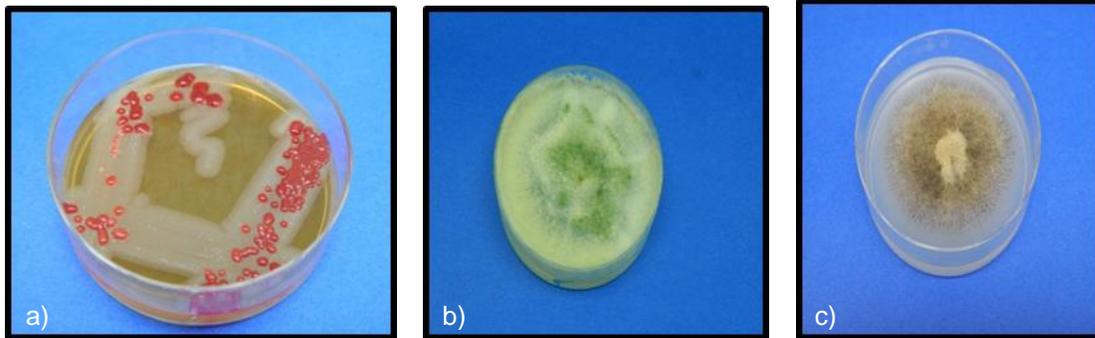


Figura 4.17. Muestra RiPa AL-05 muestra de agua verde, en época de lluvia.

4.2.1 Microbiología

Los métodos tradicionales microbiológicos empleados para tipificar microorganismos, tienen la desventaja de utilizar más tiempo para obtener resultados y solo el 1% de la población de sitio muestreado se logra aislar y conserva en medios sintéticos para su estudio; lo cual representa una cantidad mínima microorganismos identificados en una muestra, y además es necesario realizar muchas pruebas para encontrar el medio de cultivo adecuado para cada sitio en particular. En las Figuras 4.18, y 4.20 se muestran pruebas de cultivo de moos *in vitro*, en donde se al tratar de usar métodos moleculares no se logró extraer su ADN. Solo la Figura 4.19 es una de las muestras en donde si se obtuvieron resultados con técnicas de biología molecular. Con esto queremos demostrar que en algunos casos los métodos de microbiología convencional

siguen ofertando alternativas para observar ciertas colonias como bacterias, hongos y microalgas.



BuVi OE-22

ArCa AL-02

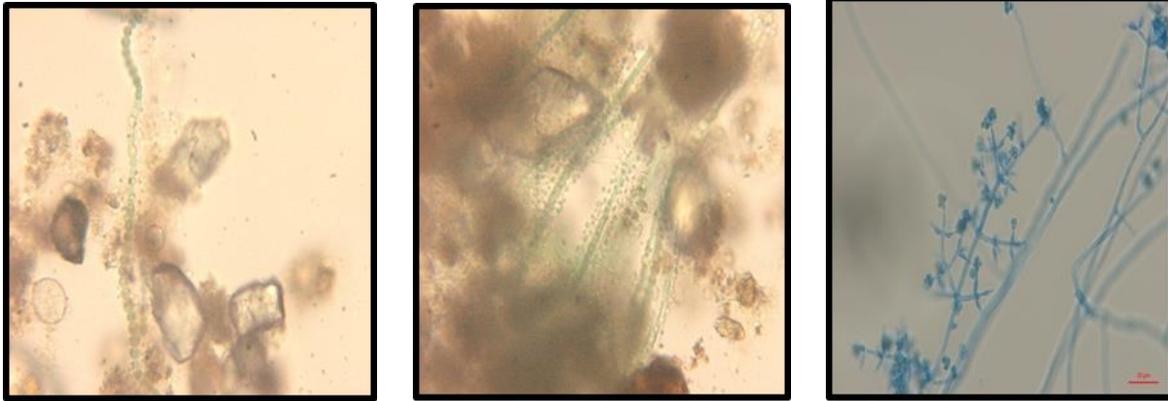
ArCa AE-11

Figura 4.18. Microorganismos detectados en medios sintéticos. a) bacteria proveniente de organismo pegado a una roca, b) hongo proveniente de agua de la pared, c) muestra de agua blanca, la cual es la excepción en esta serie de fotos, pues si se logró detectar por métodos de biología molecular.

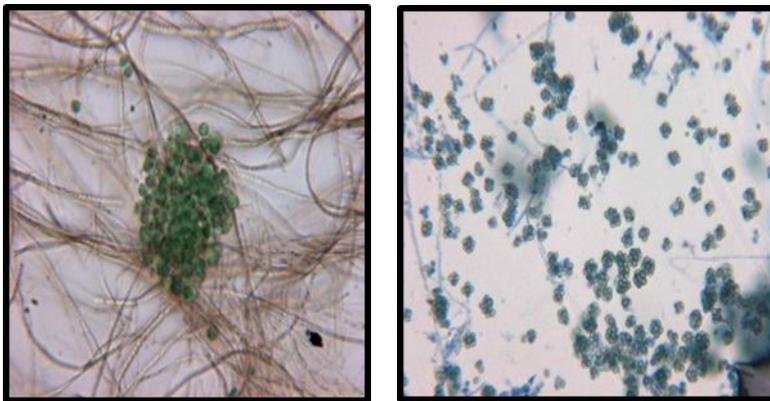


RiPa SE-23

Figura 4.19. Bacteria proveniente de sedimento verde.



a) ArCa SL-06. (40x)



b) ArCa AE-09 (40x)

Figura 4.20. a) Muestra de sedimento, b) muestra de agua de pared.

En La Figura 4.20 a) se observan especies de cianobacterias (filamentosas o unicelulares) y hongos representativos de sedimentos colectados en la temporada de lluvias, localizados cerca del flujo de agua ácida, su importancia es mostrar fotografías de la riqueza de especies que existen en ese tipo de sitios, además que son pocos los reportes donde se muestra la micromorfología. Las cianobacterias filamentosas pueden formar heterocistos involucrados en la fijación de N_2 .

La Figura 4.20 b) contiene una cianobacteria unicelular (a la izquierda), aislada en época de estiaje ubicada en la pared donde emerge agua subterránea muy ácida [han reportado hasta un pH de 0.8 en otras temporadas (Grupo del Dr. Ramos-Leal)]. Se sabe que las cianobacterias hacen simbiosis con hongos como

Trichoderma sp (foto ubicada a la derecha), también aislada en época de estiaje, puede ser utilizado en biorremediación considerando que se desarrolla con parámetros fisicoquímicos extremos.

Los hongos son microorganismos saprobios que pueden ser capaces de crear líquenes en simbiosis con un alga. Pueden producir ácidos orgánicos, que pueden contribuir a la disolución y la formación de nuevos cristales, como oxalatos y carbonatos. Los hongos pueden contribuir a la acumulación de hierro y manganeso, como barniz del desierto y juegan un papel importante en el ciclo del calcio dentro calcrates y suelos de carbonato en las zonas áridas (Riding, *et al.* 2010). En el arroyo Carrizal y su trayecto se puede encontrar zonas rojas que demuestran lo citado anteriormente, y se infiere la presencia de hongos, además se sabe oxidan fierro. Un ejemplo del mineral que pueden formar los hongos imperfectos es la calcita.

4.2.2 Biología molecular

4.2.2.1 Resultados de métodos de extracción

Definir el método de extracción adecuado en muestras ambientales es fundamental para el estudio molecular en consorcios microbianos ya que los organismos que crecen en condiciones extremas por naturaleza pueden resistir tratamientos para ruptura de pared y es difícil extraer los ácidos nucleicos. Además, los suelos o sedimentos por lo regular traen una alta concentración de materia orgánica (ácidos húmicos y fúlvicos *e.g.*) y minerales capaces de inhibir enzimas como la *Taq polimerasa* y los métodos de dilución son una alternativa; no obstante las muestras de aguas que contienen algún contaminante será necesario aumentar la biomasa para realizar su extracción (Purdy, 2005).

Se analizaron 25 muestras entre dos épocas (lluvia y estiaje), en 7 de ellas se extrajo ADN genómico con el método adaptado de Gómez-Rodríguez (2007) y 7 con el método adoptado por Hernández-Rico (2004). Del resto de las muestras no

se logró extraer ADN genómico, posiblemente debido a una coprecipitación del ADN con contaminantes (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Métodos de extracción de ADN que funcionaron para las diversas muestras listadas y géneros detectados por métodos moleculares.

	Clave	Método adaptado por Gómez-Rodríguez.	Método adaptado por Hernández-Rico.
1	BuVi A L-01	X	X
2	ArCa A L-02	X	X
3	ArCa A L-03	X	X
4	Ar Ca A L-04	ArCaA5L <i>Hydrogenophaga</i>	X
5	RiPa A L-05	X	RiPa A 13 L <i>Nitriliruptor</i> RiPa A 25 L <i>Alterococcus</i> RiPa A 26 L <i>Hylemonella</i>
6	ArCa S L-06	X	X
7	RiPa S L-07	X	RiPa S 9 L <i>Rubribacterium</i> RiPaS10L <i>Ornithinococcus</i>
8	Bu Vi A E-08	X	BuViA1E <i>Brevundimonas</i>
9	ArCa A E-09	X	X
10	ArCa A E-10	ArCaA1E <i>Klebsiella</i>	X
11	ArCa A E-11	ArCaA3E <i>Acinetobacter</i> ArCaA2E <i>Klebsiella</i>	X
12	RiPa A E-12	RiPaA4E <i>Tetrasphaera</i> RiPaA304E <i>Thiohalobacter</i>	X
13	RiPa A E-13	X	RiPaA104E <i>Halocella</i>
14	RiPa A E-14	X	RiPaA701E <i>Salinimonas</i> RiPaA20E <i>Halorhodospira</i> RiPaA24E <i>Halorhodospira</i> RiPaA27E <i>Natronobacterium</i>
15	RiPa A E-15	RiPaA702E <i>Pseudacidovorax</i> RiPaA102E <i>Citrobacter</i>	X
16	ArCa S E-16	X	X
17	ArCa S E-17	X	X
18	ArCa S E-18	X	X
19	RiPa S E-19	RiPaS1E <i>Thermanaeromonas</i>	X

		RiPaS3E <i>Thermacetogenium</i>	
20	BuVi O E-20	X	X
21	BuVi O E-21	BuViO5E <i>Enterobacter</i> BuViO7E <i>Enterobacter</i>	X
22	BuVi O E-22	X	X
23	RiPa S E-23	X	RiPaS8E <i>Natronorubrum</i> RiPa S 12 E <i>Natronorubrum</i> RiPa S 19 E <i>Hylemonella</i> RiPa S 25 E <i>Leclercia</i> RiPa S 30 E <i>Natronorubrum</i>
24	RiPa OE-24	X	RiPaO3E <i>Gp6</i>
25	BuVi OE-25	X	X

De un total de 25 muestras colectadas en dos temporadas (lluvia y estiaje), de acuerdo al tipo de muestra (agua, sedimentos, costras, estromatolito, filamentos y florecimiento), en el método de Gabor adaptado por Gómez-Rodríguez se extrajo ADN genómico de 3 aguas de arroyo Carrizal, dos muestras aguas de Rincón de Parangueo, un sedimento de Rincón de Parangueo y una muestra catalogada como otros de Buenavista, lo que se puede ver que para muestras de agua es factible usar ese tipo de método (Fig. 4.21). Para muestras como los filamentos provenientes de Buenavista y sedimentos homólogos al Rincón de Parangueo se sugiere utilizar el método adaptado por Gómez-Rodríguez para obtener ADN.

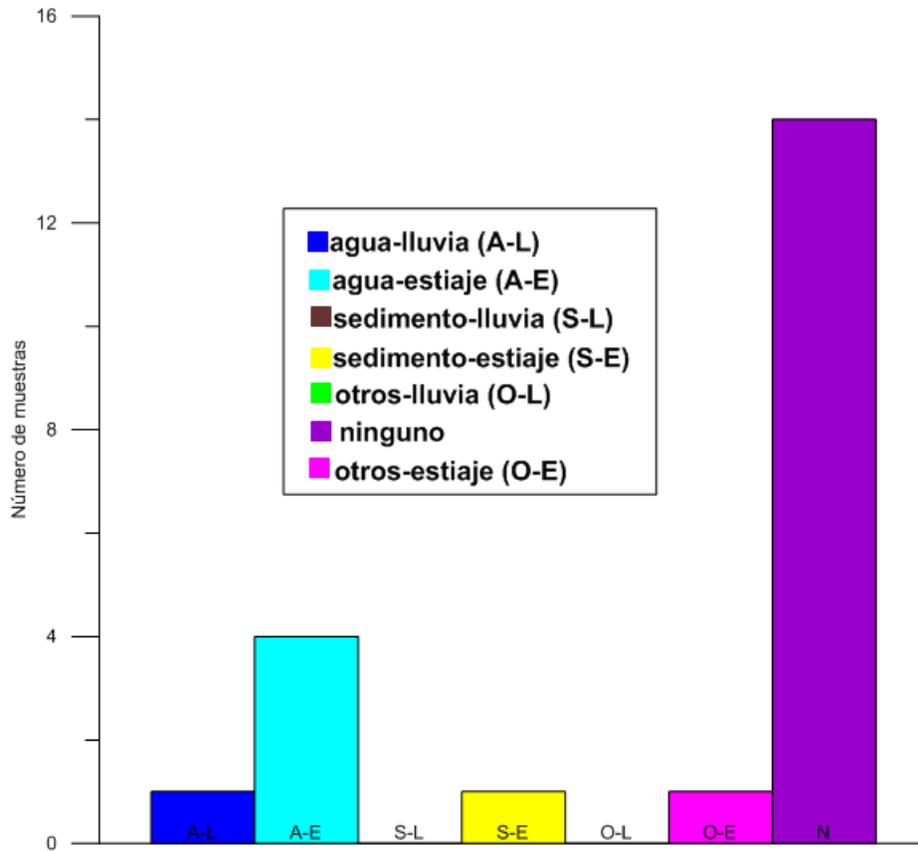


Figura 4.21. Gráfica de muestras en época de lluvia y estiaje vs. método de Garbor adaptado Gómez-Rodríguez (2007).

Del total de 25 muestras colectadas en dos temporadas (lluvia y estiaje), de acuerdo al tipo de muestras el método adaptado por Hernández-Rico (2004) se obtuvieron su ADN de 3 muestras de agua del Rincón de Parangueo, 1 de Buenavista; de sedimentos 2 del Rincón de Parangueo; y 1 del estromatolito (Fig. 4.22).

