

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS  
Y ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**T E S I S**

Análisis morfológico y molecular de  
bacterias aisladas de sedimentos de los  
lagos “Esmeralda” y “Encantada” del  
Parque Nacional Lagunas de  
Montebello, Chiapas

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

**ALEJANDRA OSORIO GONZÁLEZ**

Director

DR. VÍCTOR MANUEL RUÍZ VALDIVIEZO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

ASESOR

DR. JAVIER GUTIÉRREZ JIMÉNEZ

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Octubre de 2020





**Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas**  
**Dirección de Servicios Escolares**  
**Departamento de Certificación Escolar**  
Autorización de impresión



Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas  
Fecha: 11 de Septiembre de 2020

C. Alejandra Osorio González

Pasante del Programa Educativo de: Licenciado en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:  
Análisis morfológico y molecular de bacterias aisladas de sedimentos de los lagos  
"Esmeralda" y "Encantada" del Parque Nacional Lagunas de Montebello, Chiapas.

En la modalidad de Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

**Revisores**

Dra. Alma Gabriela Verdiga Váldez

Mtro. Luis Galdino García Pérez

Dr. Javier Gutiérrez Jiménez

**Firmas:**



Ccp. Expediente.

## AGRADECIMIENTOS

*Mi más profundo y sincero agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Víctor Manuel Ruiz Valdiviezo, quien me abrió las puertas, ajenas a mi casa de estudios y me brindó la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por darme su confianza, el apoyo y transmitirme su conocimiento durante el servicio social y la tesis realizada.*

*Agradezco especialmente a mi asesor de tesis el Dr. Javier Gutiérrez Jiménez por sus consejos, asesoría y el apoyo en la realización de la tesis, además de ser mi maestro durante la carrera, quien me inspiró con sus clases y me transmitió su entusiasmo para enfocarme en el área de Microbiología.*

*Al Mtro. Luis Galdino García Pérez por ser mi maestro durante la carrera y transmitirme su entusiasmo por la Biotecnología y sus palabras de aliento, también agradezco su asesoría y aportaciones en la realización de la tesis.*

*A la Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez por el tiempo prestado, su valiosa asesoría y aportaciones en la realización de la tesis.*

*A la Mtra. Sandra Aurora González Sánchez por sus consejos, orientación durante la carrera y quien me dio la motivación necesaria para explorar fuera de mi casa de estudios.*

*Al Mtro. Jorge Arturo García Rodríguez por su paciencia al enseñarme en el laboratorio, darme sus consejos y su apoyo durante la tesis, con quien cultivé una gran amistad.*

*A mis compañeros del laboratorio 4 del ITTG-Polo Tecnológico por sus consejos, por su apoyo, me transmitieron y ampliaron mis conocimientos, agradezco también su amistad, siempre ómicos.*

*Al laboratorio 1 del ITTG-polo Tecnológico, por el apoyo, la asesoría y los consejos brindados durante la realización de este proyecto.*

*Al laboratorio de Biología Molecular y Genética de la Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH, por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.*

*A la Bióloga Elvia Rosama Moreno Andrade porque siempre tuvo un consejo para mí, además de ser siempre amable en proporcionarme los materiales necesarios de laboratorio.*

*A mi familia, porque siempre puedo contar con ellos, porque nunca han dejado de apoyarme y siempre han estado en la buenas, en las malas y ser mi mayor motor para salir adelante.*

*A mis compañeros que se volvieron grandes amigos con quienes compartí y disfruté el camino durante la licenciatura, además de dejarme hermosas aventuras que nunca olvidaré.*

*A las personas que no mencione pero que en este proceso me tendieron una mano, un consejo y ayuda cuando las cosas no eran claras para mí, gracias.*

## DEDICATORIA

*A Dios y a la vida por permitirme haber llegado a esta etapa y poder concluirlo, porque a pesar de la tempestad ilumina mi camino.*

*A mis padres, Araceli González Aguilar y Nelson Osorio Reyes, quienes en los días más difíciles y cuando decaía mi ánimo, estuvieron siempre para mí dándome su amor incondicional y su apoyo, la culminación de esta etapa es gracias a su esfuerzo, esto es por y para ustedes, los amo.*

*A mi hermano, Alessandro Osorio González mi cómplice de risas, con quien siempre puedo contar y por todo su cariño, esto es para ti.*

*A mis abuelitos Julio César González Flores y Candelaria Aguilar Hernández, mis mayores ejemplos a seguir, me han inspirado a luchar por lo que quiero, además de demostrarme que ante la adversidad la vida puede prosperar y quienes siempre me han demostrado su apoyo.*

# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	3
1. Humedales y lagos .....	3
1.1 Definición.....	3
1.2 Estructura de los lagos .....	3
1.3 Estado trófico .....	6
1.4 Características fisicoquímicas.....	7
1.5 Ciclos biogeoquímicos .....	9
1.6 Origen de los lagos .....	12
2. Parque Nacional Lagunas de Montebello.....	13
2.1 Área natural protegida.....	13
2.2 Características generales PNLM .....	13
2.3 Generalidades de los lagos .....	14
3. Sedimentos.....	16
3.1 Definición.....	16
3.2 Función.....	16
3.3 Componentes.....	16
4. Rol de los microorganismos en ecosistemas acuáticos .....	18
4.1 Bacterias oligotróficas .....	18
4.2 Bacterias heterotróficas .....	18
5. Técnicas microbiológicas.....	19
5.1 Tinción de Gram.....	19
6. Técnicas moleculares .....	20
6.1 Extracción de ADN genómico .....	20
6.2 Fundamentos de la electroforesis.....	21
6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	22
6.4 Huellas genómicas bacterianas.....	24
6.5 ARNr 16S.....	25
6.6 Secuenciamiento del ADN genómico.....	27
7. Análisis informáticos del secuenciamiento de ADN .....	28
7.1 Base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). .....	29

7.2 Análisis filogenético .....	29
III. ANTECEDENTES.....	31
IV. ZONA DE ESTUDIO .....	33
V. OBJETIVOS.....	35
VII. MÉTODO .....	36
1. Determinación de los parámetros físico-químicos del sedimento .....	36
2. Aislamiento y purificación de bacterias.....	36
3. Descripción fenotípica de bacterias.....	37
4. Identificación molecular de bacterias.....	37
VII. RESULTADOS .....	39
1. Determinación de los parámetros físico-químicos del sedimento .....	39
2. Aislamiento de colonias .....	42
3. Descripción fenotípica de bacterias aisladas.....	42
4. Identificación molecular de bacterias aisladas de sedimentos de los lagos “Esmeralda” y “Encantada”.....	44
VIII. DISCUSIÓN .....	54
IX. CONCLUSIÓN.....	64
X. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES .....	65
XI. LITERATURA CITADA .....	66
XII. ANEXOS.....	79
Anexo 1.....	79

## ÍNDICE DE CUADROS

## Página

<b>Cuadro 1.</b> Nivel de correlación del Análisis de Componentes Principales (ACP) .....	40
<b>Cuadro 2.</b> Descripción morfológica de cultivos frescos y microscópica de los morfogrupos aislados de los lagos de Montebello.....	43
<b>Cuadro 3.</b> Cuantificación de ADN extraído utilizando el equipo NanoDrop One. ng/μl: nanogramos/microlitro. A260/280: Absorbancia 260 nm-280 nm. A260/230: Absorbancia 260 nm-230 nm. ....	44
<b>Cuadro 4.</b> Cuantificación de los productos de PCR utilizando el equipo NanoDrop One. ng/μl: nanogramos/microlitro. A260/280: Absorbancia 260 nm-280 nm. A260/230: Absorbancia 260 nm-230 nm. ....	46
<b>Cuadro 5.</b> Comparación de las secuencias obtenidas de los aislados con la base de datos NCBI.....	46



## ÍNDICE DE FIGURAS

## Página

<b>Figura 1.</b> Zonas de un lago con respecto a su temperatura. Tomado de Smith y Smith, 2001. ....	4
<b>Figura 2.</b> Zonas principales de un lago en función de la luz. Tomado de Smith y Smith, 2001. ....	5
<b>Figura 3.</b> Estado trófico según los perfiles de oxígeno. Tomado de Roldán y Ramírez, 2008. ....	8
<b>Figura 4.</b> Funciones y ciclo del carbono. Adaptación de Roldán y Ramírez, 2008. ....	9
<b>Figura 5.</b> Ciclo de nitrógeno en un ecosistema lacustre. Tomado de Roldán y Ramírez, 2008. ....	10
<b>Figura 6.</b> Ciclo de fósforo en un ecosistema lacustre. Tomado de Roldán y Ramírez, 2008. ....	12
<b>Figura 7.</b> Mapa de los 18 lagos del complejo lacustre del PNLN, obtenido de Alcocer <i>et al.</i> , 2016.....	15
<b>Figura 8.</b> Procedimiento de la tinción de Gram con los respectivos reactivos y observación de las células bacterianas durante el proceso, obtenido de Tortora <i>et al.</i> , 2007. ....	20
<b>Figura 9.</b> Protocolo de extracción de ZYMO RESEARCH, obtenido de instrucción del manual Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep Kit, s.d. ....	21
<b>Figura 10.</b> Esquema general de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR. Obtenido de Luque y Herráez, 2001. ....	24
<b>Figura 11.</b> Principio de la huella genómica. Adaptado de Rademaker <i>et al.</i> , 2004. ....	25
<b>Figura 12.</b> Estructura secundaria del ARNr 16S. Mostrando las hélices comunes de los seres vivos (1-48). Las regiones variables se designan de V1-V9. Adaptado de Bou <i>et al.</i> , 2011.....	26
<b>Figura 13.</b> Cebadores de ADN que carecen del grupo 3'-hidroxilo, obtenido de Madigan <i>et al.</i> , 2015.....	27
<b>Figura 14.</b> Esquema del procedimiento de secuenciamiento por el método de Sanger, obtenido de Shendure <i>et al.</i> , 2017. ....	28

<b>Figura 15.</b> Método para realizar análisis filogenéticos realizados con extracción de ADN genómico, obtenido de Madigan <i>et al.</i> , 2015. ....	30
<b>Figura 16.</b> Zona de estudio: Lagos “Encantada” y “Esmeralda”, con los puntos de muestreo. Reallizado con el programa QGis 3.10.1 A Coruña.....	34
<b>Figura 17.</b> Análisis de componentes principales (ACP) sobre los parámetros fisicoquímicos y la importancia de cada componente, agrupando los lagos la Encantada y la Esmeralda.....	41
<b>Figura 18.</b> ADN genómico de aislados del sedimento del PNLM. De izquierda a derecha marcador molecular 1 KB plus. 1: colonia ENC-EST-32, 2: colonia ESM-EST-61, 3: colonia ESM-EST-9, 4: colonia ESM-EST-44, 5: colonia ESM-LLU-12, 6: colonia ESM-LLU-20, 7: colonia ENC-EST-3, 8: colonia ENC-EST-1, 9: colonia ESM-LLU-38, 10: colonia ESM-LLU-21, 11: colonia ESM-EST-19, 12: colonia ENC-LLU-47 y 13: colonia ESM-LLU-10. ....	44
<b>Figura 19.</b> Patrones de BOX-PCR de los aislamientos bacterianos por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Marcador molecular 1 KB plus. 1 y 6: Grupo H. 2: Grupo D. 3 y 4: Grupo G. 5: Grupo A. 6: Grupo B. 7: Grupo C. 8: Grupo F. 9: Grupo I. 10: Grupo K. 11: Grupo L.12: Grupo E. 14: Grupo J. ....	45
<b>Figura 20.</b> Amplicones del gen ARNr 16S bacteriano aislado del sedimento del PNLM. De izquierda a derecha. Marcador molecular 1 KB plus. 1: ENC-EST-32, 2: ESM-EST-61, 3: ESM-EST-9, 4: ESM-EST-44, 5: ESM-LLU-12, 6: ESM-LLU-20, 7: ENC-EST-3, 8: ENC-EST-1, 9: ESM-LLU-38, 10: ESM-LLU-21, 11: ESM-EST-19, 12: ENC-LLU-47 y 13: ESM-LLU-10.....	45
<b>Figura 21.</b> Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género <i>Arthrobacter</i> . Las colonias identificadas en este estudio están remarcadas en letras rojas.....	48
<b>Figura 22.</b> Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género <i>Bacillus</i> . Las colonias identificadas en este estudio están remarcadas en letras rojas. ....	49
<b>Figura 23.</b> Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género <i>Rhodococcus</i> . Las colonias identificadas en este estudio están remarcadas en letras rojas.....	50

<b>Figura 24.</b> Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género <i>Deinococcus</i> . La colonia identificada en este estudio está remarcada en letras rojas. ....	51
<b>Figura 25.</b> Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género <i>Exiguobacterium</i> . La colonia identificada en este estudio está remarcada en letras rojas.....	52
<b>Figura 26.</b> Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género <i>Microbacterium</i> . La colonia identificada en este estudio está remarcada en letras rojas.....	52
<b>Figura 27.</b> Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género <i>Pseudomonas</i> . La colonia identificada en este estudio está remarcada en letras rojas.....	53
<b>Figura 28.</b> Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género <i>Bacillus</i> y <i>Psychrobacillus</i> . La colonia identificada en este estudio está remarcada en letras rojas.....	53
<b>Figura 29.</b> Morfología (arriba) y tinción (abajo) del género <i>Arthrobacter</i> . A) Colonia ESM-EST-9 B) Colonia ENC-EST-32 C) Colonia ESM-EST-44 D) Colonia ESM-EST-61.....	79
<b>Figura 30.</b> Morfología (arriba) y tinción (abajo) del género <i>Bacillus</i> . A) Colonia ENC-EST-1 B) Colonia ESM-LLU-3 C) Colonia ESM-LLU-12 D) Colonia ESM-LLU-20.....	79
<b>Figura 31.</b> Morfología (arriba) y tinción (abajo) del género <i>Rhodococcus</i> . A) Colonia ESM-EST-5 B) Colonia ESM-EST-16 C) Colonia ESM-LLU-17.....	80
<b>Figura 32.</b> Morfología (arriba) y tinción (abajo) de los géneros A) <i>Deinococcus</i> colonia ESM-LLU-38 B) <i>Exiguobacterium</i> colonia ESM-LLU-21 C) <i>Microbacterium</i> colonia ESM-EST-19 D) <i>Pseudomonas</i> colonia ENC-LLU-47 E) <i>Psychrobacillus</i> colonia ESM-LLU-10.....	80

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Página

<b>Gráfica 1.</b> Número de colonias aisladas de los lagos “Encantada” y “Esmeralda” en temporadas de estiaje y lluvia. ....	42
--	----

## RESUMEN

Los lagos de agua dulce tienen diferentes servicios medioambientales y una derrama económica importante. Dentro del estado de Chiapas se encuentra un complejo lacustre que consta de aproximadamente 60 lagos en el Parque Nacional Lagunas de Montebello (PNLM). Los lagos se han caracterizado por la belleza del color de sus aguas, sin embargo, recientemente, la coloración del lago “Encantada” ha cambiado de azul a colores verdosos e incluso olores azufrados, lo cual ha preocupado debido a los daños colaterales a la salud, ambiental y económica.