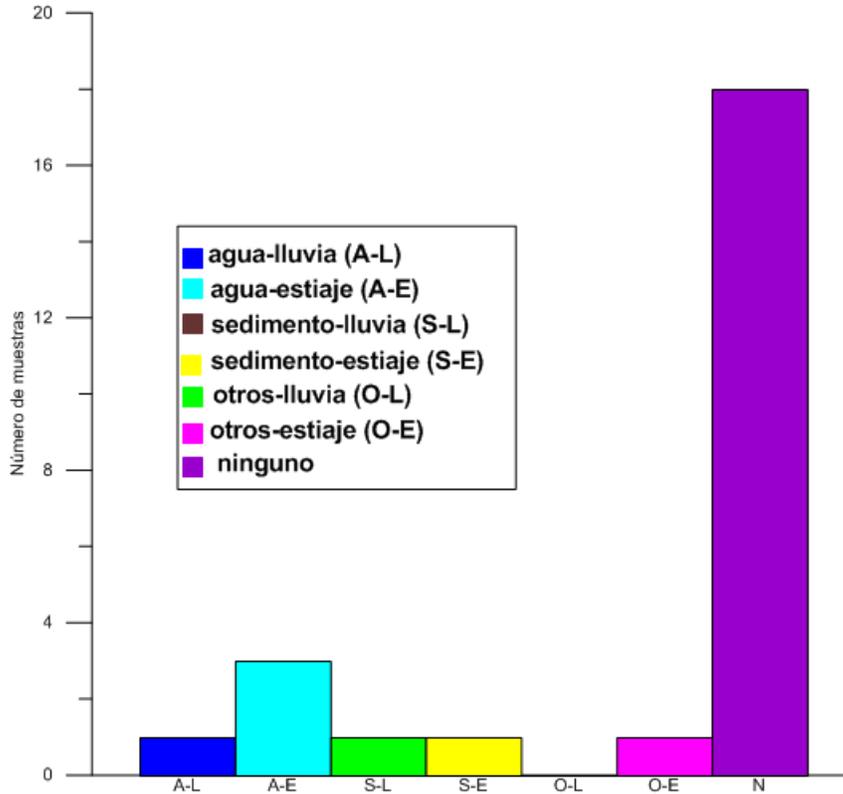


Figura 4.22. Gráfica de muestras en época de lluvia y estiaje vs. método adoptado por Hernández-Rico (2004).

4.2.2.2 Obtención de copias de del gen 16S rRNA por PCR con el método adaptado por Gómez-Rodríguez

En este método se utilizaron las 25 muestras, se preparó la mezcla de la PCR agregando 1 μ L, 2 μ L o bien alguna de las siguientes diluciones 1:10, 1:50, 1:100 de ADN (Figs. 4.23 y 4.24).

A continuación se muestra un ejemplo representativo de muestras que llegaron al proceso de secuenciación.

En este caso en la PCR amplificada usando los mismos oligos se utilizó 2 μ L de extracto de ADN y en su reamplificación se utilizó 1 μ L.

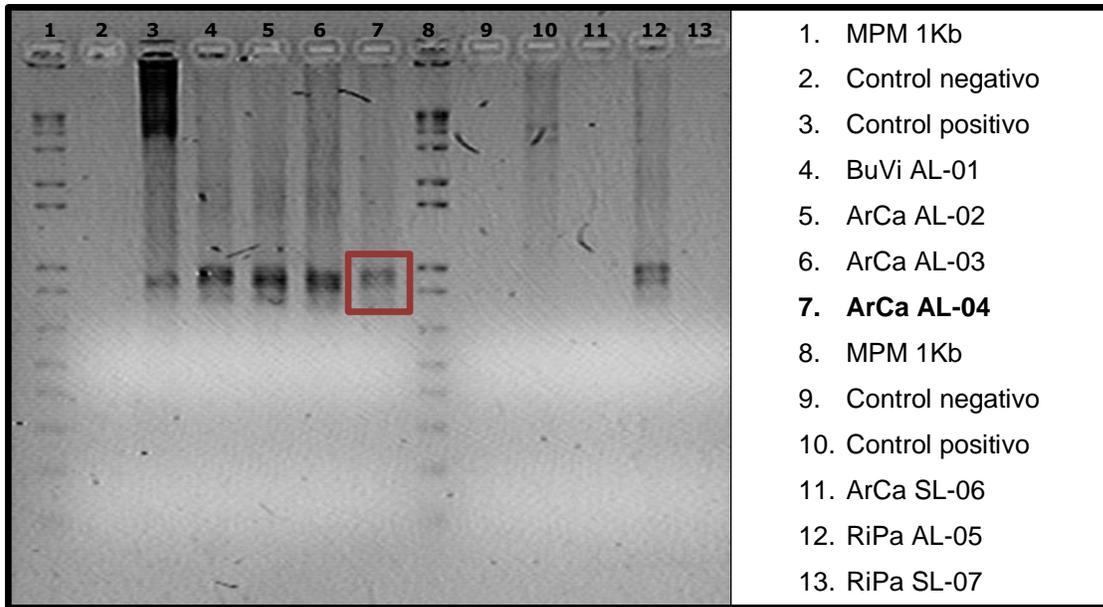


Figura 4.23. Productos de una reamplificación de PCR de muestras de los sitios de ambientes extremos Villa Juárez San Luis Potosí y Rincón de Parangueo Guanajuato., con oligos universales 533F y 1391 R. Gel de agarosa al 1% con un voltaje de 70 mV y observados con luz UV. MPM (Marcador de peso molecular).

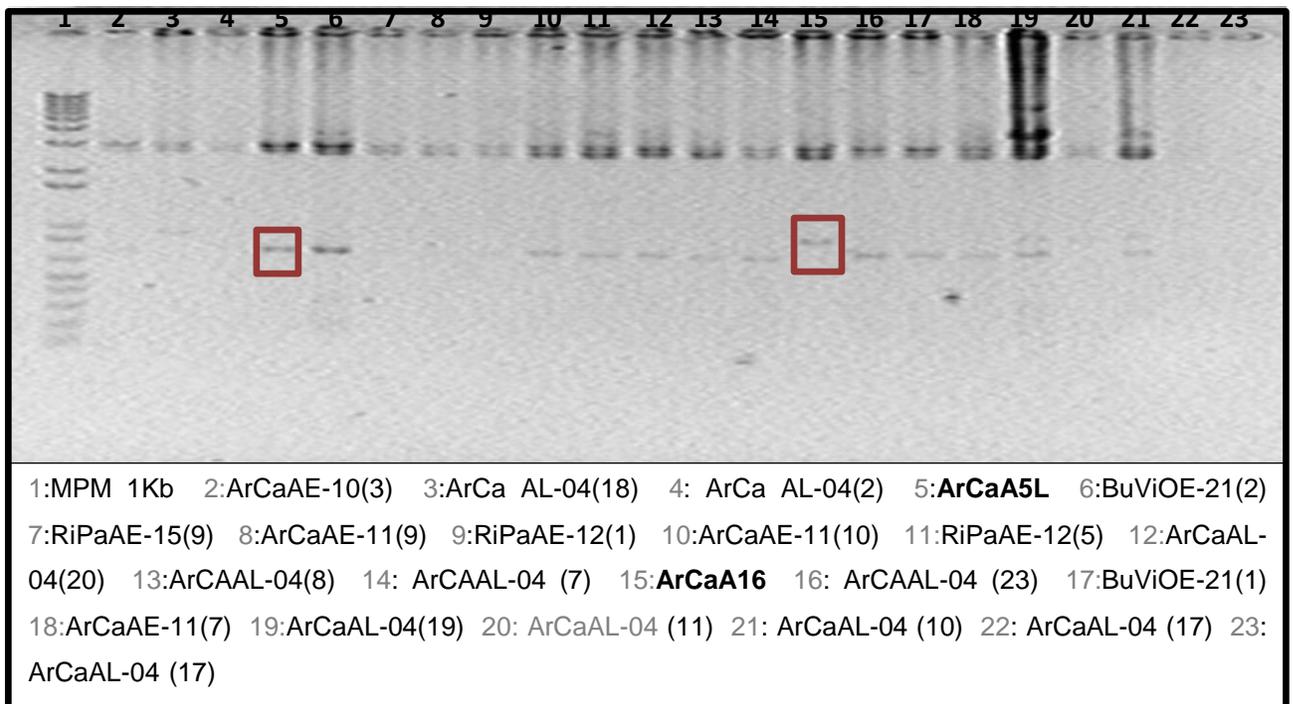


Figura 4.24. Digestión con enzima *EcoRI* de muestras de sitios extremos Villa Juárez, San Luis Potosí y Rincón de Parangueo, Guanajuato, de clonas seleccionadas para comprobar la presencia

del fragmento esperado (recuadro). En un gel de agarosa al 1% se corrió a 70 mV y se observaron con luz UV.

4.2.2.3 Obtención de copias del gen 16S rRNA por PCR adaptado por Hernández-Rico (2004)

En este método se utilizaron las 25 muestras, se preparó la mezcla de la PCR agregando 1 μ L, 2 μ L o bien alguna de las siguientes diluciones 1:10, 1:100 o calcular exactamente de DNA (Figs. 4.25 y 4.26).

A continuación ejemplo representativo de muestras que llegaron al proceso de secuenciación.

En este caso en la PCR amplificada usando los mismos oligos se utilizó 100 ng/ μ L de extracto de ADN en su amplificación. Se intentó anteriormente con la amplificación y re amplificación con 1 y 2 μ L.

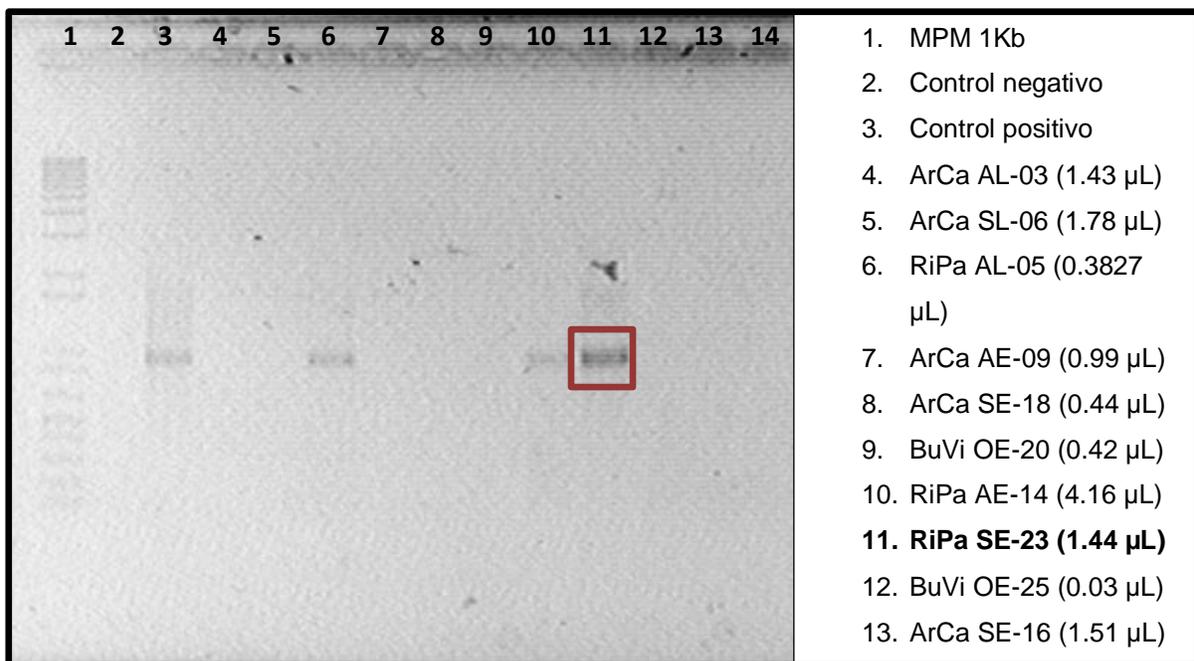


Figura 4.25. Productos de una amplificación de PCR de muestras de los sitios de ambientes extremos Villa Juárez y Rincón de Parangueo con oligos universales 533F y 1391 R. Gel de agarosa al 1% corrido a 70 mV y observados con luz UV. MPM (Marcador de peso molecular). Obsérvese en el recuadro.

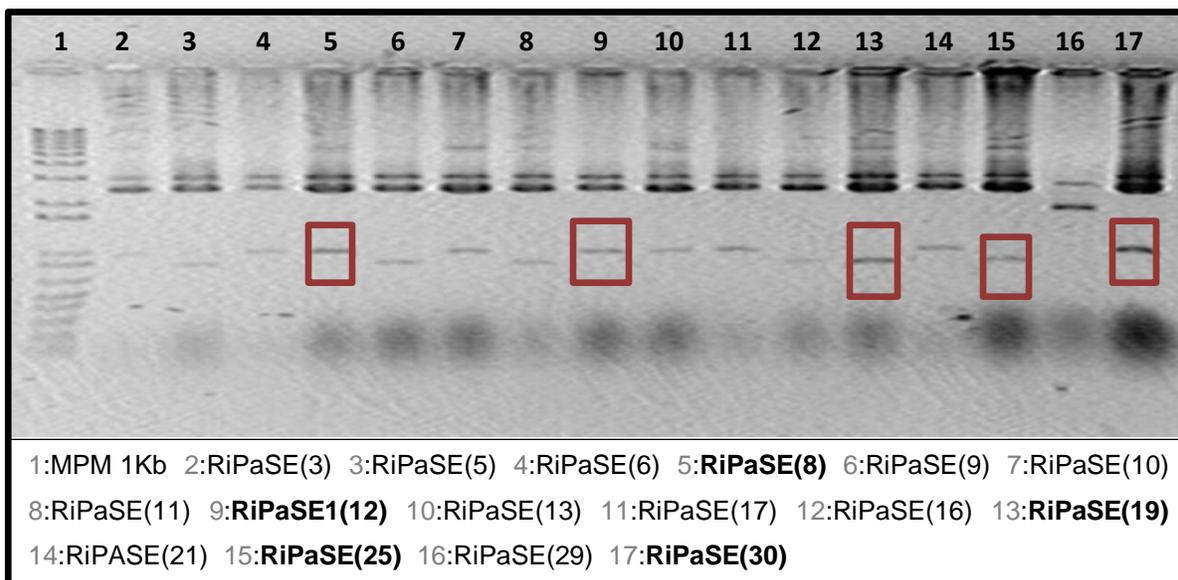


Figura 4.26. Digestión con enzima *EcoRI* de la muestra RiPa SE-23 con sus clonas seleccionadas para comprobar la presencia del fragmento esperado. En un gel de agarosa al 1% se corrió a 70 mV y se observaron con luz UV (recuadros).

4.2.2.4 Obtención de copias de ADN por PCR adaptado por Pastor-Palacios

El método de extracción de ADN que se utilizó fue el adaptado por Hernández-Rico (2004). A continuación esta muestra es RiPa OE-24, dado por su importancia se trabajó aunque su banda fuera muy tenue (Figs. 4.27 y 4.28). Se agregaron 2 μ L de extracto de ADN.

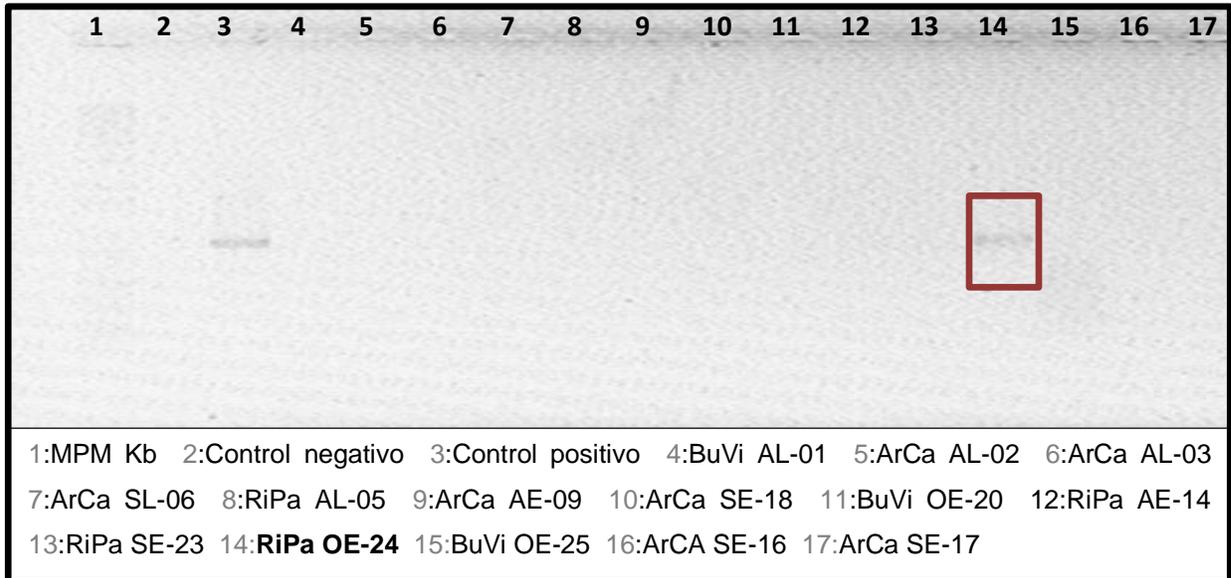


Figura 4.27. Productos de una amplificación de PCR de muestras de los sitios de ambientes extremos Villa Juárez y Rincón de Parangueo, con oligos universales 533F y 1391 R. Gel de agarosa al 1% corrido a 70 mV y observados con luz UV. MPM (Marcador de peso molecular) y producto amplificado en recuadro.

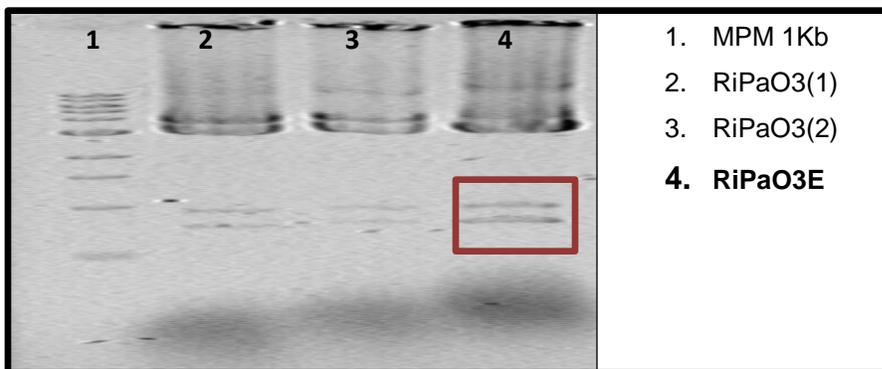


Figura 4.28. Digestión con enzima *EcoRI* con sus clonas seleccionadas para comprobar la presencia del fragmento esperado. En un gel de agarosa al 1% se corrió a 70 mV y se observaron con luz UV (recuadro).

4.2.2.5 Protocolo de amplificación por PCR de ITS para hongos, adaptado por Hernández Rico (2004)

En total fueron 14 hongos seleccionados y secuenciados por las características peculiares de la macromorfología y micromorfología que no coinciden con la literatura (Fig. 4.29). El control positivo fue *Alternaria solani*.

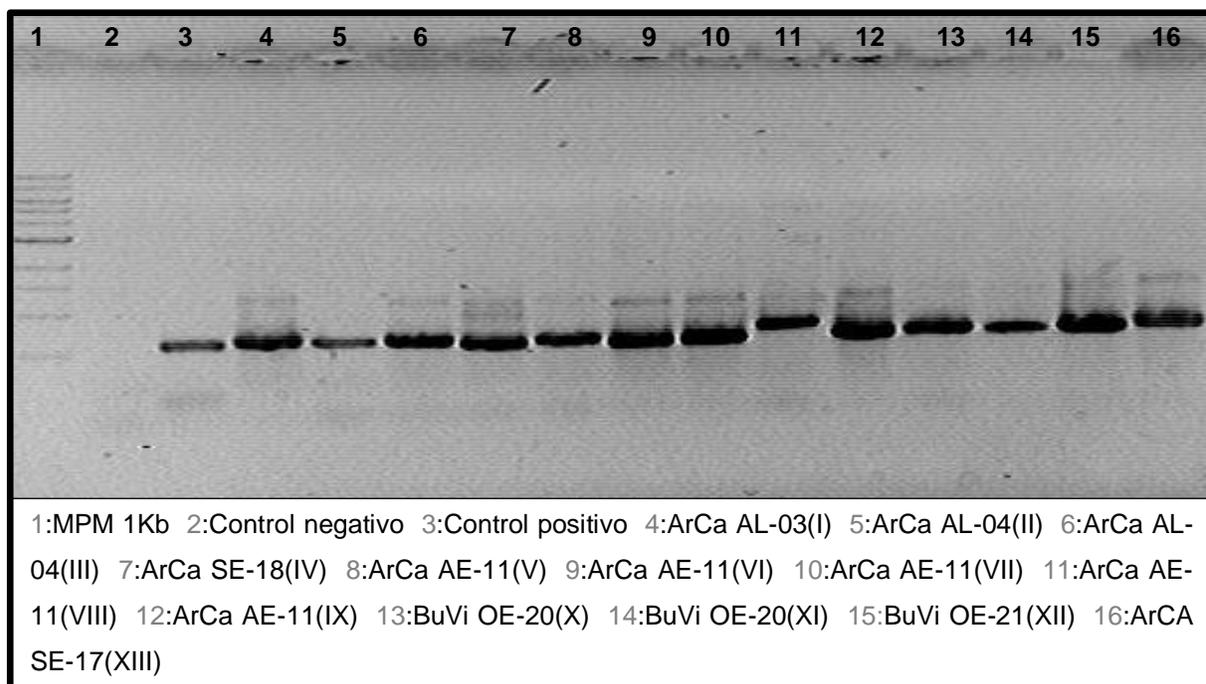


Figura 4.29. Productos de una amplificación de PCR de ITS de hongos en muestras de los sitios de ambientes extremos Villa Juárez y Rincón de Parangueo, con oligos ITS1 y ITS4. Gel de agarosa al 1% corrido a 70 V y observados con luz UV. MPM (Marcador de peso molecular).

4.2.2.6 Protocolo para microalgas modificado en este trabajo

A pesar que en la referencia original de Liu et al. 2014 se reporta que para las algas que estudió el autor 57°C es la mejor condición de amplificación, en nuestro caso, en la Fig. 4.30 se puede observar que las mejores condiciones del PCR de gradiente de temperatura y MgCl₂ fueron 58 °C con MgCl₂ 1.5 mM (carril 3).

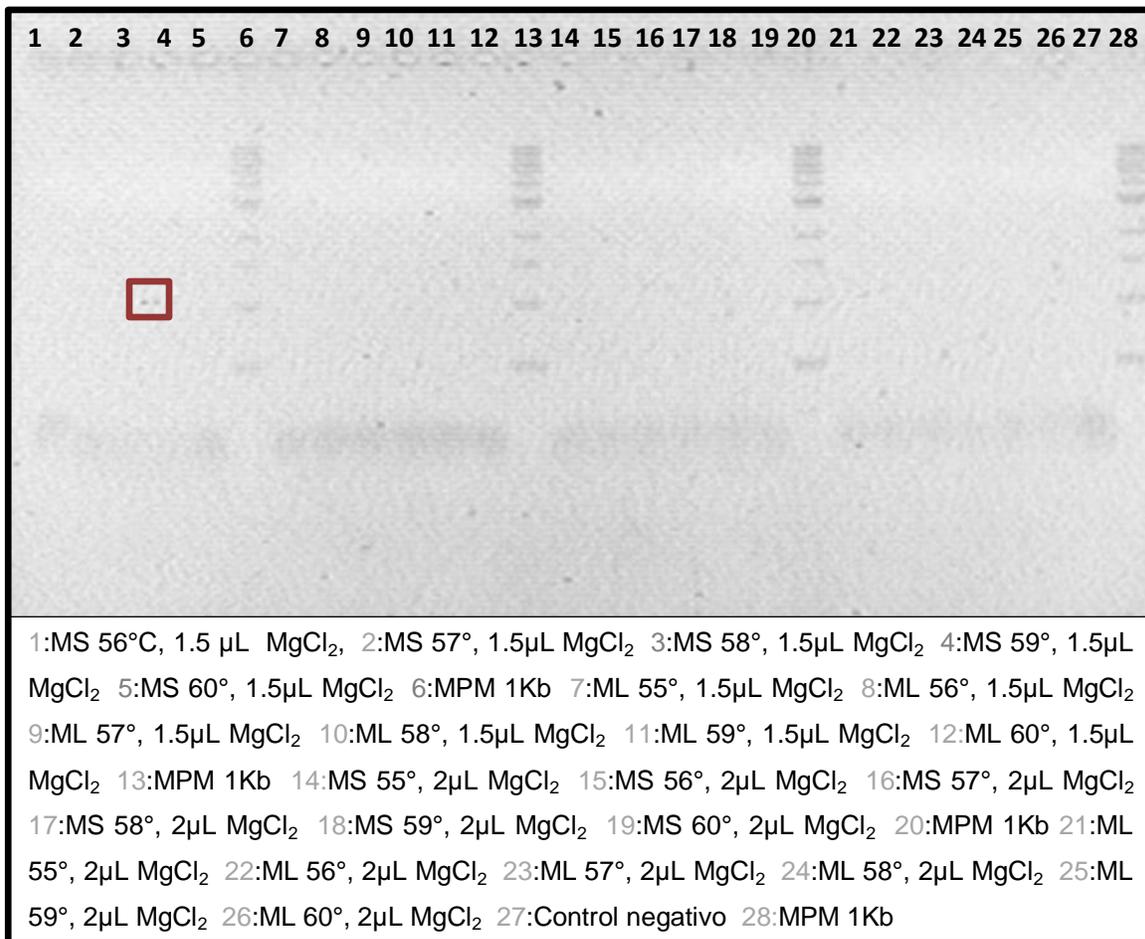


Figura 4.30. Productos de una amplificación de PCR de temperatura con una muestra de Rincón de Parangueo (RiPa S L-07), utilizando oligos para amplificar ITS de microalgas. Gel de agarosa al 1% corrido a 70 mV y observados con luz UV. MPM (Marcador de peso molecular). Examinar el recuadro.

4.2.2.7 Síntesis de sitios con moos encontrados utilizando análisis molecular

En arroyo Carrizal se colectaron muestras de 3 aguas y 1 de sedimento en época de lluvia; 3 muestras de agua y de 3 sedimentos en época de estiaje, se analizó que en época de lluvia la muestra ArCaAL-04 agua roja solo se observó en esa temporada ya que en época de estiaje se perdió, porque creció el arroyo y llegó al sitio donde se colectó la muestra en época de lluvia, tuvo un filotipo que pertenecen al phylum de *Proteobacteria*. No se logró extraer el ADN genómico en las muestras de sedimentos (en época de lluvia), ni se detectó información en la

espectrofotometría de fluorescencia 3D pero la relación de C:N en esta muestra fue de aproximadamente 1. En época de estiaje se observó que hay dos muestras ArCaAE-10 agua roja que se localiza en diferente lugar en el arroyo con *Enterobacteriaceae* en *Proteobacteria*, contiene materia orgánica natural (Tabla 4.3). Asimismo la muestra ArCaAE-11 agua blanca localizada al inicio del camino arroyo Carrizal y colectada solo en esa época, tuvo dos secuencias de diferente familia pero todas ellas en *Proteobacteria*, tiene materia orgánica natural (espectrofotometría de fluorescencia).

Tablas 4.3. Ambiente extremo arroyo Carrizal con tipo de muestra, clona 16S rARN y microorganismo.

Arroyo Carrizal			
Lluvia		Estiaje	
Agua	Sedimento	Agua	Sedimento
Ar Ca A L-04 ArCaA5L <i>Hydrogenophaga</i>		ArCaAE-10 ArCaA1E <i>Klebsiella</i>	
		ArCa A E-11 ArCaA3E <i>Acinetobacter</i>	
		ArCaAE-11 ArCaA2E <i>Klebsiella</i>	

En Buenavista se colectaron dos muestras de agua, una de ellas de la época de lluvia y la otra de estiaje. No se colectaron muestras de sedimento porque solo se encontraron rocas en el sitio. No se obtuvo material genético de muestras de época de lluvia, mientras en época de estiaje se obtuvo el filotipo la muestra BuViA1E bajo condiciones de materia orgánica de origen antropogénico y pertenece de *Caulobacteraceae* en *Proteobacteria*. Por otro lado, de 4 muestras que no están clasificadas como sedimentos o agua sino otros (*floramientos*, filamentos, organismo pegado a una roca, algas blancas) solo se obtuvieron información de la muestra de filamentos BuViO5E y BuViO7E, solo se le ha visto en esa ocasión, se obtuvieron 2 clonas que pertenecen a la familia de *Enterobacteriaceae* en *Proteobacteria* (Tabla 4.4).

Tablas 4.4. Ambiente extremo Buenavista con tipo de muestra, clona 16S rRNA y microorganismo.

Buenavista				
Lluvia		Estiaje		
Agua	Sedimento	Agua	Sedimento	Otros
		BuViAE-08 <i>Brevundimonas</i>	BuViA1E	BuVi O E-21 <i>Enterobacter</i>
				BuViOE-21 <i>Enterobacter</i>

En Rincón de Parangueo se colectaron 1 agua y 1 sedimento en época de lluvia y 4 aguas en poca de lluvia, 1 sedimentos y 2 muestras que no son consideradas como agua y sedimento sino como otros (estromatolito y sedimento verde). La muestra RiPa A L-05 agua verde monitoreada en época de estiaje. Tuvo materia orgánica natural (ácidos fúlvicos), estimo tres filotipos que son de diferente phylum: RiPaAL-13 phylum *Actinobacteria*, familia *Nitriliruptoraceae*; RiPaAL-25 phylum *Verrucomicrobia*, familia *Optutaceae*; RiPaAL-26 phylum *Proteobacteria*, familia *Commamonadaceae*. En esta temporada el agua tenía muchas larvas de mosca. La muestra RiPaSL-07 sedimento blanquecino, fino y negro en su interior, también monitoreado en época de estiaje. Tiene dos secuencias diferentes: RiPaS9L de phylum *Proteobacteria*, familia *Rhodobacteraceae*; RiPa S10L phylum *Actinobacteria*, familia *Intrasporangiaceae*. El sedimento que rodeaba al cuerpo de agua verde, de donde se tomó la muestra tenia muchísimas larvas de mosca y moscas encima (Tabla 4.5).