A pesar de esta problemática se desconocen las comunidades microbianas que albergan este ecosistema acuático. Por lo tanto, el objetivo de presente trabajo fue identificar bacterias aisladas de los sedimentos de los lagos “Esmeralda” y “Encantada” del PNLM. Se colectaron sedimentos en las temporadas de estiaje y lluvia y se determinaron la conductividad electrolítica, oxígeno, pH y temperatura, asimismo se determinó el contenido de carbono, nitrógeno y fósforo [(CO<sub>T</sub>), (N<sub>T</sub>) y (P<sub>T</sub>), respectivamente] con el fin de realizar un Análisis de Componentes Principales (ACP). Posteriormente se describió la morfología de las colonias bacterianas obtenidas mediante la siembra microbiológica. A partir de las bacterias aisladas, se determinaron los patrones de bandedo por medio de la técnica PCR-BOX, se amplificó el gen ARNr 16S y fue secuenciado. Las secuencias se compararon con la herramienta BLAST para realizar el análisis filogenético.

El lago “Esmeralda” presentó una concentración alta y una correlación entre las variables de CO<sub>T</sub> y N<sub>T</sub>, mientras que el lago “Encantada” mostró una concentración alta y correlación entre el pH y el oxígeno disuelto. Se aislaron 30 colonias en el lago “Encantada” y 45 aislados del lago “Esmeralda”. Los géneros identificados mediante el gen ARNr 16S fueron *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Deinococcus*, *Exiguobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Psychrobacillus* y *Rhodococcus*.

Esta investigación permitió por primera vez aislar e identificar bacterias nativas aislados de los sedimentos de los lagos de Montebello, las cuales fueron reportadas con potencial biotecnológico y una alternativa en la biorremediación y degradación de sustancias tóxicas de ecosistemas acuáticos.

Palabras clave: Aguas leníticas, ARNr 16S, microorganismos, sedimentos.

## I. INTRODUCCIÓN

Los cuerpos acuáticos continentales de México son de gran importancia para la vida silvestre, la biodiversidad y el ecoturismo. Asimismo, son esenciales para las diversas actividades humanas, incluidas la agricultura, el desarrollo industrial y urbano, además de beneficiar a la economía local (Alcocer, 2007).

Dentro de los sistemas acuáticos, los lagos son abundantes en las zonas del Golfo de México y el sureste. La mayoría son pequeños, con áreas superficiales de entre 0.01 y 0.1 kilómetros cuadrados. La distribución geográfica de los lagos naturales en México está asociada a las condiciones climáticas como una expresión de la disponibilidad de agua (*Ídem*). El estado de Chiapas cuenta con lagos que se encuentran dentro del Parque Nacional Lagunas de Montebello (PNLM), los cuales tienen el régimen de protección que mantiene la región como Área Natural Protegida en la categoría de Parque Nacional, dicho evento constituye el fundamento para la conservación de su diversidad biológica y de un gran número de funciones ambientales vitales. Los lagos del parque constituyen un complejo lacustre de origen cárstico, extendido entre los territorios mexicano y guatemalteco, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2007). Dentro de los lagos se encuentran partículas gruesas en el fondo y muy finas en la superficie denominados sedimentos, los lagos del PNLM están constituidos principalmente de arena arcilla y limo, su composición elemental contiene C, H, N y S (Alcocer *et al.*, 2018).

Durante la temporada invernal en los años 2008 y 2009, en el complejo lagunar conocido como Vuelta de Agua se reporta el fenómeno de cambio de coloración que se caracteriza por presentar actividad anormal, parecida al proceso de ebullición, posteriormente surge del agua una tintura amarillenta, luego sobreviene la mortandad de peces y se percibe un olor azufrado emanando de las laguna, Comisión Federal de Electricidad-Gerencia de Estudios de Ingeniería Civil (CFE-GEIC, 2012). Esto causa preocupación debido a impactos sobre la salud pública y la pérdida potencial de su atractivo turístico aunado a la economía local (Vera *et al.*, 2015).

A pesar de que esta problemática tiene varios años, se tiene un total desconocimiento de las características limnológicas, pese a contar con la categoría de parque nacional con una amplia variedad de servicios ecológicos (Alcocer *et al.*, 2016).

La Limnología abarca los sistemas biológicos, los cuales participan dentro de un sistema de agua dulce como son los sedimentos, que albergan comunidades microbianas altamente complejas con respecto a la composición de especies y actividad metabólica, y son ecológicamente importantes por su gran número en un hábitat distinto, además de ser participantes claves en los ciclos de nutrientes (Spring *et al.*, 2000), estos se han estudiado pero poco se sabe de la función que tienen en los sedimentos dentro de las lagunas y/o lagos en Chiapas.

Por tales motivos la presente investigación conlleva a la siguiente pregunta ¿Cuáles son los microorganismos cultivables que se encuentran en los sedimentos de dos lagos del PNLM en diferentes épocas del año? enfocándose en la identificación molecular de bacterias aisladas de sedimentos de los lagos “Esmeralda” y “Encantada” del Parque Nacional Lagunas de Montebello (PNLM), Chiapas. Esta aporta nueva información sobre la composición y estructura microbiana en los sedimentos en agua dulce. Esto implica la comprensión de las características fisicoquímicas del ecosistema, la función ecológica de los microorganismos que habitan dentro de los sedimentos. La información generada es un precedente para futuros trabajos sobre la búsqueda y aprovechamiento en diferentes aéreas del conocimiento como son la ambiental, ecológica y la biotecnológica, además de contribuir al diagnóstico ambiental y molecular de los lagos del PNLM.



## **II. MARCO TEÓRICO**

### **1. Humedales y lagos**

#### **1.1 Definición**

La Convención Ramsar, define como humedal a los ecosistemas naturales o artificiales que se caracterizan por estar permanente o temporalmente inundados, ya sea por aguas dulces, estuarinas o salinas, las cuales pueden estar estancadas o corrientes e incluyen las regiones ribereñas, costeras y marinas que no excedan los 6 metros de profundidad con respecto al nivel medio de las mareas bajas. Un lago pertenece a la clasificación de un humedal interior y es considerado como toda aquella depresión inundada aislada rodeada de tierra que no presentan ningún contacto con el mar y puede o no tener una salinidad variable, esto depende del tipo de afluente que los alimenta (Abarca, 2002).

Los lagos pertenecen a la categoría de aguas quietas o leníticas y se definen como una extensión de agua rodeada de tierra por todas partes, se caracterizan por ser normalmente de agua dulce, presentar un vaso bien definido con zonas litoral y bental profunda y bien diferenciadas, sedimento propio poblado de especies características, compartimentalización vertical con gradientes de luz, densidad y temperatura sujetos a variación estacional, que repercuten en los procesos biológicos y en la calidad del agua (Roldán y Ramírez, 2008). Su origen es del tipo continental, este no tiene comunicación directa con el mar y generalmente son grandes con más de ocho metros de profundidad, constituyen masas de aguas permanentes y que se depositan en una depresión del terreno (Abarca, 2002). Esta profundidad es suficiente para el establecimiento de una termoclina durante el periodo de estratificación (Margaleff, 1983).

#### **1.2 Estructura de los lagos**

Presentan fronteras bien definidas: la orilla las paredes de la cubeta, la superficie del agua y los sedimentos del fondo. La vida en estos ecosistemas depende de la luz. La cantidad de luz que penetra en el agua se ve influida no solo por la extinción natural, sino también por los sedimentos y otros materiales aportados al lago. La temperatura cambia tanto estacionalmente como por la profundidad. La disponibilidad de oxígeno puede ser limitada, principalmente en verano, ya que únicamente una pequeña porción

del agua está en contacto directo con el aire, mientras que es consumido por la descomposición en las capas profundas. Dichas variaciones en oxígeno, temperatura y luz determinan la distribución y adaptaciones de los seres vivos en los lagos (Smith y Smith, 2001). Como el agua es más densa a 4°C, puede volverse más ligera enfriando o calentando. El agua de menor densidad es flotante en comparación con el agua que es más densa. La mayor parte del intercambio de calor entre los lagos y el medio ambiente tiene lugar a través de la superficie del agua. El lago se calienta con radiación solar y se enfría mediante radiación (por ejemplo, de noche) y evaporación. A medida que el agua superficial que se enfría se vuelve más densa, se hunde hasta que encuentra agua de densidad aún mayor. Esto da lugar al perfil de temperatura típico de un lago estratificado con dos masas de agua separadas, el epilimnion cálido y el hipolimnion frío. Una región de mayor cambio de temperatura, conocida como metalimnion, separa estas dos capas, también conocida como termociclina (Lampert y Sommer, 2007) (Figura 1).

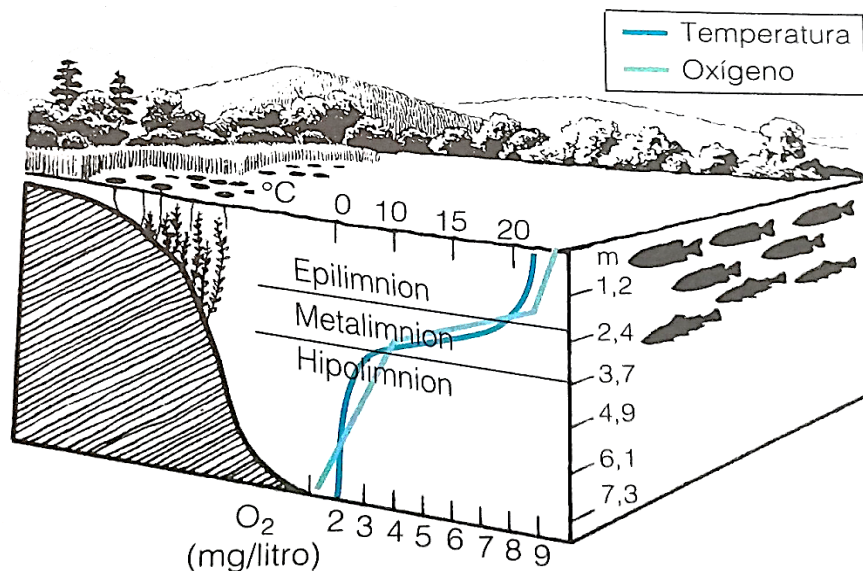


Figura 1. Zonas de un lago con respecto a su temperatura. Tomado de Smith y Smith, 2001.

Los lagos pueden dividirse en zonas verticales y horizontales (Figura 2) en función de la penetración luminosa y la actividad fotosintética, la zona vertical es la menos visible (Smith y Smith, 2001), conformada por la zona litoral que es el borde del

lago es una región poco profunda con ciertas características físicas, químicas y biológicas, el agua poco profunda permite la penetración de la luz en los sedimentos, que proporcionan sustrato para enraizar macrófitos, donde la vida acuática es más rica y abundante, además esta zona contribuye abundantemente al suministro de materia orgánica en el ecosistema, las bacterias, hongos y protozoos también están bien representados en esta parte del lago, y se presentan como comunidades mixtas de biopelículas (Sigeo, 2005). La zona limnética fótica, que abarca hasta la profundidad donde penetra la luz. Por debajo de la profundidad de la penetración efectiva de la luz encontramos la zona profunda. Su inicio está marcado por el nivel de compensación de la luz, el punto en el cual la respiración equilibra a la fotosíntesis. La vida depende del aporte de energía, nutrientes de la zona limnética, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno, los aportes energéticos depende de la caída de material orgánico desde la zona limnética. Las sustancias que se descomponen fácilmente son parcialmente mineralizadas a medida que va sedimentando hacia el fondo del lago. La zona bentónica es un lugar de descomposición con una gran actividad biológica, donde el oxígeno muestra un intenso descenso, donde los sedimentos cargados de residuos orgánicos tienen un contenido bajo de oxígeno y predominan las bacterias (Smith y Smith, 2001).

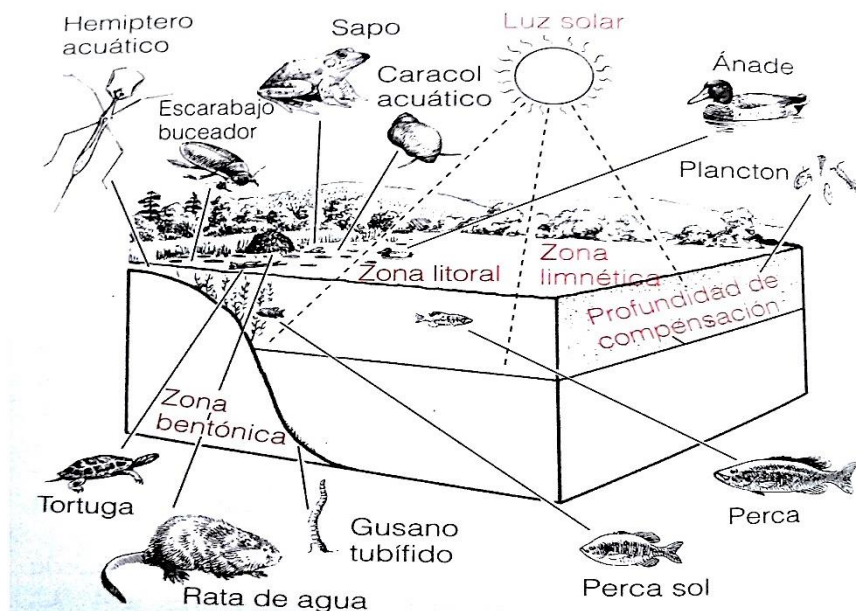


Figura 2. Zonas principales de un lago en función de la luz. Tomado de Smith y Smith, 2001.

### **1.3 Estado trófico**

El concepto de estado trófico fue elaborado por Naumann donde hizo hincapié en que la cantidad y posterior producción de algas fitoplanctónicas en los lagos estaba determinada por varios factores, particularmente el fósforo y el nitrógeno (Wetzel, 2001). El agua arrastra aluviones y nutrientes en solución, además que las actividades humanas añaden aún mayores cantidades de nutrientes, estos aportes enriquecen en nutrientes a los ecosistemas acuáticos, lo que se conoce como eutrofización. La palabra eutrofia (del griego *eutrophos*, bien nutrido) significa una condición de riqueza en nutrientes (Smith y Smith, 2001).

#### **1.3.1 Sistema eutrófico**

Los lagos eutróficos se caracterizan por floraciones de cianobacterias, concentración alta de nutrientes totales principalmente de nitrógeno y fósforo que estimula un intenso crecimiento de algas y plantas acuáticas, además de una gran variación en las concentraciones de O<sub>2</sub> (incluida la posible anoxia en el hipolimnión), y pueden tener muertes frecuentes de peces (Dodds y Whiles, 2010). La turbidez del agua reduce la penetración de la luz, restringiendo la productividad biológica a una delgada capa superficial. El fitoplancton se concentra en la capa superior cálida del agua, dándole un aspecto verde oscuro. Las algas, los residuos orgánicos y sedimentos que ingresan y los restos de plantas enraizadas descienden hasta el fondo, donde las bacterias se alimentan de esta materia orgánica muerta. Sus actividades agotan el suministro de oxígeno de los sedimentos del fondo y del agua profunda hasta el punto en el que esta región del lago no puede albergar vida aerobia (Smith y Smith, 2001).