Tablas 4.5. Ambiente extremo Rincón de Parangueo con tipo de muestra, clona 16S rARN y microorganismo.

Rincón de Parangueo				
Lluvia		Estiaje		
Agua	Sedimento	Agua	Sedimento	Otros
RiPa A L-05 RiPa A 13 L <i>Nitriliruptor</i>	RiPa S L-07 RiPa S 9 L <i>Rubribacterium</i>	RiPa A E-12 RiPaA4E <i>Tetrasphaera</i>	RiPa SE-19 RiPaS1E <i>Thermanaeromonas</i>	RiPaOE-24 RiPaO3E Gp6
RiPa A L-05 RiPa A 25 L <i>Alterococcus</i>	RiPaSL- 07 RiPaS10L <i>Ornithinococcus</i>	RiPaAE-12 RiPaA304E <i>Thiohalobacter</i>	RiPaSE-19 RiPaS3E <i>Thermacetogenium</i>	
RiPa A L-05 RiPa A 26 L <i>Hylemonella</i>		RiPa AE-15 RiPaA702E <i>Pseudacidovorax</i>		RiPa SE-23 RiPaS8E <i>Natronorubrum</i>
		RiPa AE-15 RiPaA102E <i>Citrobacter</i>		RiPaSE-23 RiPa S 12 E <i>Natronorubrum</i>
		RiPaAE-13 RiPaA104E <i>Halocella</i>		RiPa SE-23 RiPa S 19 E <i>Hylemonella</i>
		RiPaAE-14 RiPaA701E <i>Salinimonas</i>		RiPa SE-23 RiPa S 25 E <i>Leclercia</i>
		RiPa AE-14 RiPaA20E <i>Halorhodospira</i>		RiPa SE-23 RiPa S 30 E <i>Natronorubrum</i>
		RiPa AE-14 RiPaA24E <i>Halorhodospira</i>		

		RiPaAE-14		
		RiPaA27E		
		<i>Natronobacterium</i>		

De las 4 muestras de agua todas se lograron obtener material genético. La muestra RiPa AE-12 agua verde monitoreada en época de lluvia tiene 2 clonas con diferente phylum: RiPaA4E familia *Intrasporangiaceae* en *Actinobacteria* y RiPaA304E phylum *Proteobacteria* clase *Gammaproteobacteria*, esta última se identificó en Rincón de Parangueo, en un agua color rosado o rojo debido a la presencia de carotenoides que excretan estos microorganismos; así como, productos le sirven para protegerse de la radiación ultravioleta. Tiene materia de origen orgánico y antropogénico, posiblemente a la caza de moscas que realizan los lugareños en temporada de lluvia. La muestra RiPaAE-15 agua roja solo en época de estiaje se colecto. Posee materia orgánica natural (ácidos húmicos y fúlvicos). Tiene dos secuencias con mismo phylum *Proteobacteria* pero diferente familia. RiPa A702E familia *Commamonadaceae* RiPaA102E familia *Enterobacteriaceae*. La muestra RiPaAE-13 agua verde tomada en otro lugar, se monitorea por primera vez en época de estiaje, contiene materia orgánica natural (ácidos fúlvicos), solo se obtuvo una filotipo RiPaA104E con un phylum *Firmicutes* familia *Halanaerobiaceae*. La muestra RiPaAE-14 agua negra, monitoreada solo en época de estiaje tiene dos dominios, obtuvo materia orgánica natural (ácidos húmicos). La secuencia RiPaA701E dominio de las bacterias, phylum *Proteobacteria* aunque su familia es incierta; la filotipo RiPaA20E dominio de las bacterias, phylum *Proteobacteria* familia *Ectothiorhodospiraceae*; RiPaA24E dominio de las bacterias, phylum *Proteobacteria* familia *Ectothiorhodospiraceae*; la filotipo RiPaA27E dominio de las archeas, phylum *Euryarchaeota* familia *Halobacteriaceae*.

Con referencia a las bacterias *Leclercia*, *Nitriliruptor*, *Halorhodospira*, *Natronobacterium* encontradas en sedimentos verdes, solo han sido reportadas en Tibet, China y Egipto (Grant, 2004).

De la muestra de sedimento que se monitoreo también en época de lluvia RiPaSE-19, no tiene larvas de mosca, contiene materia orgánica (ácidos fúlvicos). Incluye dos secuencias de la misma familia (*Thermoanaerobacteraceae*) en *Firmicutes*.

En cuanto a las muestras clasificadas como otros, hay que mencionar, que solo dos muestras se lograron extraer su material genético.

La muestra RiPaOE-24 es un estromatolito colectado en época de estiaje, posee materia orgánica de origen antropogénico, posiblemente por invasión de puestos colocados cerca a esos sitios y a las visitas turísticas. Incluye un filotipo RiPaO3E phylum *Acidobacteria* familia *Gp6*. La muestra RiPaSE-23 contiene 5 secuencias, en particular destacan dos dominios. El filotipo RiPaS8E dominio *Archaea* phylum *Euryarchaeota* familia *Halobacteriaceae*; la secuencia RiPaS12E dominio *Archaea* phylum *Euryarchaeota* familia *Halobacteriaceae*; el filotipo RiPa19E dominio *Bacteria* phylum *Proteobacteria* y familia *Commamonadaceae*; la secuencia RiPaS25E dominio *Bacteria* phylum *Proteobacteria* familia *Enterobacteriaceae*; el filotipo RiPaS30E dominio *Archaea* phylum *Euryarchaeota* familia *Halobacteriaceae*.

4.2.2.8 Árbol filogenético de Bacterias

A cerca de los microorganismos conocidos aproximadamente desde el siglo pasado, hasta el día de hoy se ha podido conocer sus características estructurales morfológicas y sus funciones respecto a su entorno (ambiente). Más aún, con herramientas de frontera como la biología molecular se consiguió expresar la diversidad microbiana en el árbol filogenético de la vida, al mismo tiempo se ha modificado por las diversas características actualizadas y reportadas por cada microorganismo estudiado.

Por lo que se refiere a microorganismos extremófilos con rasgos de adaptarse en sitios donde otros seres no podrían sobrevivir, en este caso utilizan muy pocos nutrientes, pH (ácidos o alcalinos), la radiación, temperatura (altas o bajas), etc.,

distribuidos en el planeta Tierra (Ramírez-D. *et al.*, 2006), han sido motivo de estudios respecto al tiempo geológico, a la contribución respecto al cambio climático sobre la Tierra. Así mismo, se han empleado diversas técnicas moleculares para obtener su ADN genómico, para conocer su distribución y las condiciones en las que se encuentran. Relacionar la evolución entre los organismos requiere de la filogenia, dado que a través de las células de un ser vivo se obtiene información genética (nucleótidos). Además, cada célula tiene ribosomas, entre ellas se puede mencionar rRNA, empleadas para construir el árbol filogenético de la vida. Ha sido dividido en tres dominios (*Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*) (Stackebrandt, 2009).

En el dominio de la *Bacteria* se localiza el phylum *Proteobacteria* que incluye especies ubicadas sobre la superficie de la Tierra, además de encontrarse en el subsuelo. Este dominio se logró representar en un árbol filogenético, el cual interpreta la evolución que han tenido estos microorganismos en la Tierra, para los ambientes extremos estudiados se obtuvo dicho árbol el cual se muestra en la Figura 4.31. Esta figura se encuentra en el anexo 7.4 de un tamaño favorable para su lectura y observación de las especies.

1. La familia *Enterobacteriaceae* incluye los filotipos ArCaA2E y ArCaA1E, con bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, quimioorganotróficos, reducen nitratos, su temperatura óptima es de 38 a 39 °C (Brisse *et al.*, 2014; Garrity *et al.*, 2007). Para el caso del filotipo ArCaA2E su temperatura es de 35.22 °C, el oxígeno disuelto fue de 3.5 mg/L, la conductividad eléctrica de 24.35 µS/cm, el pH de 6.39, el potencial óxido reducción fue 101.5 mV, los sólidos totales disueltos de 12.2 ppm, cuenta con ácidos húmicos y ácidos fúlvicos (material orgánico natural). Así mismo, la secuencia ArCaA1E tuvo una temperatura de 28.81°C, el oxígeno disuelto de 119.8 mg/L, la conductividad eléctrica de 24.9 µS/cm, el pH de 1.53, el potencial óxido reducción fue de 528.6 mV, los sólidos totales disueltos de 12.26 ppm. Contiene ácidos fúlvicos y ácidos húmicos. Por lo que se

demuestra que dos secuencias con diferente microorganismo pueden estar dentro de un phylum.

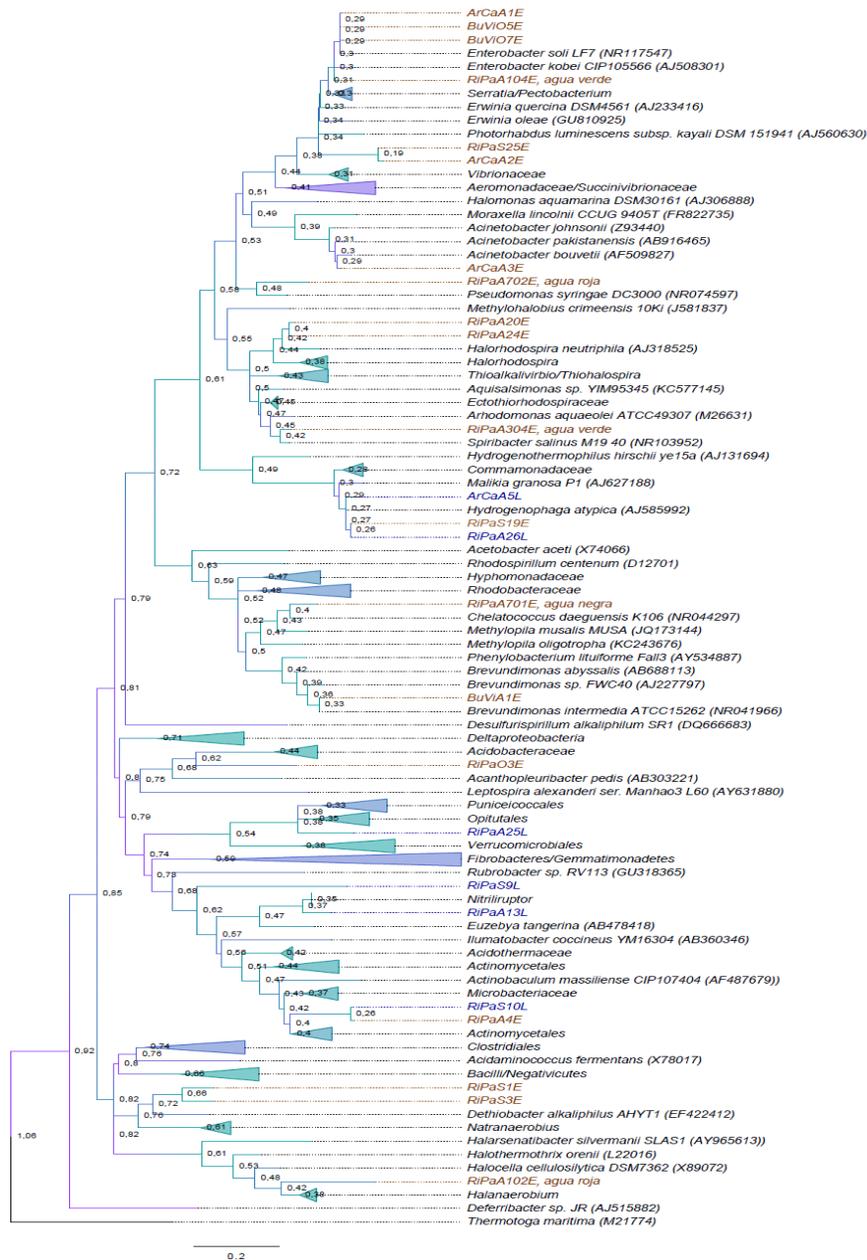


Figura 4.31. Árbol filogenético correspondiente al gen 16S *rRNA* constituido por secuencias de clonas (filotipos) del dominio *Bacteria* en muestras de agua, sedimentos, alga blanca provenientes de ambientes extremos Villa Juárez, S.L.P y Crater-Lago Rincón de Parangueo, Gto. La topología del árbol se realizó con Mega 6. El bootstrap procede de 1000 réplicas y se señala en una escala decimal. Los nombres resaltados en letras cafés o azules son los filotipos renombrados de la siguiente manera ArCa (Arroyo Carrizal), BuVi (Buenavista), RiPa (Rincón de Parangueo), tipo de muestra agua (A), sedimentos (S), época del año: lluvia(L), estiaje(E).

2. En el phylum *Firmicutes* en particular la familia *Halanaerobiaceae*, tiene bacilos, Gram negativos, anaerobios obligado, halófila celulítica, su temperatura óptima es de 39 °C y pH de 7.0, se espera que tenga concentraciones del 5% al 20% de NaCl (Oren, 2009; Garrity *et al.*, 2007; Vos *et al.*, 2011). El filotipo RiPaA104E corresponde a un agua verde en época de estiaje que se desarrolló a 31.97°C, su pH fue 9.47, con un potencial de óxido reducción de 418.4 mV, no se registró oxígeno disuelto, la conductividad salió fuera del rango del multiparámetros, parámetros que nos permiten ver que es un microorganismo extremófilo. Tuvo ácidos fúlvicos (materia orgánica natural).
3. En el caso de la clase *Betaproteobacteria* abarca a la familia *Comamonadaceae*. El filotipo RiPaA702E tiene bacilos Gram negativos, aerobios facultativos o aerobios, pueden ser quimiorganotróficos o algunas quimiolitótrofos; son fijadores de nitrógeno, utiliza varios ácidos orgánicos y pocos azúcares como sustratos, se le ha encontrado en suelos; algunas especies se desarrollan en medio ácido, con un pH de 4.5 (Kämpfer *et al.*, 2008). La muestra de agua en estudio tuvo una temperatura de 21.46 °C, un pH de 9.64, el oxígeno disuelto de 0 mg/L, la conductividad eléctrica salió del rango del multiparámetros, el ORP fue de -393.3 mV. Incluyó materia orgánica natural que incluye ácidos húmicos y ácidos fúlvicos.
4. Con respecto a la familia *Ectothiorhodospiraceae* contiene los siguientes filotipos RiPaA20E y RiPaA24E comprenden bacterias con forma de bacilos Gram negativos, halófilas extremas, bacterias sulfurosas purpura, fotolitoheterotrofas, halofilicas, tienen sulfuro y azufre como los donadores de aceptores de electrones para los fotoautótrofos, que se desarrollan pobremente N₂ y NH₄ que sirven como fuente de nitrógeno, la cisteína es la fuente de sulfuro, el pH óptimo esta entre 6.8 y 7.0, la temperatura óptima es entre los 30 y 35 °C, su ambiente se compone de un lodo anóxico, sedimentos y tapetes microbianos expuestos a la luz en ambientes hipersalinos a ambientes salinos extremos. Se sabe que se puede desarrollar entre salinidades de 9 y 12% de NaCl a pH neutro (Hirschler-

Réa *et al.*, 2003). Corresponden a una muestra de agua color negra, pero por seguridad no se lograron tomar parámetros fisicoquímicos *in situ*. Contiene materia orgánica natural (ácidos húmicos).