#### **1.3.2 Sistema oligotrófico**

La oligotrofia es la condición de pobreza en nutrientes, aunque el nitrógeno puede ser abundante, el fósforo está muy limitado, por lo tanto, contiene baja biomasa de algas, y disminución en la productividad de las mismas, alta claridad y zonas fotónicas profundas, y pueden soportar la pesca en aguas frías (Dodds y Whiles, 2010). El agua es transparente y se ve azul o azul verdoso a la luz del sol. La baja producción de materia orgánica deja poco para los descomponedores, de manera que la concentración de oxígeno permanece elevada en el hipolimnion. Los sedimentos del fondo son principalmente inorgánicos. Aunque la cantidad de organismos en los lagos

y estanques oligotróficos puede ser baja, la diversidad de las especies a menudo es alta (Smith y Smith, 2007).

### **1.3.3 Sistema distrófico**

Los lagos que reciben grandes cantidades de materia orgánica de las tierras circundantes, particularmente en forma de materiales húmicos que tiñen el agua de marrón, se llaman distróficos (de *dystrophos*, desnutridos). Estas masas de agua generalmente se encuentran en sustratos turbosos, o en contacto con sustratos turbosos de pantanos o páramos que generalmente son muy ácidos. La vegetación litoral domina el metabolismo del lago y brinda una fuente de materia orgánica disuelta y en partículas (Smith y Smith, 2007).

## **1.4 Características fisicoquímicas**

### **1.4.1 Oxígeno disuelto**

El oxígeno es uno de los factores más importantes, con este se puede establecer la demanda bioquímica suspendida (sedimentación) y la nitrificación. La solubilidad del oxígeno en el agua depende de varios factores (temperatura, presión atmosférica, la salinidad, la contaminación, la altitud, las condiciones meteorológicas y la presión hidrostática). Los lagos tropicales acumulan menor materia orgánica en el fondo que los lagos de zona templada, y que, en un lago tropical, se presenta déficit de oxígeno, independientemente del patrón térmico y del nivel de biomasa fitoplanctónica (Roldán y Ramírez, 2008).

Existen diferentes tipos de perfiles de oxígeno en un lago (Figura 3). Perfil ortógrado: característico de la oligotrofia; la característica a tener en cuenta es que el porcentaje de saturación es más o menos 100% al aumentar la profundidad. Perfil clinógrado: en lagos eutróficos el oxígeno se agota rápidamente por procesos oxidativos, como resultado el hipolimnion es a menudo anaeróbico (Wetzel, 2001). Perfil heterógrado: ocasionado por aumento de la concentración de algas en el metalimnion; este se presenta cuando hay una mayor descomposición y respiración en el metalimnion, debido a la acumulación de materia orgánica facilitada por la mayor densidad del agua en esta zona o por presencia de poblaciones densas de zooplancton (Roldán y Ramírez, 2008).

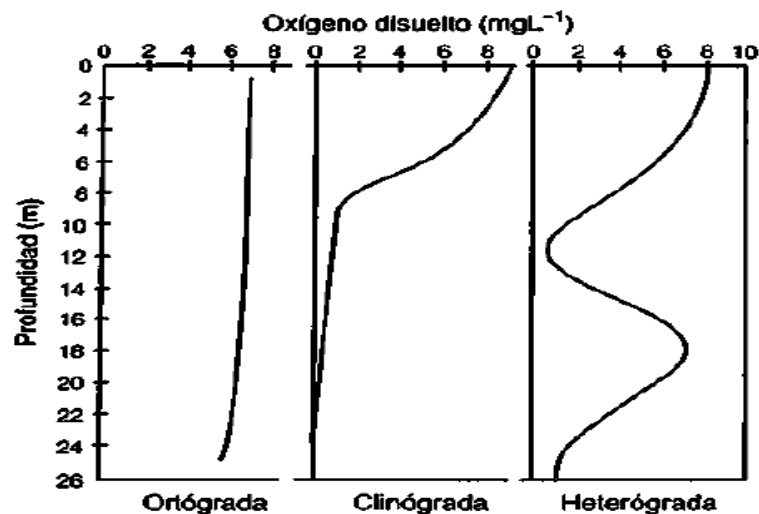


Figura 3. Estado trófico según los perfiles de oxígeno. Tomado de Roldán y Ramírez, 2008.

#### 1.4.2 pH

. Existen procesos principales que afectan el pH como son la fotosíntesis, la respiración y la asimilación de nitrógeno. Los efectos de la fotosíntesis y la respiración sobre el pH dependen en gran medida del equilibrio de carbonato-bicarbonato-dióxido de carbono (Lampert y Sommer, 2007). Además el pH está íntimamente relacionado con los cambios de acidez y basicidad, se define como el logaritmo en base 10 del recíproco de la molaridad de los iones de hidrógeno, en ecosistemas acuáticos con un pH mayor a 9 son influenciados por el mar (reciben grandes cantidades de  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{HCO}_3^-$ ) y en regiones ricas en  $\text{Ca}^{2+}$  (cársticas) (Roldán y Ramírez, 2008).

#### 1.4.3 Conductividad eléctrica

Es una medida conservativa, la cual se mide con un conductímetro que evalúa el flujo (o migración) de electrones (o iones) a través del agua. En los trópicos, están más relacionados con la naturaleza geoquímica del terreno y su concentración varía principalmente con las épocas de lluvia y de sequía, y con su estado trófico. Además, altas diversidades de especies corresponden, a menudo, a bajas conductividades y viceversa. (Roldán y Ramírez, 2008).

## 1.5 Ciclos biogeoquímicos

### 1.5.1 Ciclo del carbono

Los compuestos de carbono tienen un profundo efecto en la química del agua, son un componente de la fotosíntesis y la deposición ácida, e incluso pueden ser una amenaza para la salud humana. El ciclo del oxígeno, que se coloca en segundo lugar, está íntimamente relacionado con el ciclo del carbono a través de la fotosíntesis (Dodson, 2005). Normalmente hay una entrada neta de  $\text{CO}_2$  procedente de la atmósfera, a través de la región litoral. Este carbono persiste un tiempo en el sistema acuático, en forma de materia orgánica detrítica, que al fin se solubiliza. El resultado es el aumento de la tensión de  $\text{CO}_2$ , que hace reaccionar al agua con el carbonato cálcico, que se disuelve, aportando más carbono inorgánico al agua. Una asimilación muy intensa en superficie hace aumentar el pH del agua y precipita los carbonatos (Figura 4) (Margalef, 1983).

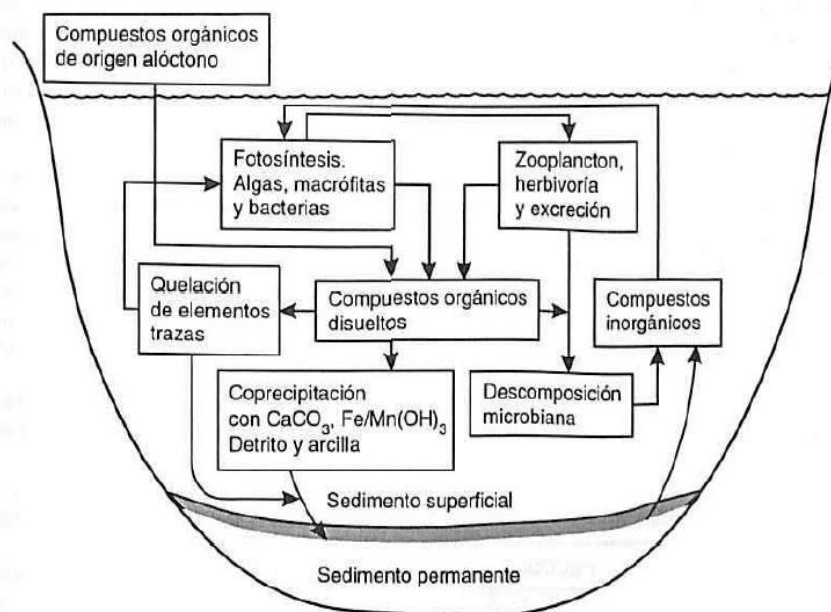


Figura 4. Funciones y ciclo del carbono. Adaptación de Roldán y Ramírez, 2008.

### 1.5.2 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno elemental ( $N_2$ ) se encuentra en la atmósfera, es removido constantemente por las descargas eléctricas, acción bacteriana y de ciertas algas. Durante las tormentas eléctricas, grandes cantidades de nitrógeno son oxidadas a  $N_2O_5$ , las cuales, al unirse con el agua, producen  $HNO_3$ , arrastrado a la tierra por la lluvia. Al disociarse el  $HNO_3$  en el agua produce  $NO_3^-$  (nitratos), que constituyen la forma química bajo la cual las algas y las plantas pueden incorporar nitrógeno en su citoplasma y utilizarlo para la síntesis de proteínas. El nitrógeno atmosférico también puede convertirse en proteínas por la acción de bacterias fijadoras de nitrógeno y ciertas algas (Roldán y Ramírez, 2008). La asimilación ocurre al incorporar el nitrógeno orgánico e inorgánico a los tejidos animales y vegetales. Por último la excreción de los organismos vivos devuelven el nitrógeno al medio ambiente como iones de amonio, urea o ácido úrico (Figura 5) (Dodson, 2005).

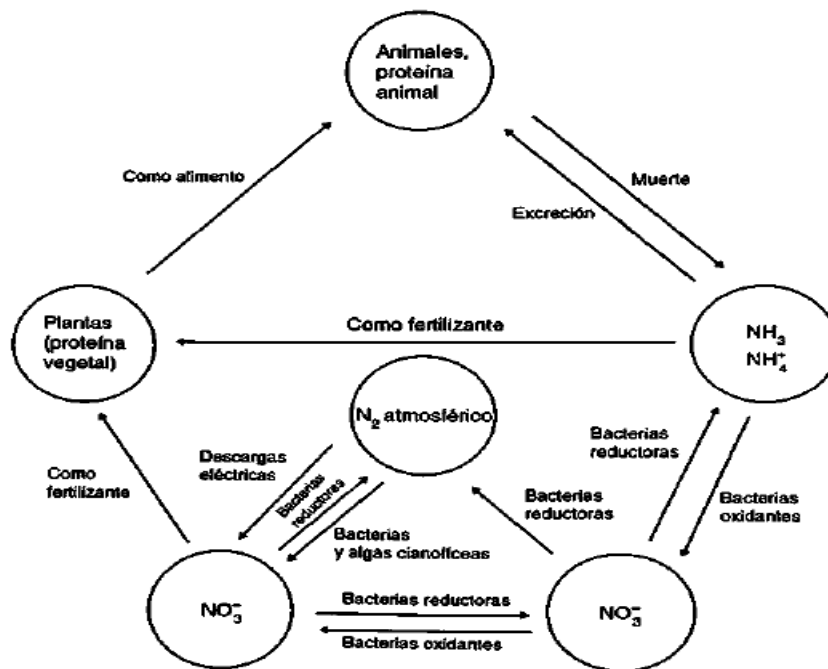


Figura 5. Ciclo de nitrógeno en un ecosistema lacustre. Tomado de Roldán y Ramírez, 2008.



### **1.5.3 Ciclo del fósforo**

El ciclo del fósforo es importante, porque es considerado el nutriente químico que limita el crecimiento de las plantas y las algas, además en exceso puede contaminar el agua, es el menos abundante de los nutrientes, asimismo, es el factor más limitante en la productividad primaria. Tiende a quedar atrapado en los sistemas de agua dulce debido a que es rica en calcio y magnesio, que se combinan con fosfato para formar precipitados insolubles. Además, los iones fosfato se adhieren fácilmente a rocas y minerales (especialmente arcillas), o con cualquier material orgánico suspendido en el agua y a coloides minerales (como el hidróxido férrico) que se forman en el agua (Dodson, 2005).

El intercambio de fósforo entre los sedimentos y la columna de agua constituye un paso largo y complejo en el ciclo del fósforo. El mecanismo que hace precipitar el fósforo y devolverlo de nuevo al agua depende de una serie de factores físicos, químicos y biológicos. Existe una cantidad mucho mayor de fósforo en los sedimentos que en la columna de agua, lo cual tiene que ver con la habilidad de los sedimentos para retomarlo, con las condiciones del agua y con el tipo de biota en los mismos sedimentos; juntos pueden alterar el retorno del fósforo a la zona trofocénica (Figura 6) (Roldán y Ramírez, 2008).

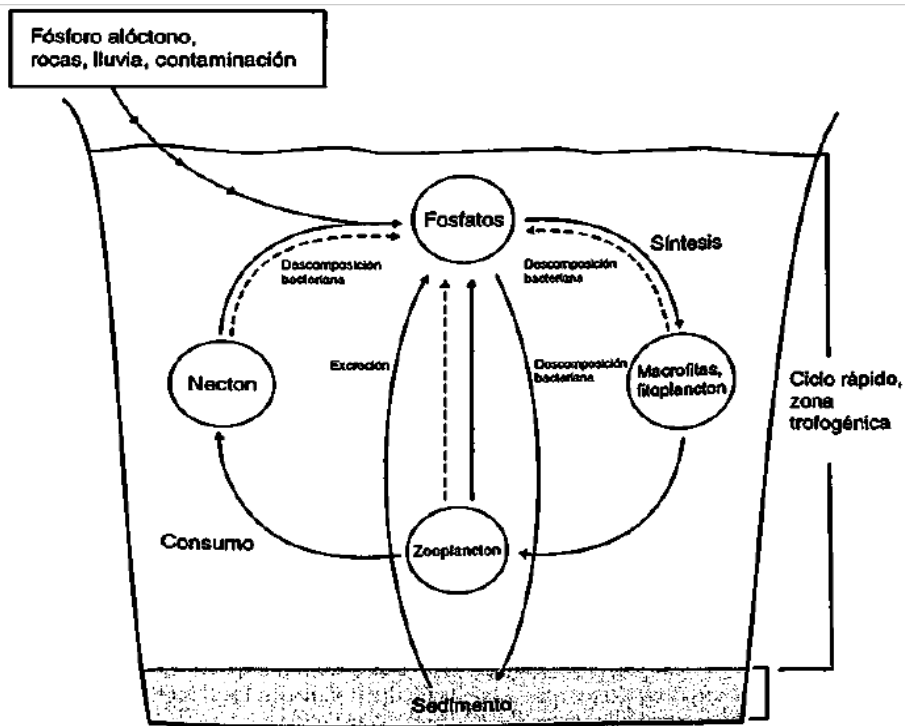


Figura 6. Ciclo de fósforo en un ecosistema lacustre. Tomado de Roldán y Ramírez, 2008.

### 1.6 Origen de los lagos

En términos geológicos los lagos son efímeros. Se originan como un producto de procesos geológicos y terminan como resultado de la pérdida del mecanismo de estanqueidad, por la evaporación causada por cambios en el equilibrio hidrológico o por el llenado causado por la sedimentación. Los mecanismos de origen son numerosos, en general existen 11 tipos principales de lagos (Mitra *et al.*, 2014).

La mayoría de los lagos naturales se formaron por catástrofes y otros por eventos graduales como los lagos por disolución de sustrato que son el resultado de sumideros, denominados dolinas, formados por la disolución gradual de rocas, como la piedra caliza, a lo largo de fisuras y fracturas. Finalmente, la superestructura se debilita hasta el punto de colapsar en la depresión (Wetzel, 2001). Son propios de regiones donde el terreno tiene una composición calcárea, la disolución se favorece por la presencia de aguas cargadas de ácido carbónico ( $H_2CO_3$ ) formado por la hidratación del  $CO_2$  (Roldán y Ramírez, 2008). La formación de este tipo de lago se han encontrado en la

península de Yucatán en México y el norte de Guatemala que es una región kárstica salpicada de sumideros (Cowgill *et al.*, 1966; Dodson, 2005).

## **2. Parque Nacional Lagunas de Montebello**

### **2.1 Área natural protegida**

Los bienes y servicios ecológicos que producen los ecosistemas del PNLM permiten que el régimen de protección se mantenga en la región Lagunas de Montebello como Área Natural Protegida en la categoría de Parque Nacional constituye el fundamento para la conservación de su diversidad biológica y de un gran número de funciones ambientales vitales. A partir del conocimiento de la problemática del parque, de sus recursos naturales y de la forma actual de aprovecharlos, el Programa de Conservación y Manejo plantea la organización y coordinación de acciones para proteger una de las más relevantes reservas forestales del estado de Chiapas. El PNLM está localizado en la región Sur-Sureste del estado de Chiapas, en la frontera con Guatemala, abarca una superficie de 6,425 hectáreas y comprende parte de los municipios La Independencia y La Trinitaria; este último abarca 95% de la superficie del ANP. Sus coordenadas extremas son 16° 04' 40" y 16° 10' 20" Latitud Norte y 91° 37' 40" y 91° 47' 40" Longitud Oeste (SEMARNAT, 2007).

### **2.2 Características generales PNLM**

#### **2.2.1 Características físicas**

Predominan materiales de origen marino, con depósito de organismos y materiales sedimentarios que al consolidarse formaron rocas calizas, estas se caracterizan por la carstificación de las rocas, es decir, la disolución de los carbonatos por la actividad química del CO<sub>2</sub> en el agua, este proceso está acompañado de una acumulación relativa de materiales residuales en las calizas, sobre todo arcillas. El producto de este proceso es la formación y ampliación de complejos sistemas subterráneos de cuevas y canales interconectados que constituyen almacenes y conductos temporales o permanentes del manto freático o cárstico (SEMARNAT, 2007).

El PNLM se encuentra ubicado en la provincia fisiográfica de los Altos de Chiapas también conocida como Macizo Central de Chiapas y constituye una de las proyecciones septentrionales del sistema montañoso centroamericano. Separa la

Depresión Central de Chiapas de la Sierra Lacandona, Sierra Norte de Chiapas y Llanura y Pantanos Tabasqueños (CFE-GEIC, 2012).

### **2.2.2 Clima**

Las temperaturas medias no presentan cambios significativos entre sí, situándose alrededor de 17.5°C. En promedio la época más calurosa del año se registra entre los meses de mayo a octubre. Por otro lado, la precipitación media anual es de 1482.6 mm, y no hay una distribución uniforme de la precipitación, puesto que los valores varían de un mínimo de 895.1 mm hasta un valor máximo de 2587.9 mm. Los meses más lluviosos son de junio a septiembre, este último es el mes con los máximos valores de precipitación, por lo cual la mayor precipitación ocurre en verano (Mora *et al.*, 2016).

### **2.2.3 Vegetación**

La vegetación predominante del Parque es bosque de clima templado. Las principales asociaciones vegetales son: bosque de coníferas, bosque de latifoliadas, bosque mesófilo de montaña, vegetación riparia, vegetación secundaria y zonas de cultivo. La comunidad vegetal más importante es el bosque de coníferas. La especie más abundante es *Pinus oocarpa* (SEMARNAT, 2007).

### **2.3 Generalidades de los lagos**

Los lagos del Parque constituyen un complejo lacustre de origen cárstico, extendido entre territorio mexicano y guatemalteco. La alimentación de las aguas lacustres es principalmente subterránea (Vásquez y Méndez, 1994). Los lagos presentan variables morfológicas: la existencia de orillas, pequeñas playas o zonas inundables y los lagos formados en dolinas con paredes escarpadas carecen de orillas planas y cuentan con espejos lacustres relativamente profundos. Los manantiales que nacen en esta zona se encuentran en el extremo Sureste del Parque, forman parte de la cuenca del Río Santo Domingo (SEMARNAT, 2007).

Los lagos tienen dimensiones morfométricas que varían ampliamente, incluyendo lagos grandes y profundos, grandes y poco profundos, pequeños y profundos, y pequeños y poco profundos. Los 18 lagos (Figura 7) que han sido examinados se

dividen en tres grupos: a) el ancho y la profundidad más bajas (Agua Tinta, Esmeralda, Chajchaj, Balantetic, Patianu, Ensueño, Dos Lagos, Yalalush, Kichail y Liquidambar), b) la más profunda (La Encantada, Cinco Lagos, Pojoj) y c) la más ancha (San José, Bosque Azul, Montebello, San Lorenzo y Tzisco). Cabe resaltar que seis lagos se encuentran entre los lagos más profundos de México y tienen una profundidad máxima promedio de más de 50 m; el lago más profundo tiene una profundidad máxima de 198 m. Estas profundidades favorecen la estratificación prolongada, lo que aumenta la probabilidad de acumulación de contaminantes (Alcocer *et al.*, 2016).

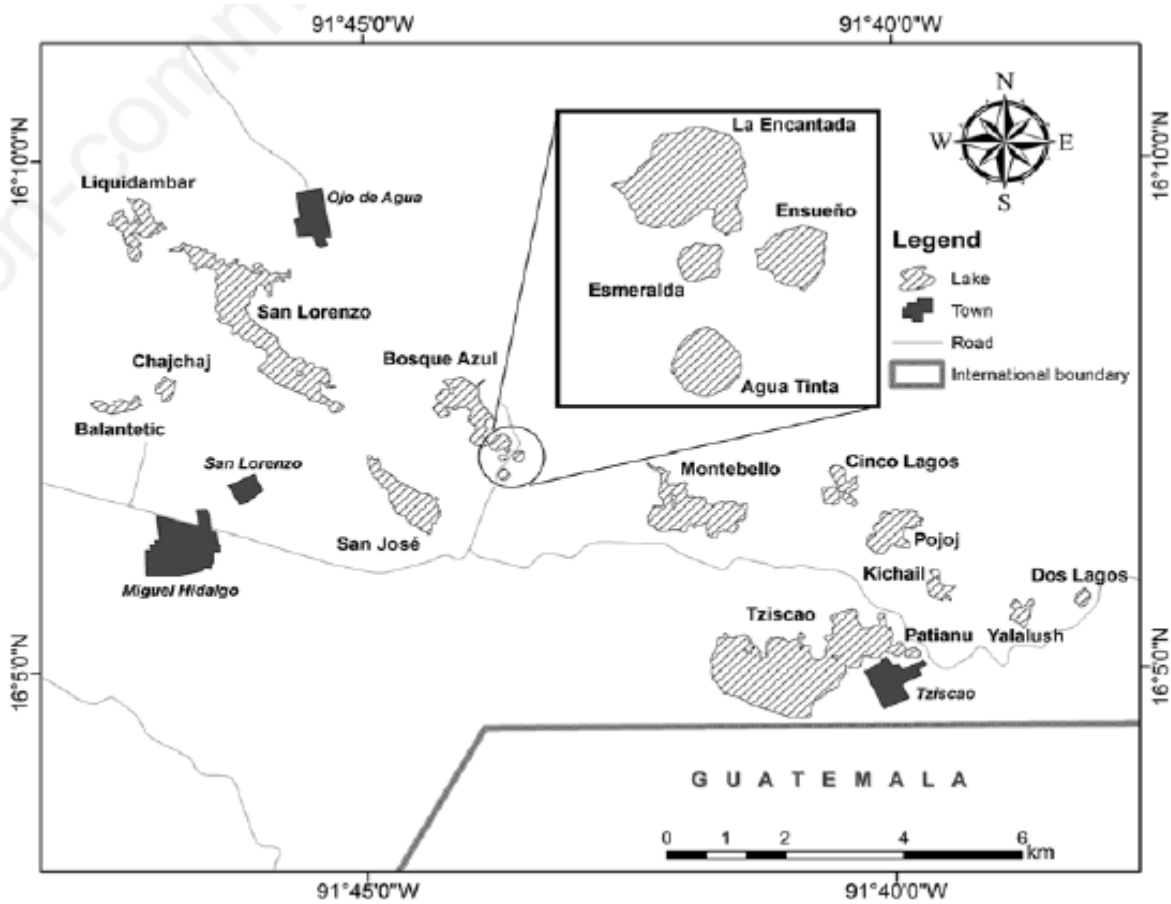


Figura 7. Mapa de los 18 lagos del complejo lacustre del PNLM, obtenido de Alcocer *et al.*, 2016

### **3. Sedimentos**

#### **3.1 Definición**

Representa la acumulación de materiales arrastrados o alóctonos, o bien producidos en la misma masa de agua o autóctonos, minerales (evaporitas, arcillas, fragmentos de rocas o materiales clásticos, minerales formados en la propia agua) y orgánicos (organismos enteros que mueren en el sedimento, organismos muertos y fragmentos de los mismos, excrementos, materia orgánica floculada, material detrítico alóctono) (Margalef, 1983). El proceso por el cual las partículas caen del agua en movimiento. Las partículas grandes (piedras y arena) caen primero, mientras que los limos finos tardan más en dejar la suspensión se llama sedimentación (Dodson, 2005).

#### **3.2 Función**

La entrada de sedimentos y de materia orgánica proporciona la materia prima que crea la estructura física del hábitat, los refugios, los sustratos y los sitios de desove, provee y almacena los nutrientes que sustentan a las plantas y los animales acuáticos, que en gran medida son responsables de la mayoría del trabajo de purificación del agua, descomposición y reciclado de nutrientes (Baron *et al.*, 2003). Además, los sedimentos de los lagos de agua dulce contienen las mayores cantidades de productos químicos y, por lo tanto, albergan una alta biomasa microbiana que, junto con la actividad son generalmente más altas cerca de la superficie del sedimento y continúan disminuyendo con la profundidad. Las bacterias constituyen un componente importante de la red alimentaria, el proceso de descomposición y el ciclo de nutrientes (Kurt, 2019).

### **3.3 Componentes**

#### **3.3.1 Materiales inorgánicos**

Los sedimentos contienen entre el 20% y el 80% de su volumen en agua. El material inorgánico se puede repartir en cuatro grupos principales: 1) evaporitas; 2) arcillas y calizas no afectadas directamente por las actividades de los organismos; 3) minerales diversos, elementos metálicos no afectados por las actividades biológicas y 4) compuestos minerales afectados por las actividades biológicas, sea directamente por consumo y regeneración (Margalef, 1983).

### **3.3.2 Materiales orgánicos**

En el sedimento se encuentran entre 10% y 30% de material orgánico, se distingue entre material que conserva una estructura, que permite conocer su origen y el material amorfo. La fracción del material orgánico en el sedimento depende de la rapidez de descomposición, función y principalmente de la disponibilidad de oxígeno. Un lago muy productivo aporta mucho material y limita su descomposición por la baja concentración de oxígeno del hipolimnion (Margalef, 1983).

#### **3.3.2.1 Azúcares**

Entre los monosacáridos la glucosa suele ser la principal y es relativamente estable, los glúcidos simples suelen ser el resultado secundario de la actividad bacteriana (Margalef, 1983). Una serie de estabilidad natural para los carbohidratos en un ambiente lacustrino es: bastante estable: xilosa, glucosa, ramnosa, arabinosa; moderadamente estable: ribosa, manosa; bastante inestable: galactosa; muy inestable: ácido glucurónico (Rogers, 1965).

#### **3.3.2.2 Aminoácidos**

Comprenden del 15 al 36% en peso, en los ácidos húmicos y fúlvicos extraídos de sedimentos carbonatados, estos se caracterizan por una composición de aminoácidos que consiste principalmente en los aminoácidos ácidos, ácido aspártico y glutámico (Carter y Mitterer, 1978). La valina, alanina, cisteína y el ácido glutámico se conservan mejor. Los de carácter ácido se conservan mejor en un medio neutro; los aminoácidos básicos (lisina, histidina y arginina) se conservan mejor entre materiales de pH más bajo (Margalef, 1983).

#### **3.3.2.3 Lípidos**

Se tiene un interés especial, por su valor como indicador biológico. El sedimento de los lagos contiene entre 0.2% y 6% de lípidos. Entre los no polares (hidrocarburos) se suele contener entre el 10% y el 30% de saturados, otro tanto de aromáticos, y del 45% al 70% de asfaltenos. La proporción de estos últimos en los lagos eutróficos tiende a ser mayor que en los oligotróficos (Margalef, 1983). Los ácidos carboxílicos, pueden existir en sedimentos en un estado libre y también esterificados a alcoholes de cadena larga (Cranwell, 1982).

### **3.3.2.4 Otras moléculas**

Se encuentra una variedad de carotenoides, algunos son característicos de grupos de algas definidos, como la mixoxantofila lo es de las cianofíceas. La diversidad de pigmentos en el sedimento tiende a aumentar en los lagos eutróficos; reflejando mayor probabilidad de conservación en un medio poco oxidante (Margalef, 1983).

## **4. Rol de los microorganismos en ecosistemas acuáticos**

Es bien conocida la importancia de los procariotas en los lagos, arroyos y ríos para la producción, la regeneración y la movilización de nutrientes. En conjunto la gran diversidad procariótica en los lagos de agua dulce refleja el carácter dinámico de estos hábitats. Normalmente, los aportes de nutrientes endógenos y exógenos que los lagos reciben varían según las estaciones siguiendo un patrón que favorece a la comunidad procariótica compleja metabólicamente (Madigan *et al.*, 2015). Específicamente las bacterias juegan distintas funciones, contribuyen a la biodiversidad genética y molecular y son los principales microorganismos heterotróficos en los sistemas acuáticos, además, tienen roles claves en los ciclos geoquímicos, reciclan los productos secretores de algas a través del circuito microbiano, compiten y forman asociaciones claves con algas, por último son colonizadores formando biopelículas en diferentes tipos de sustratos (Sigee, 2005).