5. Existen algunas familias que no se han podido establecer sus filotipos dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, como por ejemplo la secuencia RiPaA304E es una bacteria con bacilos en cadena, Gram negativos, aerobia obligada, quimiolitotrofa obligatoria, halófila moderada, neutrofila, bacteria azufre oxidante, utiliza tiocianato o tiosulfato como donadores de electrones, oxida sulfuro, azufre elemental y tetrionato pero H_2 no. Crece a un pH óptimo entre 7.3 y 7.5, con una temperatura optima de 37 °C (Sorokin *et al.*, 2010). La muestra en estudio tuvo una temperatura de 24.61 °C, el oxígeno disuelto de 2.84 mg/L, la conductividad eléctrica fue de 11.72 μ S/cm, el pH de 9.69, el potencial óxido reducción de -214.1 mV, los sólidos totales disueltos de 58.6 ppm, además tuvo ácidos húmicos y ácidos fúlvicos (materia orgánica natural).
6. En la familia de *Comamonadaceae* de la clase *Betaproteobacteria* se encontró una secuencia ArCaA5L con bacilos, Gram negativo, quimilitotrófico, es hidrógeno aerobio facultativo utiliza como fuente de energía el hidrógeno provenientes de compuestos orgánicos (Kämpfer *et al.*, 2005). Su fuente de carbono es el CO_2 se puede desarrollar entre un pH de 7 y 8, con una temperatura de entre 30 y 37 °C (Yoon *et al.*, 2008). No se logró tomar los parámetros fisicoquímicos de la muestra ya que era mínima la cantidad pero significativa por sus características.
7. Dentro de la familia *Comamonadaceae* se encuentra las secuencias RiPaS19E y RiPaA26L. Los filotipos incluyen bacterias con espirilos, Gram negativos, quimiolitoheterotrofos, anaerobios facultativos, utilizan tiosulfato, como fuente de energía usan las reacciones que se puedan dar y su fuente de carbono es materia orgánica. Como producto final de desnitrificación es el NO_2 , se le ha aislado en suelo. Su temperatura óptima está entre 5 y 29 °C, con un pH de entre 5.6 y 9.8 (Spring *et al.*, 2004). La muestra de agua estudiada en este trabajo tuvo una temperatura de 25.4 °C, un pH de 10.16,

el potencial óxido reducción de 112.9 mV, la conductividad eléctrica de 26.37 $\mu\text{S}/\text{cm}$, el oxígeno disuelto tuvo 243 mg/L debido a una alta aeración que había en ese momento, tuvo ácidos fúlvicos como materia orgánica natural. Para la muestra de sedimento verde no se le pudieron sacar parámetros por sus características físicas. Sin embargo, se puede ver que se le puede encontrar en diferentes épocas en diferentes tipos de muestras.

8. En lo que toca a el filotipo RiPaA701E su familia es incierta, comprende bacterias con bacilos cortos Gram negativos, halófilas moderadas, quimioheterotrofas, aerobias estrictas, se han aislado en un pH óptimo de entre 7.0 y 8.0 con una temperatura de entre 30 y 35 °C. Para su desarrollo requieren de 2 y 5 % NaCl (Ok-Jeon *et al.*, 2005). La muestra en estudio se encontró ácidos húmicos (materia orgánica natural).
9. En relación con la familia *Caulobacteraceae* abarca un filotipo BuViA1E con una bacteria que se observan bacilos Gram negativos, halófilica moderada, quimioheterótrofa, aerobia estricta. Además, se le ha encontrado en sitios oligotróficos por lo que es tolerante a la escasez de nutrientes en un tiempo prolongado con temperaturas bajas. Es responsable de la mineralización del material orgánico disuelto en ambientes acuáticos. Pueden eliminar los fosfatos de aguas residuales y se utilizan en la eutrofización en lagos. Así mismo, los fosfatos que provienen de detergentes, promueven el desarrollo de algas que consumen el oxígeno disuelto, por lo que se pueden encontrar bacterias sulfato reductoras. La presencia de flora bacteriana (sulfato reductoras y ferrobacterianas) incide en el aumento de la corrosión del sistema. Los sulfatos son poco corrosivos, pero contribuyen a la formación del ácido sulfhídrico, por lo que se hace muy corrosivo. Se pueden asociar a los cloruros los flujos de agua subterránea de baja alcalinidad y blandas Predominan los ácidos grasos. Se desarrollan en un pH de 7.5, con una temperatura de 30 °C, para su crecimiento requieren de 2-5 % NaCl (Hyun-Ryu *et al.*, 2007). La muestra de agua tuvo una temperatura de 26.07 °C, el oxígeno disuelto de 0 mg/L, la conductividad eléctrica de 30.2 $\mu\text{S}/\text{cm}$, el potencial oxido reducción de -305.6 mV, con un pH de 6.46, los sólidos

totales disueltos fueron de 15.13 ppm. Así como, la muestra tuvo proteínas aromáticas tipo I (materia orgánica de origen antropogénico).

10. A cerca de la clase *Acidobacteria* incluye una secuencia RiPaO3E donde se observan bacterias con bacilos, Gram negativos, son aerobias estrictas, halotolerantes, heterótrofas, ácidofilas y psicrotolerantes. Sin embargo, en esta clase se pueden encontrar bacterias en forma de bacilos en condiciones anaerobias. Además para su crecimiento, el óptimo pH esta entre 7.0 y 8.0, la temperatura óptima entre 30°C, el ácido acético es su única fuente de energía (Fukunaga *et al.*, 2008; Pankratov y Dedysh, 2010). En la muestra tuvo proteínas aromáticas tipo II (materia orgánica de origen antropogénico).
11. Por su parte, la familia *Opitutaceae* posee la secuencia RiPaA25L contiene bacterias con cocos Gram negativos, bacterias anaerobias obligatorias, halófila, termófila moderada. El pH óptimo está entre 7.0 y 8.5, la temperatura óptima es de 48 °C, se desarrolla en 2.0 a 2.5% de NaCl. Son los primeros termófilos que degradan el agar y pueden desarrollarse en condiciones aerobias y anaerobias, producen azúcares reductores y ácidos orgánicos como productos finales bajo condiciones aerobias y anaerobias, sus colonias reducen de nitrato a nitrito (Shieh *et al.*, 1998). Por ejemplo, la muestra de agua verde tiene una temperatura de 25.4°C, el pH de 10.16, el potencial óxido reducción de 112.9 mV, su oxígeno disuelto de 243 mg/L, la conductividad eléctrica fue de 26.37 µS/cm. Contiene ácidos fúlvicos (materia orgánica natural).
12. En lo que respecta a la familia *Rhodobacteraceae* el filotipo RiPaS9L es una bacteria púrpura del azufre, alcalifílica, fotoheterótrofa, aerobia facultativa. Crece en la obscuridad sobre sustratos orgánicos. Los heterótrofos anaerobios se desarrollan muy poco. Además, tienen bacterioclorofila y carotenoides tanto esferoidene y espiriloxantina, como se puede entender son los tipos de pigmentos fotosintéticos. Sobre el pH óptimo esta entre 8.5 y 9.5, la temperatura óptima de 30 °C (Boldareva *et*

al., 2009). Además, la muestra tiene materia orgánica natural (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos).

13. Con respecto a la familia *Nitriiliruptoraceae* se agrega la secuencia RiPa A13L en este caso es una bacteria, con bacilos Gram positivos y alrededor Gram negativos. Alcalifílica obligatoria, aerobia, halotolerante moderada a una concentración de 0.1 a 0.2 M con ion sodio. Utiliza los ácidos orgánicos, nitrilos alifáticos como fuente de carbono. Tiene como fuente de energía el nitrógeno. Su pH óptimo esta entre 9.0 y 9.5 (Sorokin *et al.*, 2009). Así, por ejemplo, la muestra tiene una temperatura de 25.4°C, un pH de 10.16, el potencial óxido reducción de 112.9 mV, el oxígeno disuelto de 243 mg/L, la conductividad eléctrica de 26.37 μ S/cm, con ácidos fúlvicos (materia orgánica natural).
14. En relación con la familia *Intrasporangiaceae* se pone por caso el filotipo RiPaS10L que consta de cocos Gram positivos, crece en condiciones aerobias y microaerofílicas. La temperatura óptima es de 28 a 37 °C, se desarrolla al 4 % en NaCl. La muestra contiene ácidos húmicos y ácidos fúlvicos (materia orgánica natural). Por otro lado, la secuencia RiPaA4E presenta bacterias con cocos Gram positivos, aerobios. Se pueden desarrollar a un pH de entre 5.5 a 8.5 con una temperatura óptima de 37 °C (Maszenan *et al.*, 2000). Así, por ejemplo, la muestra de agua verde tiene una temperatura de 24.61°C, un pH de 9.69, el potencial óxido reducción fue de -241mV, el oxígeno disuelto de 2.84 mg/L, la conductividad eléctrica de 11.72 μ S/cm y contiene ácido húmicos, ácidos fúlvicos, productos microbiales, proteínas aromáticas tipo II (materia orgánica natural y de origen antropogénico).
15. Con respecto a la familia *Thermoanaerobacteraceae* contiene el filotipo RiPaS3E comprende bacterias con bacilos Gram negativos, quimioautótrofos y quimioorganotróficos, sintróficos, anaerobios, termófilos, donde las bacterias oxidan acetato. El tiosulfato o sulfato son los aceptores finales de electrones. Para su desarrollo su pH óptimo es de 6.8 y la temperatura de 58 °C (Hattori *et al.*, 2000). La muestra tuvo ácidos fúlvicos

(materia orgánica natural). En cuanto a la secuencia de RiPaS1E son bacterias con bacilos Gram negativos, termófilas, anaerobia, el tiosulfato es el último aceptor de electrones, reducen el tiosulfato. El ácido formiato se relaciona con la mineralización de la materia orgánica. Crece a un pH óptimo de 6.5, a una temperatura de 70°C (Mori *et al.*, 2002). En la muestra se encontraron ácidos fúlvicos (materia orgánica natural).

16. En cuanto a la familia *Enterobacteriaceae* posee el filotipo RiPaA102E con bacterias en forma de bacilos, Gram negativos, anaerobios facultativos, quimioorganotróficos, tienen un metabolismo fermentativo y respiratorio. La temperatura óptima para su crecimiento es de 37 °C, con pH óptimo de 7. También reducen nitratos (Holt *et al.*, 1994). La muestra tiene una temperatura de 21.46 °C, un pH de 9.64, el potencial óxido reducción de -393.3 mV, el oxígeno disuelto es 0 mg/L, la conductividad eléctrica sale del rango que tiene el multiparámetros. Contiene la muestra ácidos húmicos y ácidos fulvicos (materia orgánica natural).

4.2.2.9 Árbol filogenético de Arqueas

De manera semejante, se hallaron microorganismos extremófilos en estos ambientes extremos estudiados, en particular se obtuvo el árbol filogenético de las arqueas. Para ilustrar mejor, se muestra en la Figura 4.32.

En lo que se refiere a la familia *Natrialbaceae* cuenta con los siguientes filotipos RiPaS12E, RiPaS30E, RiPaS8E que son arqueas con diversas formas como cocos, bacilos, planos, Gram negativos, son extremos haloalcalifílicos, aerobios. Para su desarrollo óptimo demanda de un pH entre 9 y 9.5, su óptima temperatura es de 37 a 42°C, requieren al menos el 12% de NaCl, son quimioorganotróficos (Xu *et al.*, 1999). Por otro lado, la secuencia RiPaA27E, es una arquea con forma de bacilos Gram negativos, anaerobios, haloalcalifílicos, quimioorganotróficos y se le ha aislado en muestras de arcilla. Para su desarrollo necesita un pH óptimo de 8.5, con una temperatura óptima de entre 36 y 41 °C. Requiere para crecer de 3.5

5.0 Conclusiones y perspectivas

5.1 Conclusiones

Los sitios estudiados en el Municipio de Villa Juárez en San Luis Potosí y en Valle de Santiago, Guanajuato, representan aguas anómalas o exóticas dentro de éstos sistemas hidrogeológicos.

El agua subterránea de Villa Juárez, San Luis Potosí, se clasifica como sulfatada magnésica. Al mismo tiempo, se encuentra arroyo Carrizal que presenta un flujo regional, entre tanto el manantial azufroso de Buenavista conserva un flujo intermedio. Exponen condiciones de interacción agua-roca y efectos de evaporación; sin embargo, este último efecto puede estar asociado a disolución de minerales evaporíticos, como el yeso.

Respecto al Cráter-Lago Rincón de Parangueo del estado de Guanajuato, su agua se clasifica como clorurada sódica, asociada a un un flujo regional. No obstante, el agua presenta condiciones de alta evaporación e interacción agua roca.

Concerniente a las muestras en arroyo Carrizal, se distinguió en ser un sitio acidófilo y poliextremo (mesófilo, acidófilo y siderófilo). Sus manantiales poseen ambientes reductores. Cabe agregar, contiene materia orgánica de origen natural.

Acerca del manantial de Buenavista, se reconoce por ser neutrófilo, mesófilo, halófilo. Además, presenta condiciones reductoras en época de estiaje y condiciones oxidantes en época de lluvia. Cabe decir, presenta materia orgánica de origen antropogénico.

En relación al Rincón de Parangueo, en particular es un sitio poliextremo (alcalófilo y halófilo). Así mismo, implica condiciones reductoras y oxidantes en época de lluvia, mientras en época de estiaje tiene condiciones oxidantes. Ahora bien, contiene materia orgánica de origen natural en época de lluvia y materia orgánica de origen antropogénico en época de estiaje.

Por medio de herramientas moleculares fue posible conocer a través de diversas muestras como agua, sedimentos, filamentos, estromatolito, sedimento verde, a los microorganismos que se desarrollaron en época de lluvia y estiaje en sitios extremos, donde precisamente abarcan phylum como *Proteobacterias*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Euryarchaeota* reportados en la literatura.