### **4.1 Bacterias oligotróficas**

Las bacterias oligotróficas son organismos que se adaptan evolutivamente para explorar nichos ecológicos caracterizados por bajas concentraciones de sustratos y flujos bajos de energía. Estos no solo sobreviven, sino que se multiplican de manera especial en suministros muy bajos de nutrientes y, a menudo discontinuo (Schutl *et al.*, 1997).

### **4.2 Bacterias heterotróficas**

Las bacterias heterotróficas se alimentan de los productos excretorios (carbono orgánico disuelto) del fitoplancton y tienen picos importantes que siguen a las floraciones de algas (Straskrabova y Komarkova, 1979; Sigee, 2005). La mayoría de las bacterias acuáticas son de este tipo y viven en sustancias orgánicas procedentes del material muerto de origen animal o vegetal (Roldán y Ramírez, 2008). Además, la



mayor parte de la fijación no fotosintética de CO<sub>2</sub> en ambientes de agua dulce es realizada por estos microorganismos (Sigeo, 2005).

## **5. Técnicas microbiológicas**

### **5.1 Tinción de Gram**

Los microorganismos, la mayoría de las veces es necesarios teñirlos para que, por medio del uso de colorantes permitan hacerlos visibles, revelen su forma y tamaño, muestren la presencia de estructuras internas y externas, además producen reacciones químicas específicas. Esto permite su fácil identificación; y, la presencia de ciertas estructuras, así como su reacción a determinadas técnicas, permite separar a las bacterias. Las tinciones se pueden clasificar como simples cuando toda la muestra se tiñe del mismo color y se utiliza un sólo colorante y la tinción diferencial, cuando se visualiza más de un color (López *et al.*, 2014).

El Médico danés Hans Christian Gram desarrolló una importante tinción bacteriológica. La tinción de Gram diferencia a las bacterias en dos grandes grupos. Las bacterias Gram positivas, aquellas que retienen la tinción azul-violeta, y se denomina bacterias Gram negativas a las que se decoloran y después se tiñen con safranina. Esta diferencia de tinciones se debe a la estructura de las paredes celulares de ambos tipos de bacterias (Rodríguez y Arenas, 2018).

El mecanismo se basa en diferencias en la estructura de la pared celular de las bacterias gramnegativas y grampositivas y en la forma que reaccionan frente a diversos reactivos. El principal colorante que emplea esta técnica (violeta de genciana o cloruro de metilrosanilina) tiñe de color violeta las células, por que ingresa en el citoplasma de ambos tipos. La aplicación de yodo (el mordiente) determina la formación de cristales con el colorante que no puede atravesar la pared celular debido a su gran tamaño (Tortora *et al*, 2007). Luego la célula se trata con alcohol. Las células grampositivas que conservan el complejo de violeta de genciana-yodo adquieren un color azul y las células gramnegativas se decoloran por completo con la adición de alcohol. Como último paso se aplica otro colorante (como rojo de safranina) de forma

que las células gramnegativas decoloradas adquieran un color contrastante; las células grampositivas adquieren un color violáceo (Carroll *et al.*, 2016) (Figura 8).

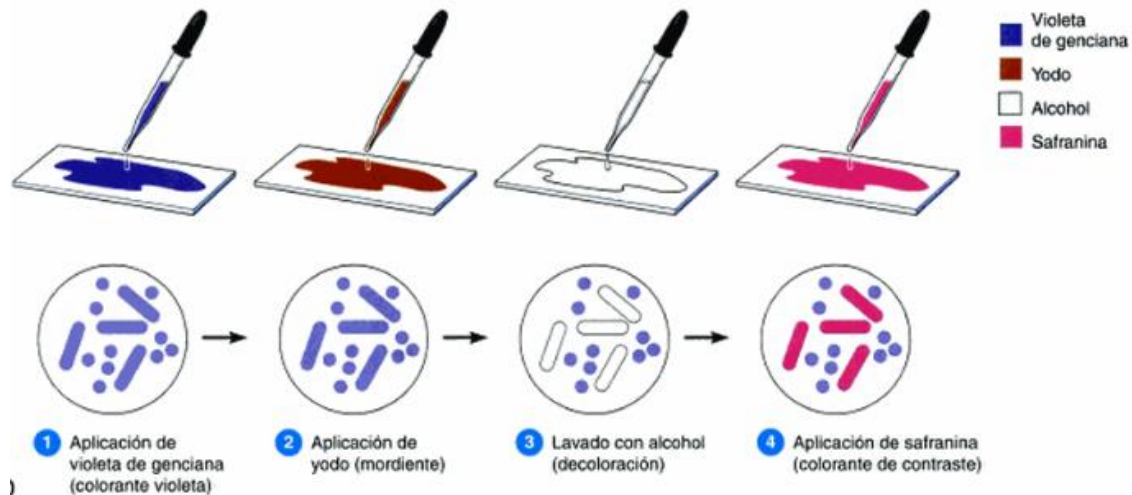


Figura 8. Procedimiento de la tinción Gram con los respectivos reactivos y observación de las células bacterianas durante el proceso, obtenido de Tortora *et al.*, 2007.

## 6. Técnicas moleculares

### 6.1 Extracción de ADN genómico

Dada su complejidad macromolecular, los ácidos nucleicos son difíciles de separar de los componentes de membrana, proteína residual y otras moléculas solubles. Existen métodos para eliminar las impurezas todos ellos basados en las propiedades físico-químicas del ácido nucleico. Este tiene una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolverse en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como  $\text{Na}^+$  que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite (Luque y Herráez, 2001).

Con los protocolos comerciales (Figura 9) se genera la unión del ADN a la matriz inorgánica y lavado. Antes de pasar la solución de lisis a través de la columna, se adiciona etanol a la solución, eliminando la capa hidratante del ADN y exponiendo sus grupos fosfato, facilitando con ello la adsorción de la molécula a la membrana cargada positivamente. Los lípidos y proteínas no son afines a la membrana y se eliminan con ayuda de la solución de lavado y un ciclo de centrifugación, mientras que el material genético permanece unido a la matriz. En los kits es necesario liberar al ADN de la matriz. La membrana y el ADN se deshidratan con soluciones de lavado y ciclos de centrifugación, después se recomienda centrifugar nuevamente la columna para evaporar el etanol y eliminar el exceso de las soluciones. Posteriormente, se adiciona agua o solución amortiguadora al centro de la membrana, se espera a que el ADN se hidrate, se centrifuga para recuperarlo de la matriz y resuspenderlo (Alejos *et al.*, 2014).



Figura 9. Protocolo de extracción de ZYMO RESEARCH, obtenido de instrucción del manual Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep Kit, s.d.

## 6.2 Fundamentos de la electroforesis

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura

tridimensional. Es de destacar que, a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas (Morales y Gallo, 2006).

Los geles de agarosa tienen un poder de resolución mucho menor que los de poliacrilamida, porque no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño menos de unas 50 pb. Sin embargo, el rango de tamaños que pueden separarse es mucho mayor en un gel de agarosa (moléculas desde 50 pb hasta unos 40 kb) dependiendo de la concentración del mismo (0.3-2% p/v); cuanto más baja es la concentración de agarosa mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa (Fierro, 2014).

### **6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR permite la síntesis específica y exponencial de una región de ADN predeterminada mediante el uso de dos pequeños fragmentos de ADN diseñados específicamente (cebadores u oligonucleótidos), que forman los dos extremos de la molécula de ácido nucleico que se amplificará (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Es considerada como una herramienta con el objetivo de la amplificación directa de un gen o fragmento de ADN, es un método adecuado para preparar ácidos nucleicos en una cantidad muy superior a la de la muestra original (Luque y Herráez, 2001).

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (De Dios *et al.*, 2013).

### **6.3.1 Elementos de la PCR**

Se requiere de información previa de las secuencias que flanquean el ADN blanco, sobre esta se diseñan dos oligonucleótidos cebadores, estas secuencias diferentes denominadas «forward» o sentido y otra «reward» o antisentido, son complementarios de las secuencias por fuera de los extremos 3' del sitio blanco y se unen a ellas en forma específica (Passarge, 2007).

El elemento principal es el ADN, tiene una carga eléctrica negativa y está dada por los grupos fosfatos. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de sintetizar las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima Taq ADN polimerasa, proveniente de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, que es capaz de soportar altas temperaturas. Otro elemento son los dNTP's que son las bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción. El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción. Por último, el agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas (De Dios *et al.*, 2013)

### **6.3.2 Desarrollo de la PCR**

Durante el procedimiento (Figura 10) las moléculas de ADN de cadena doble se desnaturalizan, cada cadena simple sirve como molde para la síntesis de una nueva cadena, y luego se renaturalizan con una cadena complementaria, es una reacción en cadena de 25 a 35 ciclos. Cada ciclo, que involucra tres reacciones (Passarge, 2007).

Desnaturalización: calentamiento para la separación de las dos hebras del ADN, mediante una incubación breve (30-120 s) a una temperatura entre 68 y 97°C, que debe ser superior a la de fusión de la región de ADN que se quiere amplificar. Templado (o hibridación): enfriamiento rápido por debajo de la temperatura de fusión de forma que se permite la hibridación de las hebras sencillas del ADN de interés con los cebadores. Generalmente se usan temperaturas de 37 a 65°C que se mantienen entre 10 y 20 s. Por último, la elongación considerada la etapa de amplificación propiamente dicha (72-75°C, 1-3 min), en la que el ADN polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales. La replicación

transcurre en dirección 5'-3' a partir del extremo 3' -OH de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro dNTPs, hasta terminar la lectura del molde o hasta que se comience una nueva etapa de desnaturalización (Luque y Herráez, 2001).

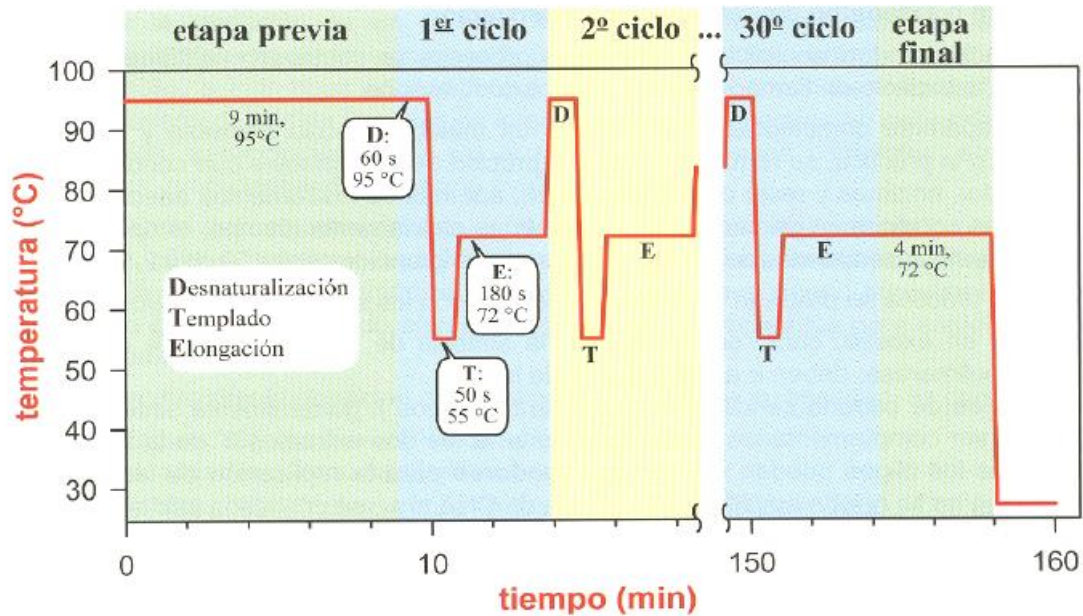


Figura 10. Esquema general de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR. Obtenido de Luque y Herráez, 2001.

#### 6.4 Huellas genómicas bacterianas

Para la caracterización de microbios se utilizan cada vez más los métodos basados en ADN y PCR ya que son más confiables, simples y a menudo económicas para identificar y clasificar. Por lo tanto, se han ideado otros enfoques basados en el ADN que tienen como objetivo generar rápidamente "huellas genómicas" del ADN de microorganismos (Figura 11). Se han utilizado tres familias de elementos repetitivos para este tipo de análisis, a saber, la secuencia palindrómica extragenética repetitiva (REP) de 35-40 pb, y la de consenso intergenéticas repetitivas enterobacterianas (ERIC) de 124-127 pb, además el elemento BOX de secuencia de 154 pb. Estos elementos parecen estar ubicados en posiciones diferentes e intergenéticas a lo largo de los genomas microbianos (Rademaker *et al.*, 2004).

Los elementos BOX están ubicados dentro de regiones intergénicas y también pueden formar estructuras de tallo y bucle debido a su simetría de díada. Son elementos repetitivos en mosaico compuestos de varias combinaciones de tres secuencias de subunidades denominadas boxA, boxB y boxC. Las tres secuencias de subunidades tienen longitudes moleculares de 59, 45 y 50 nucleótidos, respectivamente. Los elementos BOX no tienen relación de secuencia con REP o ERIC. Si bien inicialmente se pensó que era exclusivo de *Streptococcus pneumoniae*, ahora se han encontrado elementos BOX en varias especies bacterianas (Olive y Bean, 1999).

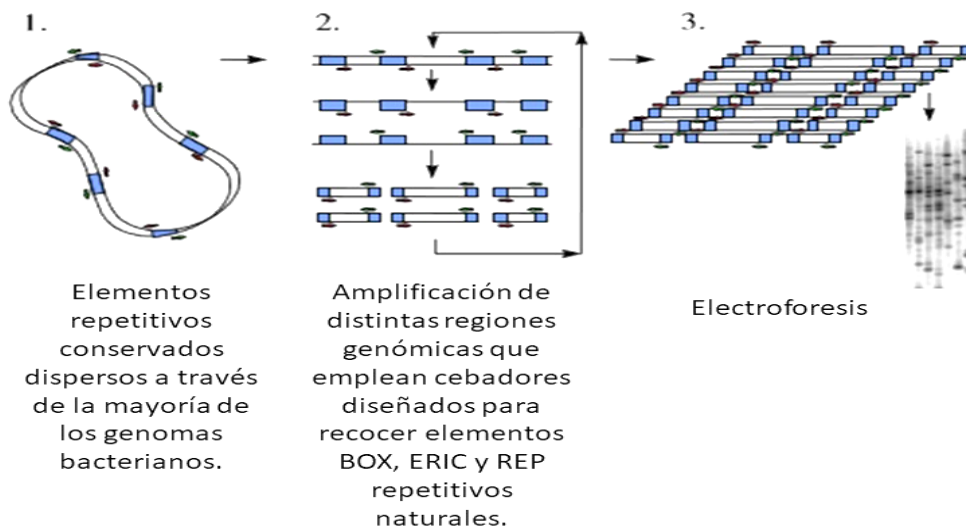


Figura 11. Principio de la huella genómica. Adaptado de Rademaker *et al.*, 2004

### 6.5 ARNr 16S

Es considerado un marcador molecular ya que cumple con las características de contener una variabilidad y una divergencia genética significativa a nivel de especie, poseer sitios conservados adyacentes y una longitud adecuada que permita la extracción y secuenciación, la secuencia del ARNr 16S es utilizado como una herramienta para la reconstrucción de relaciones filogenéticas. Este es un polirribonucleótido que es codificado por el gen *rrs*, que contiene nueve regiones (V1-V9) hipervariables y posee un tamaño de 1500 nucleótidos (Figura 12) (Valenzuela, 2015). Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas. Los cebadores universales

elegidos son complementarios a las zonas conservadas del inicio del gen, en la zona de 540 pb, y al final del mismo. Las zonas variables, comprendidas entre estas zonas conservadas son las regiones utilizadas para realizar taxonomía (Bou *et al.*, 2011). Tiene una estructura que parece mantenerse por periodos largos de tiempo, y por lo tanto su función no cambia, las modificaciones en las secuencias probablemente son aleatorios. El ARNr posee suficiente variabilidad para diferentes organismos alejados y próximos, además ayuda a la diferenciación de especies, cepas o variedades (Valenzuela, 2015).

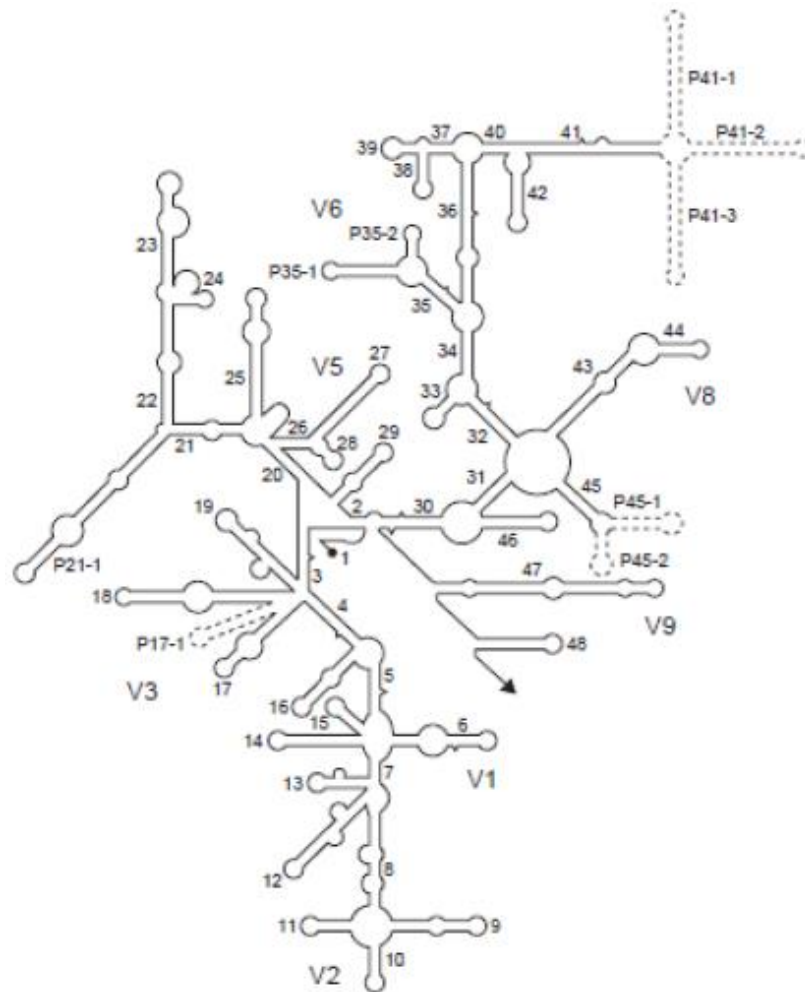


Figura 12. Estructura secundaria del ARNr 16S. Mostrando las hélices comunes de los seres vivos (1-48). Las regiones variables se designan de V1-V9. Adaptado de Bou *et al.*, 2011.



## 6.6 Secuenciamiento del ADN genómico

El término secuenciación en Biología se refiere a determinar el orden preciso de las subunidades en una macromolécula. En el caso del ADN, la secuencia es el orden en el que están alineados los nucleótidos. El método de secuenciación inventado por el científico Fred Sanger emplea cebadores oligonucleótidos de ADN de pequeño tamaño (usualmente 10-20 nt) y secuencia definida que son sintetizados de manera artificial. En Biotecnología durante la replicación de ADN *in vivo* se emplean cebadores de ADN, ya que son más estables que los de ARN (Figura 13) (Madigan *et al.*, 2015).

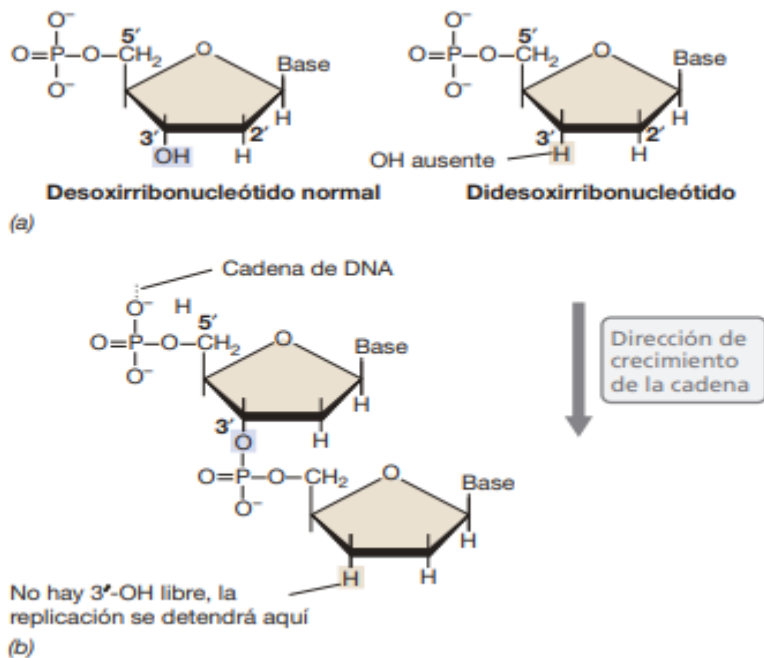


Figura 13. Cebadores de ADN que carecen del grupo 3'-hidroxilo, obtenido de Madigan *et al.*, 2015.

La técnica enzimática (Figura 14) se basa en la interrupción controlada de la replicación del ADN *in vitro*. Se realiza una PCR del fragmento que se va a secuenciar pero, a diferencia de una PCR convencional, se utiliza un solo iniciador y se agregan dideoxirribonucleótidos (ddNTPs) que carecen del grupo hidroxilo en el extremo 3' (Figura 3) y están marcados con radiactividad o con fluoróforos. Cuando se incorpora un dideoxirribonucleótido a la cadena en elongación, se termina su amplificación, de tal manera que al final, se tienen fragmentos de diferente longitud, cada uno terminando en un ddNTPs (Figura 4). Los fragmentos obtenidos, se separan y analizan

electroforéticamente de manera manual o automática, para cada base se utiliza un color diferente y las cuatro reacciones se realizan en una misma corrida de gel de electroforesis y los resultados son analizados por un ordenador (Márquez *et al.*, 2014).

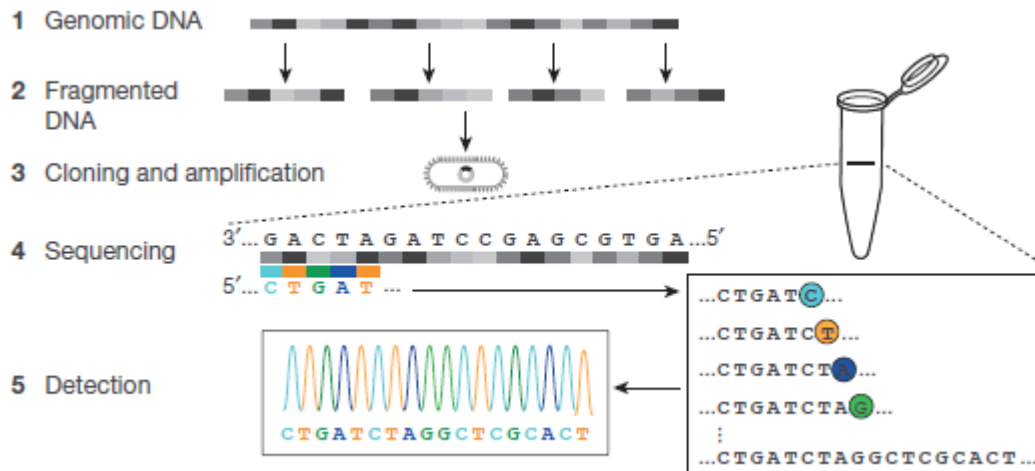


Figura 14. Esquema del procedimiento de secuenciación por el método de Sanger, obtenido de Shendure *et al.*, 2017.

## 7. Análisis informáticos del secuenciamiento de ADN

Las secuencias deben ser ensambladas antes de ser analizadas. El ensamblado de un genoma consiste en poner los fragmentos en orden correcto y eliminar los solapamientos. En la práctica, es una computadora (*in silico*) la que examina muchos fragmentos pequeños de ADN secuenciados y deduce su orden a partir de los traslapes (Madigan *et al.*, 2015). Un electroferograma es el gráfico que arroja el secuenciador después de analizar la electroforesis. Éste, muestra el orden de las bases a partir de curvas de fluorescencia, una por cada base, y se puede visualizar en programas como Chromas y BioEdit. Es importante revisar los electroferogramas antes de continuar con los análisis de la muestra debido a que nos dan mucha información, incluyendo la calidad de la PCR y por ende la confiabilidad de los datos obtenidos (Márquez *et al.*, 2014).

### **7.1 Base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).**

El NCBI (National Center for Biotechnology Information), fue fundado el 4 de noviembre de 1988, nació por la necesidad de métodos computarizados de procesamiento de información para la realización de investigación biomédicas. Su misión es desarrollar nuevas tecnologías de la información para ayudar a comprender los procesos moleculares y genéticos fundamentales que controlan la salud y enfermedad. Esta base se ha encargado de crear sistemas automatizados para almacenar y analizar el conocimiento sobre la Biología Molecular, Bioquímica y Genética; facilitar el uso de tales bases de datos y programas por parte de la comunidad científica, además coordinan esfuerzos para recopilar información sobre biotecnología a nivel nacional e internacional (NCBI, s.d.).

#### **7.1.1 Herramienta BLAST**

La herramienta de búsqueda básica de alineación local (BLAST) es el aparato de similitud de comparación y búsqueda de secuencias más utilizado. Hay versiones de BLAST que comparan consultas de proteínas con bases de datos de moléculas semejantes, consultas de nucleótidos con bancos de información de los mismos, así como versiones que traducen búsquedas de nucleótidos o bases de datos en los seis marcos y se comparan con bases de datos de proteínas o consultas (NCBI, 2019).

### **7.2 Análisis filogenético**

Las herramientas para generar las filogenias microbianas a partir de cultivos puros de microorganismos se han adaptado para su uso en ambientes con fin de investigar la diversidad de las comunidades microbianas. Los análisis de filogenia microbiana se basan en gran medida en los análisis de secuencias génicas de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (Figura 15) (Madigan *et al*, 2015). Cabe mencionar que los árboles que se obtiene usando el método Neighbor-Joining, en realidad es una representación del grado de similaridad de los terminales y son agrupaciones de miembros que no deben ser considerados clados ni grupos monofiléticos (Peña, 2011).

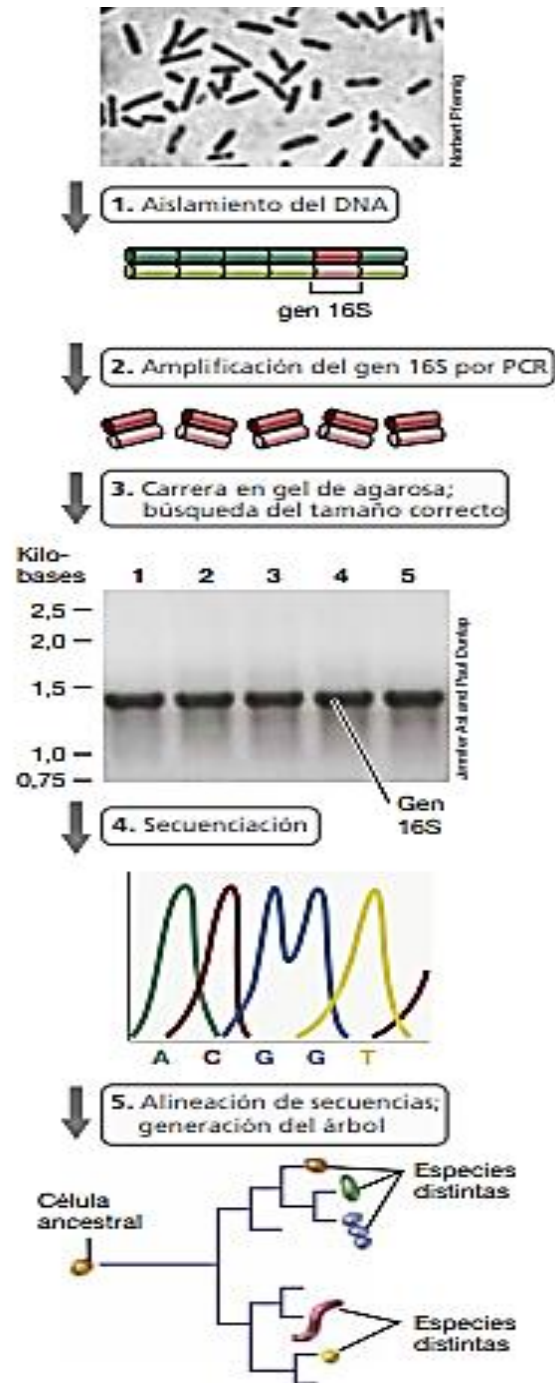


Figura 15. Método para realizar análisis filogenéticos realizados con extracción de ADN genómico, obtenido de Madigan *et al.*, 2015.

### III. ANTECEDENTES

Diferentes estudios se han realizado sobre las comunidades bacterianas presentes en sedimentos de agua dulce, se reportaron las comunidades microbianas en un depósito de agua en China, estas juegan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos de los sistemas acuáticos, además se encontraron diferentes grupos bacterianos en diferentes sitios de muestreo, los filos mejor representados fueron Proteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi y Verrucomicrobia. También se encontró que el filo Proteobacteria está involucrado en varios procesos biogeoquímicos en el sedimento. Sin embargo, se señala que se requieren más trabajos para dilucidar sus funciones ecológicas (Cheng *et al.*, 2014). Por otro lado, se identificaron comunidades bacterianas en sedimentos de los lagos de agua dulce en el suroeste de China, donde los principales componentes de las comunidades bacterianas fueron, Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes y Verrucomicrobia. Por último, se resalta que el conocimiento de la comunidad bacteriana que habita en ecosistemas acuáticos puede ayudar en la gestión sostenible de los recursos hídricos (Zhang *et al.*, 2015).