Por tanto, en el arroyo Carrizal se encontraron microorganismos quimiolitautótrofos (*Hydrogenophaga* con sus óptimas condiciones son pH 7 a 8 y temperatura de 37°C, pero el sitio tiene pH ácido y podría considerarse un candidato primario que favorece la vida en épocas tempranas de la Tierra); quimioorganotróficos anaerobios y heteroorganótrofos (*Klebsiella* estima una temperatura óptima de 37°C con un pH que varía entre 1.53 y 6.39, el color de su agua puede ser rojo o blanquecino, bioluminocentes); quimioorganotrófico aerobio (*Acinetobacter* con pH óptimo de 6 a 7 y temperatura de 33 a 35°C en agua blanquecina).

Por otra parte, en el manantial Buenavista figuran cepas neutrófilas y halófilas posibles responsables de la mineralización de material orgánico (*Brevundimonas*, cabe agregar que su temperatura óptima es de 30°C y pH de 7.5); quimioorganotróficos anaerobio facultativo (*Enterobacter* cuenta con una temperatura óptima de entre 30 y 37°C, muestra filamentosa). Y un quimioorganotrófico aerobio (*Acinetobacter* con su temperatura óptima de 33 y 35°C a un pH de 6 y 7).

En cuanto al Rincón de Parangueo se hallaron microorganismos poliextremos. Así por ejemplo, *Halorhodospira* bacteria sulfurosa purpura, fotolitoheterotrofo-halófila extrema (la temperatura óptima es de 30 a 35 °C y el pH óptimo es de 6.8 a 7.0). *Rubribacterium* bacteria alcalifílica púrpura no sulfurosa, fotoheterotrofa aerobia facultativa (la temperatura óptima es de 30 °C y el pH óptimo es de 8.5 a 9.5, contiene pigmentos fotosintéticos que se desarrollan en la oscuridad en sustratos orgánicos). *Pseudacidovorax* quimioorganotrófico o quimiolitótrofos aerobio facultativo (no todas la especies crecen en medios ácidos). *Thiohalobacter* bacteria oxidante del sulfuro moderadamente halófila, neutrófila,

quimiolitotrofa, aerobia (oxida los compuestos inorgánicos de azufre (la temperatura óptima es de 37 °C y con un pH entre 7.3 a 7.5). *Natronorubrum* haloalcalifílica, quimioorganotrófico aerobio (el pH óptimo es de 9.0 a 9.5 y su temperatura óptima esta entre 37 y 45 °C). *Salinimonas* moderadamente halófila, quimioheterótrofa aerobia (la temperatura óptima esta entre 30 a 35 °C y el pH óptimo esta entre 7 y 8). *Nitriliruptor* halófila moderada, alcalifílica aerobia (su pH óptimo fue de 9.0 a 9.5). *Tetrasphaera* (la temperatura óptima es de 37 °C y el pH entre 5.5 y 8.5) y *Ornithinococcus* (su temperatura óptima es de 28 a 37 °C) aerobios. *Acidobacteraceae* halotolerante aerobio (la temperatura óptima es de 30 °C y el pH óptimo entre 7 y 8). *Hylemonella* quimiolitoheterótrofa anaerobia (produce NO₂ en pequeñas cantidades, la temperatura óptima esta entre 5 y 29 °C, el pH óptimo entre 5.6 a 9.8). *Thermacetogenium* bacteria oxidante de acetato, sintrófica, quimioorganotrófico y quimioautotrófo anaerobia (crece acetogénicamente en varios alcoholes, metoxilados aromáticos, ácidos orgánicos, aminoácidos, hidrógeno. Para su desarrollo, el pH óptimo es de 6.8 y su temperatura óptima es de 58 °C). *Leclercia* es un quimioorganotrófico anaerobio (la temperatura óptima es de 37 °C). *Natronobacterium* haloalcalofílico, quimioorganotrófico anaerobio (la temperatura óptima esta entre 36 a 41 °C y el pH óptimo de 8.5). *Citrobacter* anaerobio facultativo (la temperatura óptima es de 37 °C y el pH óptimo es de 7). *Alterococcus* bacteria termófila moderada, halófila, anaerobia (el pH óptimo es de 7.0 a 8.5 con una temperatura óptima de 48 °C). *Halocella* bacteria celulolítica, halófila, anaerobia (la temperatura óptima es de 39 °C y su pH óptimo de 7). *Thermanaeromonas* bacteria reductora de tiosulfato, termófila anaerobia estricta (el ácido formiato se le relaciona con la mineralización de la materia orgánica, su temperatura óptima es de 70 °C y el pH óptimo de 6.5). De los microorganismos encontrados en este sitio se ha reportado *Halocella* en Crimea, *Halorhodospira* en Egipto y *Natronobacterium* en Kenia y China.

Después de examinar el árbol filogenético de bacterias y arqueas, se observa que los sitios en estudio el cociente carbono: nitrógeno (C:N) es alto por lo que existe una gran diversidad microbiana (Rincón de Parangueo) y cuando las concentraciones de carbono son bajas la diversidad es mínima (arroyo Carrizal).

En consecuencia, dentro de los microorganismos aislados existen litoautotrofos que podrían aportar fuente de energía para que se desarrollen los demás seres que dependen de sus productos. Aunque hoy se sabe que la materia orgánica proviene de la superficie, se sabe que existen formaciones geológicas, relacionadas con la presencia de microorganismos.

5.2 Perspectivas

En consecuencia a la investigación realizada, se concluye es necesario reportar más estudios en sitios extremos del territorio mexicano, para describir los microorganismos que se encuentran ahí, como en este caso se encontraron halófilos en Rincón de Parangueo describirlos, efectuar estudios en el laboratorio para conocer sus rutas metabólicas y emplearles en diversos campos. Además, de conocer la relación que pueda tener como diversas disciplinas como la hidrogeología, astrobiología, geoquímica, biotecnología entre otras.

Por otro lado, existen grupos de investigación extranjeros como del investigador Komárek (ficológico de renombre internacional quien realizó estudios en San Luis Potosí); así como, otros grupos que han realizado estudios en diversos puntos del país, que no solo han aportado información que no se conocía sino también trabajan en sitios desconocidos. Considero que la biogeoquímica, es una disciplina poco explorada quizá por falta de infraestructura y recursos económicos pero que contribuye a completar la información de cada sitio en estudio.

El siguiente aspecto trata de utilizar los microorganismos como biomarcadores para revelar los procesos de cada ecosistema que ha evolucionado a través del tiempo. Es necesario, contribuir con la información y evitar la pérdida de estos hábitats, debido a actividades antropogénicas y entender como los eventos naturales (sismos, fracturas, tormentas entre otros) pueden favorecer para que muten las especies y existan nuevas especies sobre todo en el dominio de las *Procariontes*.

Es por ello importante contar con un equipo multidisciplinario de técnicas para facilitar la comprensión de los procesos evolutivos, ya que el apoyo del estudio de fósiles, técnicas de hidrogeología y biología molecular, nos ayudan a relacionar los microorganismos con sus funciones y el entorno.

Los sitios arroyo Carrizal, Buenavista y Rincón de Parangueo son lugares extremos donde se demostró una gran diversidad microbiana adaptada a condiciones extremas (pH ácido, alcalino, gradientes de temperatura pronunciados, gradientes intensos de potencial variaciones de temperatura en un mismo sitio, variaciones de ORP, etc.). Los considero laboratorios naturales. Aunque faltaría demostrar que la biomasa subterránea es apoyada por la materia orgánica debida a microorganismos litótrofos, sulfato-reductores, metanogénicos capaces de sostener a su entorno.

Recomendaciones para futuros trabajos:

- ✓ En cuanto a los métodos de extracción de ADN, estandarizar protocolos, *ad hoc* para probarlos en la gama de muestras que se pudieran encontrar en los sitios extremos ya que como vimos no a todas las muestras se les pudo extraer ADN. Además, como se demostró en esta investigación, que una de las muestras que no eran catalogadas como sedimento o agua, el sedimento verde (material cristalizado, con algunas aristas verdes ubicado entre el agua y el sedimento del sitio), se logró extraer material genético de interés astrobiológico.
- ✓ Al emplear medios de cultivos, reproducir el experimento por lo menos 10 veces por cada muestra para fin de realizar estadística con los resultados.
- ✓ Utilizar microscopio de contraste de fases, para observar bacterias, porque se aprecian mejor la micromorfología.
- ✓ En el caso, de la *Brevundimonas* demostrar que pueden eliminar fosfatos y que la presencia de ácido sulfhídrico, es debida a microorganismos sulfato-reductores. Ya que al agregar algún detergente fomenta el desarrollo de algas consumiéndose el oxígeno disuelto fomentando la presencia de bacterias sulfato-reductoras productoras de sulfatos que no son corrosivos

pero si contribuyen a la formación de ácido sulfhídrico que si provoca un ambiente corrosivo.

- ✓ Más aún, el *Nitriliruptor* una vez que se pueda conservar con algún método de conservación en el laboratorio, conseguir que las enzimas (como nitrilohidratasa y nitrilasa) pueden utilizarse como biocatalizadores utilizándose en la biotecnología ambiental y síntesis orgánica.
- ✓ También, en el caso del estromatolito reproducir los estudios en diferentes áreas del sitio Rincón de Parangueo, con el fin de estandarizar realmente la similitud de los resultados, por la trascendencia que tiene.
- ✓ Así mismo, conocer los tipos de pigmentos fotosintéticos de *Rubribacterium*. Demostrar que se desarrollan en la noche u oscuridad.
- ✓ En particular, *Thermacetogenium* comprobar que puede producir acetato como producto final.
- ✓ En el caso de *Halocella*, evidenciar que puede degradar celulosa este microorganismo.
- ✓ Además, es importante considerar que para el desarrollo de ciertos géneros, es fundamental el registro del pH en el que se encuentran como en el caso de *Halorhodospira*.
- ✓ Habría que decir también, que *Thihalobacter* requeriría ensayos para conocer la actividad de la oxidación del tiosulfato en diferentes concentraciones con el NaCl (1 M y 3M).
- ✓ Se debe agregar que se necesita traer sedimentos (cantidad suficiente) para definir el tamaño de partícula en la que se están desarrollando los microorganismos.
- ✓ De acuerdo a las muestras que se trajeron para analizarlas, algunas se podrían relacionar con el natrón por ejemplo, por lo que se debería demostrar si se relaciona con la presencia del microorganismo (*Natronorubrum*).
- ✓ Realizar más monitoreos en los sitios de estudio.

Debido a las particularidades de estos hábitats, se propone ampliar su estudio para conocer las moléculas sintetizadas por sus microorganismos (por ejemplo

enzimas resistentes al calor, salinidad y pH), encontrándole variadas aplicaciones tecnológicas.

Debido al potencial biotecnológico de los microorganismos que viven en condiciones extremas encontrados en el sitio de Rincón de Parangueo Gto., sería recomendable que se fortalezca la protección de la zona para que con un equipo de investigación multidisciplinario se pueda aprovechar la características de estos microorganismos presentes en el sitio

6.0 Bibliografía.

- Aiken, G. R., McKnight, D., Weshaw, R. L., MacCarthy, P. 1985. An Introduction To Humic Substances In Soil, Sediment And Water. Substances In Soil, Sediment And Water. John Wiley & Sons. New York. 203 pp.
- Albarrán-Zavala, E. 2008. El potencial redox y la espontaneidad de las reacciones electroquímicas. *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, 2: 336-345.
- Amils, R., Gómez, F., González-Toril, E., Aguilera, A., Rodríguez, N., Fernández-Remolar, D. 2004. Extremofilia astrobiológica: el caso del río Tinto. *Boletín SEA*, 12:19-26.
- Aranda-Gómez, J. J., Levresse, G., Pacheco-Martínez, J., Ramos-Leal, J. A., Carrasco-Núñez, G., Chacón-Baca, E., González-Naranjo, G., Chávez-Cabello, G., Vega-González, M., Origel, G., Noyola-Medrano, C. 2013. Active sinking at the bottom of the Rincón de Parangueo Maar (Guanajuato, México) and its probable relation with subsidence faults at Salamanca and Celaya. *Bol. Soc. Geol. Mex.* 65:169-188.
- Arriaga-Becerra, R. E. 1997. Programa de manejo para el área natural protegida "Región volcánica siete luminarias" localizada en el municipio Valle de Santiago del Estado de Guanajuato. *Periódico Oficial*.
- Aznar-Jiménez, A. 2000. Determinación de los parámetros físico-químicos de calidad de las aguas. *RIGA*, 2:12-19.
- Barba-Egido, R., Díez-Martín, F., Duque-Martínez, J., Fraile-Márquez, C., De Francisco-Rodríguez, S., Gómez-De la Rúa, D., Gómez-González, J. A., De Luque-Ripoll, L., Sánchez-Yustos, P., Baena-Preysler, J., Cuartero-Monteagudo, F., Gidna, A., McHenry, L., Tarriño, A., Vargas, J. A. 2015. Peninj research project, lake Natron, Tanzania. Universidad de Valladolid. Recuperado el 13 de octubre del 2015, de <http://www.peninjproject.org/#team>.
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffnes, M. W., y Pace, N. R. 1994. Remarkable archeal diversity detected in a Yellowstone national park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:1609-1613.

- Barghoorn, E. S. y Tyler, S. A. 1965. Microorganisms from the gunflint chert. *Science*, 147: 563-577.
- Bastin, E. S. 1926. The presence of sulphate-reducing bacteria in oil-field waters. *Science*, 63:21-24.
- Bond, P. L., Smriga, S. P. y Bandfield, J. F. 2000. Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:3842–3849.
- Brisse, S., Passet, V., Grimont, P. A. D. 2014. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64: 3146-3152.
- Boldareva, E. N., Moskalenko, A. A., Makhneva, Z. K., Tourova, T. P., Kolganova, T. V., Gorlenko, V. M. 2009. *Rubribacterium polymorphum* gen. nov., sp. nov., a novel alkaliphilic nonsulfur purple bacterium from an Eastern Siberian soda lake. *Microbiology*, 78: 732-740.
- Cano-Cruz M. 2008. Evolución de un cráter de explosión (maar) riolítico: Hoya de Estrada, campo volcánico Valle de Santiago, Guanajuato, México. *RMCG*, 25: 549-564.
- Castro-Piña, L., Flores-Gallegos, A. C., Rodríguez-Vidal, A., Aguilar-González, M. A., Aguilar-González, C. N., Rodríguez-Herrera R. 2011. Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de cuatro Ciénegas Coahuila, México. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3: 33-43.
- Chapelle, F. 2001. *Ground-water Microbiology And Geochemistry*. John Wiley y Sons, INC. United States of America, 477pp.
- Chen W., Westerhoff P., Leenheer, J.A., Booksh, K. 2003. Fluorescence excitation–emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 5701-5710.