En cuanto a la identificación de microorganismos en sistemas acuáticos con un enfoque cultivable, donde se retoma la importancia del cultivo, ya que las características bioquímicas, biológicas y biotecnológicas de los procariontes en ambientes naturales se puede estimar cuando se cultivan y caracterizan con éxito. La información sobre las composiciones microbianas en sedimentos de agua dulce es limitada, ya que los estudios anteriores se han centrado principalmente en algunos grupos funcionales particulares, como nitrificadores, denitrificadores, reductores de sulfato, metanógenos y metanótrofos (Tamaki *et al.*, 2005).

Otros trabajos con la fase cultivable proponen dos medios de cultivo BRN para bacterias aerobias heterotróficas y BBR para bacterias aerobias oligotróficas, en este estudio se trabajó con sedimentos marinos de las costas de Argentina. Donde se aislaron 236 colonias que corresponden a 54 especies, las colonias Gram positivas se asociaron al invierno y el otoño se asoció con la mayor biodiversidad de géneros (Pucci *et al.*, 2009).

Estudios exploratorios en los lagos del PNLM demostraron el desconocimiento de las características limnológicas del sitio, y evaluaron el estado trófico de los lagos utilizando como proxy la concentración de clorofila- $\alpha$ , clasificándolos como ultraoligotróficos y oligotróficos a los lagos prístinos de color azul, mientras que los mesotróficos y meso-eutrófico fueron impactados, de color verde-amarillo (Vera *et al.*, 2015). Posteriormente, se proporcionaron datos batimétricos y parámetros morfológicos, los lagos fueron mayormente profundos de origen kárstico, estas profundidades favorecen la estratificación prolongada, lo que aumenta la probabilidad de acumular contaminantes (Alcocer *et al.*, 2016).

También se identificaron los parámetros de textura del sedimento y la composición elemental de 18 lagos del PNLM, donde se demostró que los lagos profundos contienen sedimentos más gruesos que los poco profundos y que los lagos prístinos tienen sedimentos de mayor grosor que los perturbados. En cuanto a la composición elemental, hay una tendencia en la que los lagos profundos mostraron mayor contenido de C, H, N y S que los poco profundos. Una tendencia similar es cierta para los lagos prístinos con mayor contenido de C, H y N, pero más bajos que los lagos perturbados (Alcocer *et al.*, 2018). Así mismo, se reportaron por primera vez la estructura y diversidad de las comunidades de arqueas presentes en los sedimentos del lago “Encantada” y se encontró que el filo más abundante fue el Crenarcheota (76%), Euryarchaeota (19%) y Parvarchaeota (5%), algunos de estos microorganismos estaban involucrados en el proceso de metanogénesis y metanotrofia (García, 2019).

Por último, un análisis *in silico* reveló las comunidades bacterianas que existen en los sedimentos de los lagos de Montebello, siendo más abundantes los filos Proteobacteria (40.63%), Acidobacteria (12.91%), Chloroflexi (12.62%), Planctomycetes (10.53%), Firmicutes (6,71%) y Actinobacterias (5.76%) (Díaz, 2019).

#### IV. ZONA DE ESTUDIO

El PNLM está localizado en la región Sur-Sureste del estado de Chiapas, en la frontera con Guatemala, abarca una superficie de 6 425 hectáreas y comprende parte de los municipios La Independencia y La Trinitaria, este último comprende 95% de la superficie del ANP. Sus coordenadas extremas son 16° 04' 40" y 16° 10' 20" Latitud Norte y 91° 37' 40" y 91° 47' 40" Longitud Oeste (SEMARNAT, 2007).

El lago Esmeralda, está localizado a 16° 7' (latitud) y 91° 43' (longitud) (Figura 16), con una temperatura máxima y mínima de 23.4°C y 23.2°C respectivamente, y una temperatura promedio de 23.4°C, el oxígeno disuelto máximo y mínimo es de 5.3 mg L<sup>-1</sup> y 4.8 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, y un promedio de 5.2 mg L<sup>-1</sup>. La cantidad de clorofila-a promedio es de 0.8 mg L<sup>-1</sup>. De acuerdo a la clasificación trófica por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), es considerada ultraoligotrófica que corresponde a los lagos limpios o prístinos, con una coloración azul. El lago Encantada, está localizado en 16° 7' (latitud) y 91° 43' (longitud) (Figura 16), una temperatura máxima y mínima de 24.9°C y 18.1°C respectivamente, la temperatura promedio es de 18.4°C, el oxígeno disuelto máximo, mínimo y promedio es de 0 mg L<sup>-1</sup>, 7.5 mg L<sup>-1</sup> y 0.3 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. La cantidad de clorofila-a promedio de 12.1 mg L<sup>-1</sup>. Su clasificación trófica pertenece al tipo mesotrófica y tiene una diferencia de coloración verde-amarillo (Vera *et al.*, 2015).

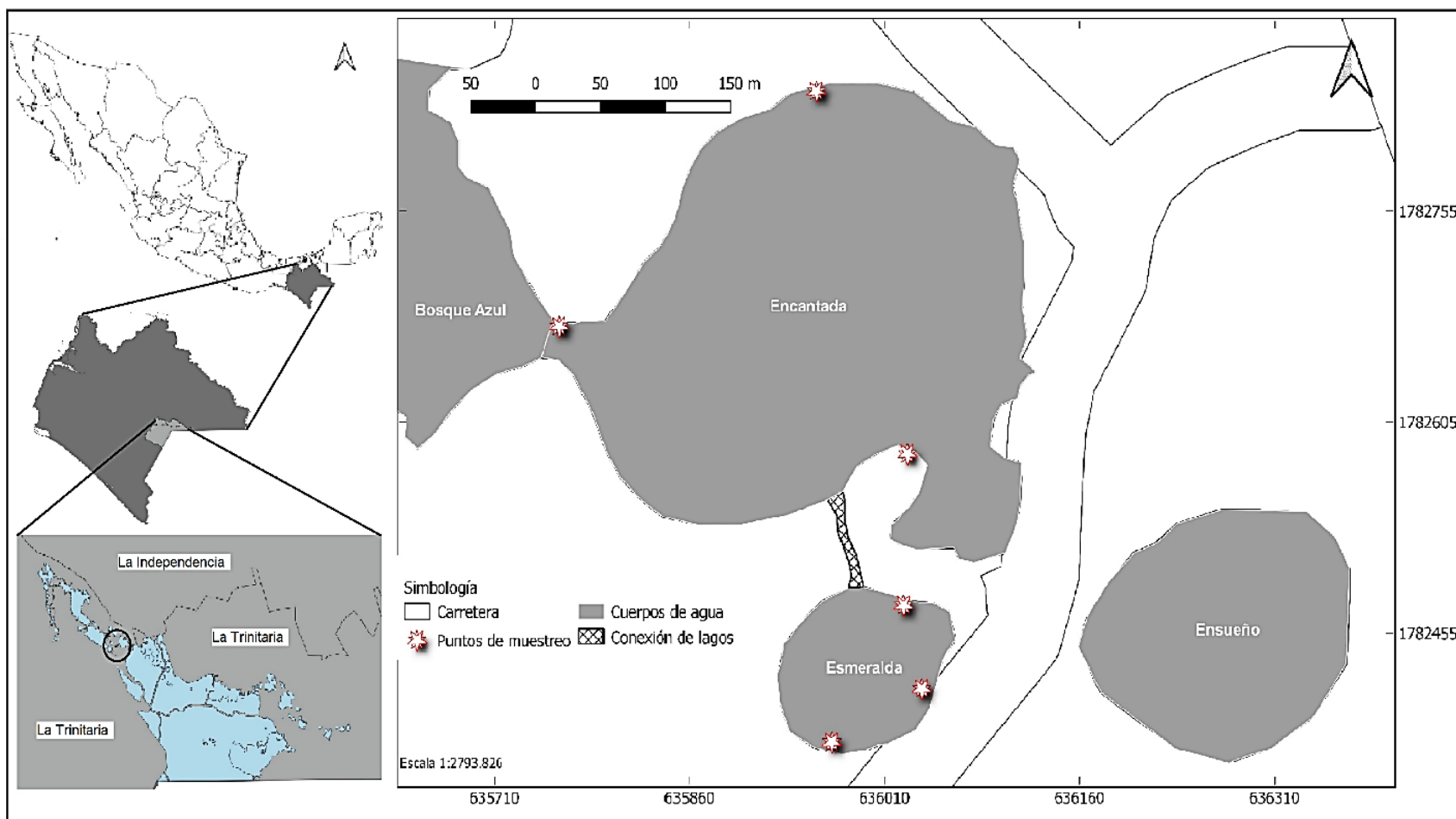


Figura 16. Zona de estudio: Lagos “Encantada” y “Esmeralda”, con los puntos de muestreo. Realizado con el programa QGis 3.10.1 A Coruña.



## V. OBJETIVOS

### General

- Analizar los sedimentos procedentes de los lagos “Esmeralda” y “Encantada” del Parque Nacional Lagunas de Montebello, Chiapas.

### Específicos

- Determinar los parámetros físico-químicos del sedimento de los lagos “Esmeralda” y “Encantada”.
- Aislar las bacterias de sedimentos de los lagos “Esmeralda” y “Encantada”.
- Describir fenotípicamente las bacterias aisladas de sedimentos de los lagos “Esmeralda” y “Encantada”.
- Identificar molecularmente las bacterias aisladas de sedimentos de los lagos “Esmeralda” y “Encantada”.

## VII. MÉTODO

### 1. Determinación de los parámetros físico-químicos del sedimento

Se establecieron tres puntos de muestreo alrededor de los lagos “Esmeralda” y “Encantada”, de acuerdo a cada temporada (estiaje/lluvia). En cada punto de monitoreo se determinaron *in situ* la conductividad electrolítica, oxígeno, pH y temperatura con un multimedidor digital HQ40D marca HACH®. En cada punto se extrajo 1 kg de sedimento con una draga tipo Ekman® a 1 m de profundidad y se transportaron en frascos ámbar de 500 ml a una temperatura de 4°C al Laboratorio de Biología Molecular del Polo Tecnológico Nacional de Pruebas Analíticas en Biocombustibles, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

El contenido de carbono y nitrógeno ( $CO_T$ ) y ( $N_T$ ) se obtuvo con TOC (FlashEA 1110), el contenido de fósforo ( $P_T$ ) se determinó según la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, estos análisis se realizaron por el Laboratorio de Plantas y Suelos del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) unidad San Cristóbal de las Casas.

Para la descripción del conjunto de variables se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con el programa RStudio versión 3.6.0.

### 2. Aislamiento y purificación de bacterias

Para la siembra de los microorganismos se pesó 1 g de suelo en 9 ml de agua destilada, a partir de esta se realizaron diluciones seriadas, sembrando el tubo con la dilución  $10^{-6}$  por el método de diseminación en superficie. Los medios de cultivo utilizados fueron: BRN, bacterias aeróbicas heterotróficas (tripteína bacteriológica 5 g, extracto de levadura 1 g,  $K_2HPO_4$  1 g,  $(NH_4)_2SO_4$  2 g, agar - agar 15 g y agua destilada 1000 ml, pH 7.2) el medio BBR, bacterias aeróbicas oligotróficas (tripteína bacteriológica 0.5 g, extracto de levadura 0.5 g,  $K_2HPO_4$  1 g,  $(NH_4)_2SO_4$  2 g, agar-agar 15 gr y agua destilada 1000 ml, pH 7.2), fueron incubadas durante 10 días (Pucci *et al.*, 2009) y se utilizó una incubadora a  $20 \pm 1^\circ C$ .

### **3. Descripción fenotípica de bacterias**

En la caracterización macroscópica se observó la morfología de colonias en cultivos frescos. Las características que se determinaron fueron la forma, color, borde, elevación, consistencia y luz. La caracterización microscópica se realizó por tinción de Gram de la siguiente manera: colorante cristal violeta: 1 min, mordiente yodo-lugol: 1 min, decolorante alcohol-acetona: 30 s y colorante contraste safranina: 1 min. Por último, se describió la morfología, con la ayuda de un microscopio modelo Primo Star marca Carl Zeiss.

### **4. Identificación molecular de bacterias**

Se agruparon las diferentes colonias según su morfología y la tinción de Gram. Para la extracción de ADN genómico se usó el kit de extracción *Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit* de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Posteriormente la cantidad y calidad del ADN genómico se analizó por medio del espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific™ NanoDrop™ One y la integridad del ADN se verificó por medio de la técnica de electroforesis, en un gel de agarosa al 1%, con buffer TAE 1x usando un marcador molecular de un tamaño de 1 000 pb.

Para diferenciar los patrones de bandeo, se realizó por la técnica de PCR-BOX utilizando los siguientes reactivos solución buffer [contiene KCl y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ],  $\text{MgCl}_2$ , dNTPs, Taq polimerasa,  $\text{H}_2\text{O}$ , muestra de ADN, por último el primer utilizado para la amplificación de la secuencia en mosaico del elemento BOX fue: BOX-A1R (5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3'). Se empleó un termociclador Eppendorf y las condiciones fueron 95°C-7 min, 94°C-1 min, 53°C-1 min, 65°C-5 min, 65°C-15 min. Incubación de 4°C por 30 ciclos. La calidad de los productos de PCR amplificados se comprobó por medio de la electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las muestras que indicaron resultados positivos en relación a la observación de las bandas fueron cuantificadas por medio del espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific™ NanoDrop™ One. Para seleccionar las colonias se realizó una inspección visual al gel de agarosa.

Posteriormente, se amplificó el ADN genómico de las colonias con patrones de bandas distintas, mediante la técnica de PCR. La amplificación del ADN se realizó utilizando los siguientes reactivos: solución buffer [contiene KCl y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ],  $\text{MgCl}_2$ , dNTPs, Taq polimerasa,  $\text{H}_2\text{O}$ , muestra de ADN, por último los primers utilizados para la amplificación del gen ARNr 16S fueron: 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (5' GTTTACCTTGTTACGACTT 3'). Se empleó un termociclador Eppendorf y las condiciones fueron 95°C-5 min, 95°C-45 s, 57°C-40 s, 72°C-1:45 min, 72°C-10 min. Incubación de 4°C por 30 ciclos. Los productos de PCR amplificados se comprobó su calidad por medio de la electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las muestras que indicaron resultados positivos en relación a la observación de las bandas fueron cuantificadas por medio del espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific™ NanoDrop™ One. El secuenciamiento de ADN de las colonias fue realizado por la empresa MacroGen, Inc., utilizando el método de Sanger.