- Cheng, S. 1988. Trilinear diagram revisited: Application, limitation, and an electronic spreadsheet program. *Ground Water*, 26: 505-510.
- Claverie, J. M., Notredame, C. 2007. *Bioinformatics For Dummies*. Wiley publishing, Inc, United States of America, 457 pp.
- Dilek, Y., Muechlenbachs, K., Furnes H. 2008. *Links Between Geological Processes Microbial Activities And Evolution Of Life*. Springer, Canadá, 331pp.
- Elosegi, A., Butturini, A. 2009. *El Transporte De Los Materiales Inorgánicos Disueltos Y Particulados*. Fundación BBVA, 14 pp.
- Froni, L. 1999. *Procesos Microbianos*. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Rio Cuarto de Argentina. Uruguay, 332 pp.
- Fukunaga, Y., Kurahashi, M., Yanagi, K., Yokota, A., Harayama, S. 2008. *Acanthopleuribacter pedis gen. nov., sp. nov.*, a marine bacterium isolated from a chiton, and description of *Acanthopleuribacteraceae fam. nov.*, *Acanthopleuribacterales ord. nov.*, *Holophagaceae fam. nov.*, *Holophagales ord. nov.* and *Holophagae classis nov.* in the phylum 'Acidobacteria'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 2597-2601.
- Gabor, E. M., J.de Vries, E., B. J. D. 2003. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44:153-163.
- Garcia-Amilivia, M.A. 2009. Agua y medio ambiente. Los lagos en la directiva marco del agua. *IT*, 85:30-37.
- Garrels, R. M., MacKenzie F. T. 1967. Origin of the chemical compositions of some springs and lakes. In *Equilibrium Concepts in Natural Water Chemistry*. Washington, D.C., A. C. S., 222-242.
- Garzón-Valencia, G. 2001. *Catálogo De Fuentes Termales Del Parque Nacional De Los Nevados*. Ministerio de minas y energía. Ingeominas. República de Colombia, 114 pp.

- Grant, W. D. 2004. Life at low water activity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 359: 1249-1267.
- Gómez-Rodríguez, E. Y. 2007. Tipificación por métodos moleculares de microorganismos acidófilos presentes en los terreros de lixiviación de Mexicana de Cananea. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, 165 pp.
- Gómez, N., Charles D. J., Giorgi, A., Guash H., Mateo P., Sabater S. 2009. *Conceptos y Técnicas en Ecología Fluvial*. Fundación BBVA, 26 pp.
- González- Abraham, A., Fagundo-Castillo, J. R., Carrillo-Rivera, J. J., Rodríguez-Estrella, R. 2012. Geoquímica de los sistemas de flujo de agua subterránea en rocas sedimentarias y rocas volcanogénicas de Loreto, BCS, México. *Bol. Soc. Geol. Mex.*, 64: 319-333.
- Guerrero, R., Berlanga, M. 2006. Life's unity and flexibility: the ecological link. *Int. Microbiol.*, 9:225-235.
- Gunde-Cimerman, N., Oren, A. 2005. Cellular Origin, Life In Extreme Habitats And Astrobiology. Adaptation To Life At High Salt Concentrations In *Archaea, Bacteria, And Eukarya*. Springer, Netherlands, 532 pp.
- Gurevich, M. S. 1962. The role of microorganisms in producing the chemical composition of ground water. In Kuznetsov, S. I., ed., *Geologic Activity of Microorganisms*. New York. *Trans. Inst. Microbiol.*, 9:65-75.
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S., Shoun, H. 2000. *Thermacetogenium phaeum* *gen. nov., sp. nov.*, a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 1601-1609.
- Henderson, R. K., Baker, A., Murphy, K. R., Hambly, A., Stuetz, R. M., Khan, S. J. 2009. Fluorescence as a potencial monitoring tool for recycled water system: a review. *Water Res.*, 43: 863-881.
- Hernández-Rico, E. 2004. Diagnóstico de enfermedades en jitomate en el Estado de San Luis Potosí, utilizando metodologías microbiológicas, bioquímicas, inmunológicas y moleculares. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, 99 pp.

Hernández-Martínez, J. L. 2008. Efecto de la evolución geoquímica en la calidad del agua subterránea en la porción central de la zona media del estado de San Luis Potosí. Universidad Autónoma De San Luis Potosí, (PMPCA), 108 pp.

Hernández-Zavala, M. E. 2004. Sistematización de cepario de hongos del laboratorio de micología, Facultad de Ciencias Químicas, U.A.S.L.P. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, 105 pp.

Hirschler-Réa, A., Matheron, R., Riffaud, C., Mouné, S., Eatock, C., Herbert, R. A., Willison J. C., Caumette, P. 2003. Isolation and characterization of spirilloid purple phototrophic bacteria forming red layers in microbial mats of Mediterranean salterns: description of *Halorhodospira neutriphila* sp. nov. and emendation of the genus *Halorhodospira*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53: 153-163.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Stanley, J. T., Williams, S. T. 1994. Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology. Lippincott Williams y Wilkins, Philadelphia, 787pp.

<http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p2-redox.pdf>

http://2.bp.blogspot.com/-FpcMWdd2A_U/UORfXBqaazI/AAAAAAAAAUU/LC8rdC-1Sal/s1600/Phylogenetic_tree-es.png

Hudson, N., Baker, A., Reynolds, D. 2007. Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters. A review. River Res. Appl., 23: 631-649.

Hyun-Ryu, S., Park, M., Ro-Lee, J., Yun, P. – Y., Ok-Jeon, C. 2007. *Brevundimonas aveniformis* sp. nov., a stalked species isolated from activated sludge. Int. Syst. Evol. Microbiol., 57: 1561-1565.

- Ibáñez, J. J. 2008. El potencial redox de los suelos. Recuperado el 23 de mayo del 2015, de <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2008/01/28/83434>.
- Kämpfer, P., Schulze, R., Jäckel, U., Malik, K. A., Amann, R., Spring, S. 2005. *Hydrogenophaga defluvii* sp. nov. and *Hydrogenophaga atypica* sp. nov., isolated from activated sludge. Int. Syst. Evol. Microbiol., 55: 341-344.
- Kämpfer, P., Thummes, K., Chu, H.- I., Tan, C.- C., Arun, A. B., Chen, W.- M., Lai, W.- A., Shen, F. – T., Rekha, P. D., Young, C. – C. 2008. *Pseudacidovorax intermedius* gen. nov., sp. nov., a novel nitrogen-fixing betaproteobacterium isolated from soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58: 491-495.
- Kazmierczak, J., Kempe, S., Kremer, B., López-García, P., Moreira, D., Tavera, R. 2011. Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, México. Facies, 57: 543–570.
- Korenfeld-Federman, D. 2000. Diario Oficial de la Nación, acuerdo por el que se dan a conocer los estudios técnicos de aguas nacionales subterráneas del acuífero Río Verde, clave 2415, en el Estado de San Luis Potosí, región hidrológica administrativa Golfo Norte. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Liu, J., Gerken, H., Li Y. 2014. Single-tube colony PCR for DNA amplification and transformant screening of oleaginous microalgae. J. Appl. Phycol., 26:1719–1726.
- Llorente-Sánchez, Mireia. 2011. Aportaciones al conocimiento de la dinámica de la materia orgánica edáfica en suelos calizos del Páramo Castellano-Leonés. Universidad de Valladolid, 156 pp.
- Lloyd, J. W., Heathcote, J. A, 1985. Chemistry Of Groundwater. Oxford University Press, New York, 293 pp.
- Longwell, C. L., Flint, R. F. 1994 Geología Física. Limusa-Noriega editors, México, 545 pp.
- López-Archilla, A. I. 2005 Ríotinto: un universo de mundos microbianos. Ecosistemas, 14:52-65.

- López-Doncel, R. 2003. La formación Tamabra del Cretácico medio en la porción central del margen occidental de la plataforma Valles-San Luis Potosí, centro-noreste de México: RMCG, 20:1-19.
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., Franco-Cendejas, R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en discapacidad, 3:10-18.
- Luque, L. 1995. Los yacimientos plio- pleitocenos del grupo Peninj (oeste del lago Natron, Tanzania). Geogaceta, 18:125-127.
- Machorro, C. A. 2015. Lago Natrón y sus estatuas calcificadas. Equilibrio. Recuperado el 11 de abril del 2015, de <http://equilibrio.mx/biodiversidad/lago-natron-y-sus-estatuas-calcificadas/>.
- Mancilla-Villa, O. R., Bautista-Olivas, A. L., Ortega-Escobar, H. M., Sánchez-Bernal, E. I., Can-Chulim, A., Guevara-Gutiérrez, R. D., Ortega Mikolaev, Y. M. 2014. Hidrogeoquímica de salinas Zapotitlán y los lagos-cráter Alchichica y Atexcac, Puebla. IDESIA, 32:55-69.
- Martínez-Alfaro, P. E., Martínez-Santos, P., Castaño-Castaño, S. 2006. Fundamentos De Hidrogeología. Mundi-Prensa libros, 284 pp.
- Maszenan, A. M., Seviour, R. J., Patel, B. K. C., Schumann, P., Burghardt, J., Tokiwa, Y., Stratton, H. M. 2000. Three isolates of novel polyphosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera gen. nov.*, and description of two new species, *Tetrasphaera japonica sp. nov.* and *Tetrasphaera australiensis sp. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50: 593-603.
- Mifflin, M. D. 1988. Region 5, Great Basin. In: Back, W.; Rosenshein, J.S.; Seaber, P.R., eds. Hydrogeology: Boulder, CO: Geological Society of America, The Geology of North America, 2: 69-86.
- Monroy-Castillo, M. I., Calvillo-Unna, T. 1997. Breve Historia de San Luis Potosí. Fondo de Cultura Económica, 335 pp.
- Montoya, L., Vizioli, C., Rodríguez, N., Rastoll, M. J., Amils, R., Marin, I. 2013. Microbial community composition of Tirez lagoon (Spain), a highly sulfated athallassohaline environment. Aquat. Biosyst., 9:1-19.

- Morán-Ramírez, J. 2012. Conexiones Hidráulicas de cuencas hidrogeológicas en la sierra Madre Oriental aplicando modelos hidrogeoquímicos. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., 57pp.
- Mori, K., Hanada, S., Maruyama, A., Marumo, K. 2002. *Thermanaeromonas toyohensis* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic anaerobe isolated from a subterranean vein in the Toyoha mines. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52: 1675-1680.
- Murphy, G. P. 1982. The chronology, pyroclastic stratigraphy, and petrology of the Valle de Santiago Maar Field, Central Mexico: Berkeley, EE. UU., Universidad de California, tesis de maestría, 55 pp.
- Ok-Jeon, C., Lim, J. – M., Park, D. – J., Kim, C. – J. 2005. *Salinimonas chungwhensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a solar saltern in Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 239-243.
- Ordoñez, E., 1906. Los cráteres de explosión de Valle de Santiago. 10th Congr. Geol. Intern., Excursion Fieldguide, 14:1-8.
- Paerl, H. W., Pinckney, J. L., Steppe, T. F. 2000. Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. Environ. Microbiol., 2:11-26.
- Pankratov, T. A., Dedysh, S. N. 2010. *Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *Granulicella pectinivorans* sp. nov., *Granulicella aggregans* sp. nov. and *Granulicella rosea* sp. nov., acidophilic, polymer-degrading acidobacteria from *Sphagnum* peat bogs. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60: 2951-2959.
- Pulido-Bosch, A. 2014. Nociones De Hidrogeología Para Ambientólogos. Universidad de Almería, 500 pp.
- Purdy, K. J. 2005. Nucleic acid recovery from complex environmental samples. Elsevier, 397: 271-292.
- Ramírez-D., N., Serrano-R., J. A., Sandoval-T., H. 2006. Microorganismos extremófilos. Rev. Mex. Cienc. Farm., 37: 56-71.
- Redfield, A. C., Ketchum, B. H., Richards, F. A. 1960. The influence of organism on the composition of sea-water. MS received, 52 pp.
- Riding, R. E., Awramik, S. M. 2010. Microbial sediments. Springer, U.S.A., 331 pp.

- Rocha-Trevino, L. 2015. Análisis de la deformación y hundimiento activo causado por la desecación del lago del maar Rincón de Parangueo (Guanajuato, México) mediante modelos análogos y perfiles de Radar de Penetración Terrestre (RPT). UNAM, Qro., 111 pp.
- Rodríguez-Mellado, J. M., Marín-Galvin, R. 1999. Físicoquímica De Aguas. Ediciones Díaz de Santos, 446 pp.
- Rogers, G. S. 1917. Chemical relations of the o-field waters in San Joaquin Valley, California. U. S. Geol. Surv. Bull., 653: 93-99.
- Roldán-Pérez, G. 2003. Bioindicación de la calidad del agua en Colombia: propuesta para el uso del método BMWP Col. Universidad de Antioquia, 170 pp.
- Roldán-Pérez, G., Ramírez-Restrepo, J. J. 2008. Fundamentos de limnología neotropical. Universidad de Antioquia, 440 pp.
- Shieh, W. Y., Jean, W. D. 1998. *Alterococcus agarolyticus*, *gen.nov.*, *sp.nov.*, a halophilic thermophilic bacterium capable of agar degradation. J. Microbiol., 44: 637-645.
- Schnitzer, M. 1991. Soil organic matter, the next 75 years. Soil Sci., 151:41-58.
- Sorokin, D. Y., Kovaleva, O. L., Tourova, T. P., Muyzer, G. 2010. *Thiohalobacter thiocyanaticus* *gen. nov.*, *sp. nov.*, a moderately halophilic, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium from hypersaline lakes, that utilizes thiocyanate. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60: 444-450.
- Sorokin, D. Y., Pelt, S. V., Tourova, T. P., Evtushenko, L. I. 2009. *Nitriliruptor alkaliphilus* *gen. nov.*, *sp. nov.*, a deep lineage haloalkaliphilic actinobacterium from soda lakes capable of growth on aliphatic nitriles, and proposal of *Nitriliruptoraceae* *fam. nov.* and *Nitriliruptorales* *ord. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59: 248-253.
- Spring, S., Jäckel, U., Wagner, M., Kämpfer, P. 2004. *Ottowia thiooxydans* *gen. nov.*, *sp. nov.*, a novel facultatively anaerobic, N₂O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of *Aquaspirillum gracile* to *Hylemonella gracilis* *gen. nov.*, *comb. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54: 99-106.

- Stackebrandt, E. 2009. Phylogeny based on 16 S rRNA/DNA. Encyclopedia of life sciences, John Wiley & Sons, 1-10.
- Staley, J. T. 2006. The bacterial species dilemma and the genomic–phylogenetic species concept. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 361: 1899–1909.
- Stevenson, F. J. 1982. *Humus Chemistry. Genesis Composition, Reactions.* J. Willey & Sons. 512 pp.
- Valerdi-Negreros, J. C., Pacheco-Cabañas, R. K., Rivera-Martínez, L. G., Rico-Herrera, M., Malm, O., Brito, E. M. S. 2013. Estudio filogenético de cepas bacterianas aisladas de lagos de cráteres “7 luminarias”. *Aplicaciones en Bioingeniería ambiental, Universidad de Guanajuato*, 80-87.
- Ventura-Cruz, S., Fall, C., Esparza-Soto, M. 2014. Caracterización de la materia orgánica en el efluente de un reactor nitrificante utilizando espectroscopia de fluorescencia. *RMIQ*, 13:279-289.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes.* Springer Science & Business Media, 1450 pp.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe W. J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 6578-6583.
- Woese, C. R., Kandler, O., y Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 4576-4579.
- Xin, H., Itoh, T., Zhou, P., Suzuki, K.- I., Nakase, T. 2001. *Natronobacterium nitratireducens* sp. nov., a haloalkaliphilic archaeon isolated from a soda lake in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 1825-1829.
- Xu, Y., Zhou, P., Tian, X. 1999. Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea *Natronorubrum bangense* gen. nov. sp. nov. and *Natronorubrum tibetense* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 261-266.
- Yoon, J. – H., Kang, S. – J., Hyun-Ryu, S., Ok-Jeon, C., and Oh, T. – K. 2008. *Hydrogenophaga bisanensis* sp. nov., isolated from wastewater of a textile dye works. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 393-397.

- Zamboni, I. R., Ballesteros-G., M., Zamudio-S. A. M. 2006. Caracterización de ácidos húmicos y fúlvicos de un molisol bajo dos coberturas diferentes. Rev. Colomb. Quím., 35:191-203.
- Zuckerlandl, E., Pauling, L. 1965 Molecules as documents of evolutionary history. J. Theor. Biol., 8:357-366.

7. 0 Anexos

Metodología para preparar envases antes de ser utilizados en el muestreo

Los recipientes para cuerpos de agua que se usaron para recolectar y analizar cationes y elementos traza se lavaron con HCl al 10 %. Las muestras de aguas para la determinación de cationes y elementos traza deberán ser acidificadas con ácido nítrico 100 %. Mantener en a temperatura de 4 °C en una hielera con geles previamente congelados y posteriormente guardarlos en refrigeración a 4 °C.

Protocolo para preparación muestras sólidas y líquidas con el método de espectrometría de fluorescencia.

Muestras líquidas

Se requiere que las muestras se filtren 0.45 µL (Millipore). Se requiere una cantidad aproximada de 10 mL. Refrigerar a 4 °C hasta que se procese la muestra.

Muestras sólidas

Extracción

1. Se pesa 1 g de sedimento seco a temperatura ambiente y agregar 10 mL de agua desionizada.
2. Agitar horizontalmente por 2 h.
3. Dejar reposar durante toda la noche a temperatura ambiente. En la mañana centrifugar 10-15 min por 500 rpm. Recuperar el sobrenadante. Filtrar el sobrenadante con filtro 0.45 µL. Refrigerar a 4 °C hasta que se procese la muestra.
4. A continuación, se utilizan tubos de concentración alta de reacción que tienen un rango de 0 a 1500 para determinar DQO (demanda química de oxígeno). El análisis se realiza para cada muestra. Una vez conocido el valor de DQO se hace una dilución hasta una concentración de 2 mg/L de DQO. Posteriormente se analiza en el espectrofotómetro de fluorescencia. Además, se prepara una

solución control de concentración conocida para verificar la fiabilidad del análisis, un blanco que es agua desionizada y la réplica de cualquier muestra o bien todas y el número de muestras que se analizaran.

El espectrofluorómetro *Perkin Elmer LS-55* está equipado con una lámpara de xenón de 150 w como fuente de excitación y es controlado por el software WINLAB (Perkin Elmer, E.U.A., 2000), operado desde una computadora de escritorio (*DELL*). La caracterización de cada muestra, se obtienen 45 espectros sincronizados de emisión individual a longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) entre 250 y 450 nm, su velocidad de escaneo es de 1500 nm/min, con un tiempo de generación de la matriz de excitación- emisión (es el tiempo que se tarda en hacer el análisis para realizar los 45 escaneos por muestra) de 25 min. El espectro de agua desionizada se considera como blanco, el cual se resta al espectro de cada muestra para obtener la corrección de cada espectro.

Protocolo para la preparación de muestras de sedimentos, estromatolito en el analizador experimental *Costech Instruments*.

1. Colocar en una charola de aluminio los sedimentos. En una bolsa de papel se introduce la charola y se pone a secar en un horno a 60 °C. Rotular la muestra.
2. Observar la muestra este seca de uno a dos días.
3. Sacar la muestra. Limpiar el molino de balines o de bolas, y el colector de muestra, balines.
4. Introducir la muestra con una espátula. Cerrar el colector. Posicionar en el molino de bolas.
5. Para una muestra de sedimento programar el aparato en un tiempo de 3 min, con una frecuencia de 25 pulsos/s.
6. Al finalizar, automáticamente se para el aparato, sacar el contenedor con la muestra, se abre con cuidado para no perder muestra. Guardar en la bolsa de papel.

7. Usa guantes de látex. Pesar las capsulas de estaño, agregar muestra y anotar el peso, cerrar la capsula con una pinza.

Colocar en el aparato una vez que se logró estabilizar.

Tabla 7.1. Nomenclatura de las clonas secuenciadas utilizadas para arboles filogenéticos.

	ITS	16S rRNA	
1	ArCa A 1 L	RiPa S 9 L	RiPa S 8 E
2	ArCa A 2L	RiPa S 12 E	ArCa A 5 L
3	ArCa A 3 L	RiPa S 19 E	ArCa A 16 L
4	ArCa S 4 E	RiPa S 25 E	ArCa A 1 E
5	ArCa A 5 E	RiPa S 30 E	ArCa A 2 E
6	ArCa A 6 E	RiPa A 13 L	ArCa A 3 E
7	ArCa A 7 E	RiPa A 25 L	BuVi O 5 E
8	ArCa A 8 E	RiPa A 26 L	BuVi O 7 E
9	ArCa O 9 E	RiPa S 10 L	RiPa A 102 E ²
10	BuVi O 10 E	BuVi A 1 E	RiPa A 702 E ²
11	BuVi O 11 E	RiPa A 104 E ⁴	RiPa A 304 E ⁴
12	ArCa S 12 E	RiPa A 701 E ¹	RiPa A 4 E
13	RiPa O 13 E	RiPa A 20 E	RiPa S 1 E
14		RiPa A 24 E	RiPa S 3 E
15		RiPa A 27 E	RiPa O 3 E

Código nomenclatura

- Sitio: ArCa, BuVi, RiPa
- Agua (A) [negra 01, roja 02, lechosa 03, verde 04], Sedimento (S), Otro (O)
- Número de clona.
- Lluvia (L), Estiaje (E)

La primera columna corresponden a muestras de ITS para hongos. La segunda y tercera columna corresponden a Archaea y Bacteria (16S rRNA).

Tabla 7.2. Preparación de medios de cultivo.

Medio	Componentes y procedimiento para preparar
Agar Papa Dextrosa	Es deshidratado, comercial. Agar papa dextrosa 39 g, agua destilada 1000 mL. Pesar la cantidad que se requiere, completar con agua el volumen necesario. Adherir un trozo de cinta testigo al matraz. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión, 121 °C durante 15 min.
Agar YPD	Es deshidratado, comercial. Agar YPD 50 g, agua destilada 1000 mL. Pesar la cantidad que se requiere, completar con agua el volumen necesario. Adherir un trozo de cinta testigo al matraz. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión, 121 °C durante 15 min.
Medio Chu 10 D Modificado	Pesar KH_2PO_4 0.032 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.101 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.250 mM, NaHCO_3 0.188mM, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.009mM, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 0.010mM. <i>Microelementos:</i> H_3BO_3 11.560 μM , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.229 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.193 μM , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.028 μM , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.079 μM $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.037 μM . Nota: Para medio sin nitrógeno reemplazar con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mM. Se usa la solución tampón HEPES a 2.5 mM, ajustar pH a 7.8. No agregar antibioticos. Adherir un trozo de cinta testigo al matraz. Esteriliza en autoclave a 15 libras de presion, 121 °C durante 15 min.
Medio Nutritivo	Pesar Extracto de carne 1 g, extracto de levadura 2 g, Peptona 5 g, NaCl 5 g, Agar 15 g, agregar 1000 mL de agua destilada. Adherir un trozo de cinta testigo al matraz. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión, 121°C durante 15 min.
Agar Rosa de Bengala	a) Solución de Rosa de Bengala. Pesar Rosa de Bengala 0.15 g, agua destilada estéril 25 mL. b) Solución de Ampicilina. Ampicilina (cápsulas de 500 mg) 0.8g, agua destilada esteril 40 mL. Preparar 100 mL de agar papa dextrosa, enfriar a 45 °C. Añadir 1 mL de la solución a y 0.5 mL de la solución b. Mezclar por rotacion y vaciar en cajas de Petri estériles. Esterilizar el antibiótico y el rosa de bengala con un filtro con tamaño de poro de 0.45 μm .

Agar Avena Jitomate	Pesar harina de avena para bebé 10 g, puré de jitomate sin condimento 10 g, MgSO ₄ .7H ₂ O 1 g, NaNO ₃ 1 g, Agar agar 18 g, agua destilada 1000 mL. Colocar los componentes en el matraz, disolver con un poco de agua. Agregar el resto del agua. Ajusta a un pH de 5.6. Adherir un trozo de cinta testigo Esterilizar durante 20 min a 121°C.
Medio de Garrod	Pesar extracto de carne 3 g, NaCl 5 g, peptona 10 g, almidón soluble 1 g, agar 20 g, agua destilada 1000 mL. Adherir un trozo de cinta testigo al matraz. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) sólido	Pesar bacto-triptona 2.5 g, extracto de levadura 1.25 g, NaCl 2.5 g y agar 3.5 g. Se agrega 250 mL de agua destilada. Esterilizar a 121°C por 15 minutos durante 15 min.
Medio de cultivo LB líquido	Pesar Bacto-triptona 2.5 g, extracto de levadura 1.25 g, NaCl 2.5 g. Agregar 250 mL agua destilada. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos durante 15 min.

Preparación de colorantes para la tinción Gram

CRITAL VIOLETA

Cristal violeta	1 g
Agua destilada	100 mL

IODO

Yoduro de Potasio (KI)	2.g
Yodo (I)	1 g
Agua destilada	200 mL

ALCOHOL ACETONA

Acetona	50 mL
Alcohol etílico 95%	50 mL

SAFRANINA

Safranina	0.5 g
Agua destilada	100 mL

Preparación de la tinción de azul algodón lactofenol.

Glicerol	40 mL
Agua destilada	20 mL
Azul algodón	0.05 g
Fenol	20 g
Ácido láctico	20 mL

Procedimiento.

Pesar 20 g de fenol en un vidrio de reloj, disolver en 20 mL de agua destilada por calentamiento en baño María, agregar 20 mL de ácido láctico y 40 mL de glicerina. Añadir 0.05 g de colorante de azul algodón, mezclar con agitador. Colocar en un frasco ámbar con tapón de rosca, marcar con el nombre de la solución, fecha y siglas del responsable del procedimiento.

Técnica de microcultivo de Riedell o Cultivo en Block

Para realizar el estudio micromorfológico de los hongos.

1. Seleccionar una caja de Petri para microcultivo.
2. Con la ayuda de unas pinzas flameadas, acomodar el portaobjetos y el cubreobjeto sobre la varilla de vidrio que se encuentra dentro de la caja de Petri.
3. Cortar con un bisturí esterilizado por calor cuadros de 1 cm², del medio de cultivo a inocular (agar- papa- dextrosa, agar- avena- jitomate, etc.).
4. Con el bisturí colocar el cuadro de agar en el centro del portaobjetos que se encuentra dentro de la caja.

5. Inocular con el asa estéril una pequeña muestra de la colonia a investigar, en el centro de cada uno de los lados del cuadro del medio de cultivo.
6. Colocar el cubreobjeto sobre el cuadro de agar, presionando ligeramente con las pinzas flameadas.
7. Agregar glicerol al 10 % estéril, hasta cubrir la base de la caja. NO DEBE TOCAR EL PORTAOBJETOS.
8. Incubar a 28 °C y hacer observaciones cada 24 h hasta observar un desarrollo abundante en la periferia del agar.
9. Con ayuda del equipo de disección, eliminar totalmente de las laminillas el agar y realizar con ellas preparaciones semipermanentes o permanentes según se requiera.

Tabla 7.3. Preparación de soluciones

Soluciones	Preparación
Acetato de sodio 3M pH a 5.2	Pesar 24.60 g de acetato de sodio y aforar a 100 mL.
Birboim I	glucosa 50 mM, tris-HCl 20 mM pH a 8.0, EDTA 10 mM (pH a 8). Preparar solución de 100 mL. Esterilizar en autoclave y guardar a 4 °C.
Birboim II	NaOH 0.2 N (en solución de 10N), 1 % SDS. Aforar con agua destilada. Preparar cuando se vaya a usar.
Birboim III	60 mL Acetato de sodio 5 M, 11.5 mL Ácido acético glacial, 28.5 mL Agua. Aforar con agua destilada. Esterilizar en autoclave. Almacenar a 4 °C.
CaCl ₂ para 80 mL	Pesar 1.176 g CaCl ₂ 0.1M, 12 mL glicerol (estéril) 15%, cpb Agua. Se debe esterilizar en autoclave 15 libras por 15 min.
Etanol al 70 %	Se miden en una probeta 70 mL de etano y se afora a 100 mL.
IPTG 1M	Pesar 0.6 g, aforar en 2.5 mL de agua inyectable.
Glicerol al 50 %	Medir 50 mL en una probeta y aforar con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

Marcador de peso molecular 1kb (1µg/µL)	Mezclar 15 µL de TE pH a 8, 5 µL de buffer de carga (6X), 5 µL de ADN 1 Kb Invitrogen (1 mg/µL).
TAE 50X	Para 1 L: Tris base 24.2 g, ácido acético 57.1 mL, EDTA 0.5 M 100 mL pH a 8.
TE 10 X	Mezclar Tris 100 mM con de EDTA 10mM y aforar a 50 mL con agua destilada. Ajustar el pH a 8.
TBE 10X	Para 1 L, pesar tris 108 g, ácido bórico 55 g, 0.5 M EDTA 40 mL. No es necesario esterilizar.
RNAsa (10 mg/mL) para 2 mL	Preparar buffer tris pH a 7.5 10mM agregar 20 µL y NaCl 6 µL.
Solución amortiguadora para extracción de ADN en el protocolo de Gabor adaptado.	100 mM Tris- HCl, 100 mM EDTA de sodio, 1.5 M NaCl, 1 %bromuro de hexadecimetilamonio (CTAB), pH 8.
Solución amortiguadora para extracción de ADN en el protocolo adaptado por Hernández Rico.	d-sorbitol 0.14 M, tris-HCl 0.22 M pH 8, EDTA 0.22 M pH a 8, NaCl 0.8 M, CTAB 0.8%, n-lauril sarcosina 1 %, PVP 1 %, β-mercaptoetanol 0.2%
X-Gal	Pesar 40 mg aforar en 1 mL.

A continuación se presenta la Figura 7.4. Árbol filogenético correspondiente al gen 16S *rRNA* constituido por secuencias de clonas (filotipos) del dominio *Bacteria* en muestras de agua, sedimentos, alga blanca provenientes de ambientes extremos Villa Juárez, San Luis Potosí y Rincón de Parangueo, Guanajuato.