Para el alineamiento de secuencias obtenidas del cromatograma secuenciado se utilizó el programa BioEdit versión 7.2.5 (2013). Las secuencias obtenidas fueron comparadas en National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante la herramienta BLAST y, por último se utilizó el programa Mega 5.1 (5121019) con la finalidad de realizar el árbol filogenético.

## VII. RESULTADOS

### 1. Determinación de los parámetros físico-químicos del sedimento

Se presentó el nivel de correlación de los datos en el Análisis de Componentes Principales ACP (Cuadro 1), el cual se reveló una alta correlación de las variables. De acuerdo con la importancia de componentes, el primer componente cubre el 49% de la proporción de varianza. En este componente el carbono orgánico total ( $CO_T$ ) y el nitrógeno total ( $N_T$ ) aportaron la mayor correlación además de la mayor proporción de la varianza, este componente se denominó como el componente orgánico, el cual permitió agrupar al lago “Esmeralda” (color azul), ya que estos parámetros estuvieron presentes en mayor concentración. El segundo componente cubrió el 23% de la proporción de la varianza. En este componente el oxígeno disuelto ( $O_2$ ) y pH aportaron la mayor correlación y la proporción más grande de la varianza, dicho componente se denominó el componente *in situ*. El cual permitió agrupar al lago “Encantada” (color rojo), ya que estas variables estuvieron presentes en mayor concentración. Por último, se encontró que existe una menor asociación en ambos lagos con la temperatura, conductividad eléctrica y fósforo total ( $P_T$ ) (Figura 17).

Cuadro 1. Nivel de correlación del Análisis de Componentes Principales (ACP)

	<b>C. E. (dS/m)</b>	<b>pH</b>	<b>O<sup>2</sup> (mg/L)</b>	<b>Tem (°C)</b>	<b>PT (mg/kg)</b>	<b>NT (mg/kg)</b>	<b>COT (mg/kg)</b>
<b>C. E. (dS/m)</b>							
<b>pH</b>	-0.18914781						
<b>O<sup>2</sup> (mg/L)</b>	-0.02658638	0.6899845					
<b>Tem (°C)</b>	0.67907466	0.2184455	0.37959899				
<b>PT (mg/kg)</b>	0.1721480	0.1977832	0.08152465	0.5959392			
<b>NT (mg/kg)</b>	-0.22399419	-0.5334577	-0.51282409	-0.6587395	-0.37527740		
<b>COT (mg/kg)</b>	-0.18385878	-0.4083560	-0.48263743	-0.5628344	-0.28790292	0.9414664	

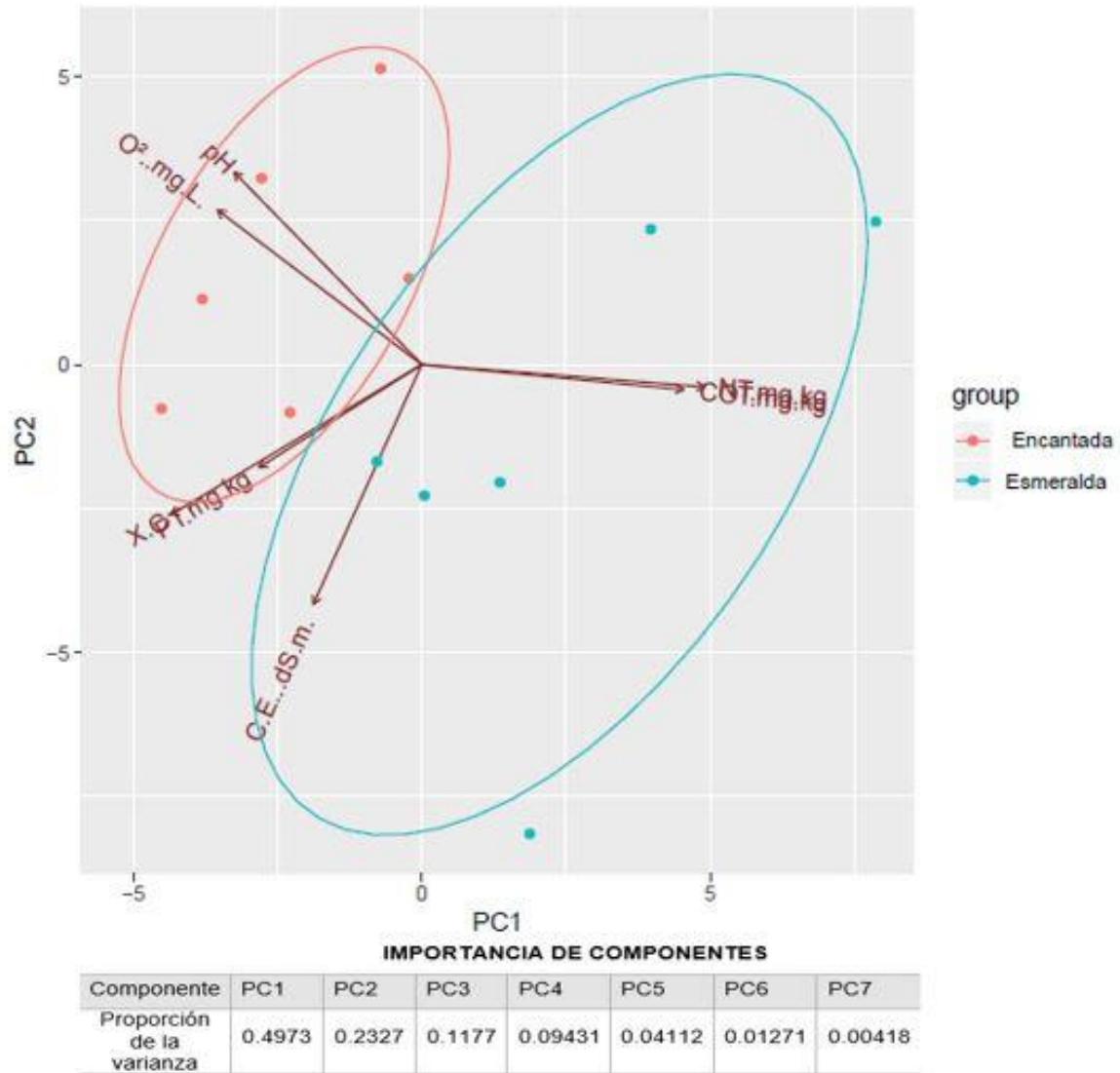
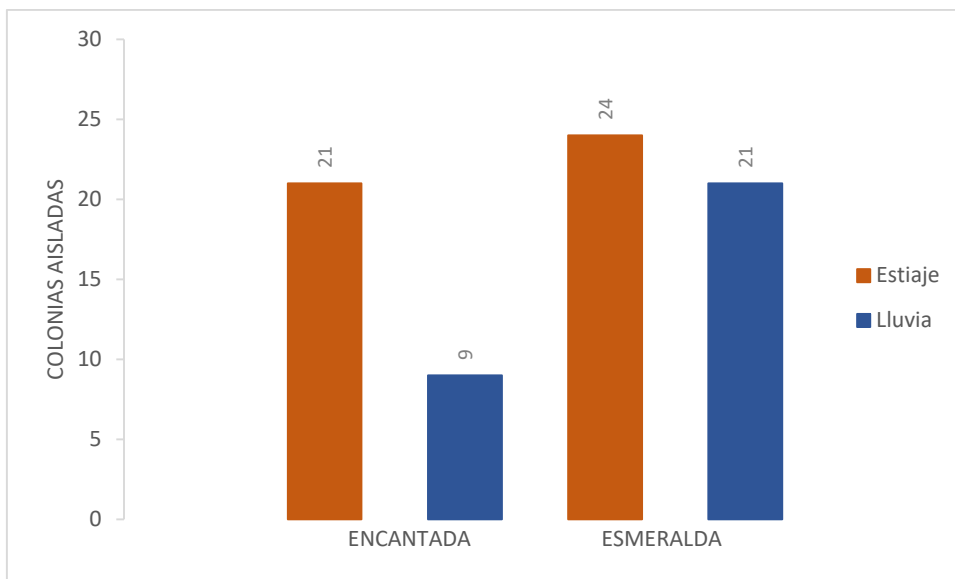


Figura 17. Análisis de componentes principales (ACP) sobre los parámetros fisicoquímicos y la importancia de cada componente, agrupando los lagos la Encantada y la Esmeralda.

## 2. Aislamiento de colonias

En este estudio se lograron aislar un total de 75 colonias bacterianas (Figura 16), 30 de las cuales fueron del lago “Encantada”, 21 colonias aisladas en la temporada de estiaje y 9 aisladas en la temporada de lluvia, mientras 45 colonias son del lago “Esmeralda”, dentro de las cuales 24 fueron aisladas en la temporada de estiaje y 21 en temporada de lluvia.



Gráfica 1. Número de colonias aisladas de los lagos “Encantada” y “Esmeralda” en temporadas de estiaje y lluvia.

## 3. Descripción fenotípica de bacterias aisladas

En este estudio se logró diferenciar en base a las características en cultivo fresco y microscópicamente 16 morfogrupos. A continuación, se muestra la descripción de cada grupo (Cuadro 2), las fotografías de las colonias se muestran en el anexos 1-4.



Cuadro 2. Descripción morfológica de cultivos frescos y microscópica de los morfogrupos aislados de los lagos de Montebello.

GRUPO	CARACTERÍSTICAS DE LA COLONIA						CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	
	FORMA	COLOR	BORDE	ELEVACIÓN	CONSISTENCIA	LUZ	TINCIÓN	FORMA
<b>A</b>	Circular	Amarillo verdoso	Entero	Convexa	Cre moso	Brillante	Gram +	Cocos
<b>B</b>	Puntiforme	Blanco	Entero	Plana	Cre moso	Brillante	Gram +	Bacilos
<b>C</b>	Circular	Blanco	Entero	Plana	Suave	Brillante	Gram +	Cocos
<b>D</b>	Puntiforme	Blanco	Entero	Plana	Cre moso	Opaco	Gram +	Cocobacilos
<b>E</b>	Irregular	Blanco	Lobulado	Plana	Quebradizo	Opaco	Gram +	Bacilos
<b>F</b>	Filamentoso	Blanco	Filamentoso	Plana	Cre moso	Opaco	Gram +	Bacilos
<b>G</b>	Filamentoso	Blanco	Dentado	Plana	Cre moso	Brillante	Gram +	Bacilos
<b>H</b>	Irregular	Blanco	Dentado	Plano	Suave	Opaco	Gram +	Bacilos
<b>I</b>	Circular	Rojo	Entero	Convexo	Cre moso	Brillante	Gram +	Bacilos
<b>J</b>	Circular	Naranja con halo blanco	Entero	Plano	Cre moso	Brillante	Gram +	Bacilos
<b>K</b>	Puntiforme	Verde amarillo	Entero	Elevado	Suave	Brillante	Gram +	Bacilos
<b>L</b>	Circular	Crema	Entero	Plana	Cre mosa	Brillante	Gram +	Cocobacilos
<b>M</b>	Circular	Blanca	Entero	Plana	Suave	Brillante	Gram +	Bacilos
<b>N</b>	Circular	Crema rosa	Entero	Convexo	Mucoso	Brillante	Gram +	Cocobacilos
<b>Ñ</b>	Circular	Crema	Entero	Convexo	Cre mosa	Brillante	Gram +	Cocobacilos
<b>O</b>	Circular	Crema rosa	Entero	Convexo	Cre mosa	Brillante	Gram -	Cocos

#### 4. Identificación molecular de bacterias aisladas de sedimentos de los lagos “Esmeralda” y “Encantada”.

La presencia e integridad del ADN extraído fue verificado a través de un gel de electroforesis en agarosa (Figura 18). Además, se determinó la cantidad y calidad del ADN (Cuadro 3).

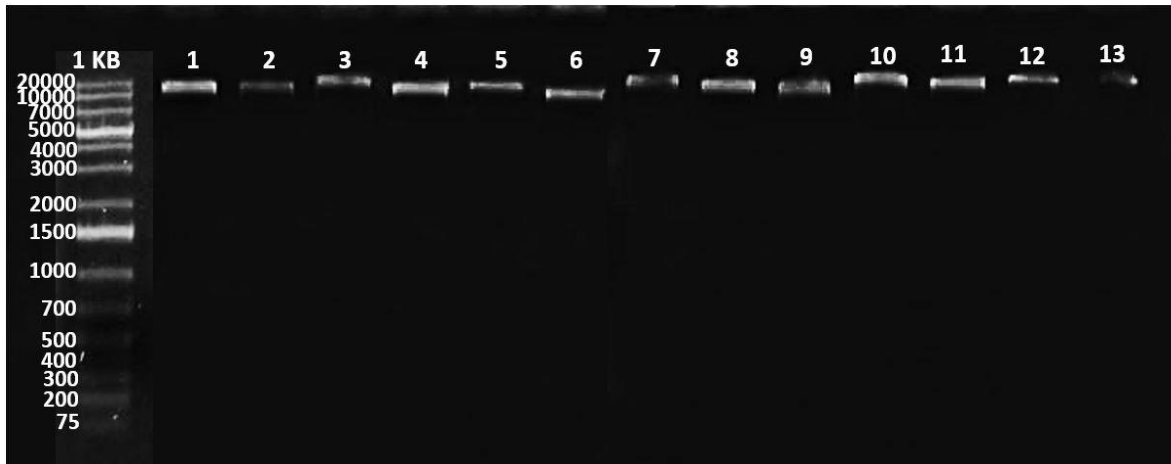


Figura 18. ADN genómico de aislados del sedimento del PNLM. De izquierda a derecha marcador molecular 1 KB plus. 1: colonia ENC-EST-32, 2: colonia ESM-EST-61, 3: colonia ESM-EST-9, 4: colonia ESM-EST-44, 5: colonia ESM-LLU-12, 6: colonia ESM-LLU-20, 7: colonia ENC-EST-3, 8: colonia ENC-EST-1, 9: colonia ESM-LLU-38, 10: colonia ESM-LLU-21, 11: colonia ESM-EST-19, 12: colonia ENC-LLU-47 y 13: colonia ESM-LLU-10.

Cuadro 3. Cuantificación de ADN extraído utilizando el equipo NanoDrop One. ng/μl: nanogramos/microlitro. A260/280: Absorbancia 260 nm-280 nm. A260/230: Absorbancia 260 nm-230 nm.

Muestra	ng/μl	A260/280	A260/230
1	50.3	1.64	0.13
2	28.9	1.61	0.15
3	38.7	1.71	0.24
4	29.5	1.67	0.25
5	73.8	1.86	0.65
6	33.3	1.73	0.30
7	43.3	1.67	0.24
8	44.4	1.63	0.20
9	36.2	1.62	0.19
10	31.4	1.68	0.35
11	37.3	1.71	0.30
12	31.6	1.74	0.10
13	37.8	1.70	0.11

Posteriormente, los morfogrupos a secuenciar se discriminaron por el método molecular BOX-PCR, que generó patrones de bandeo distintos (Figura 19).

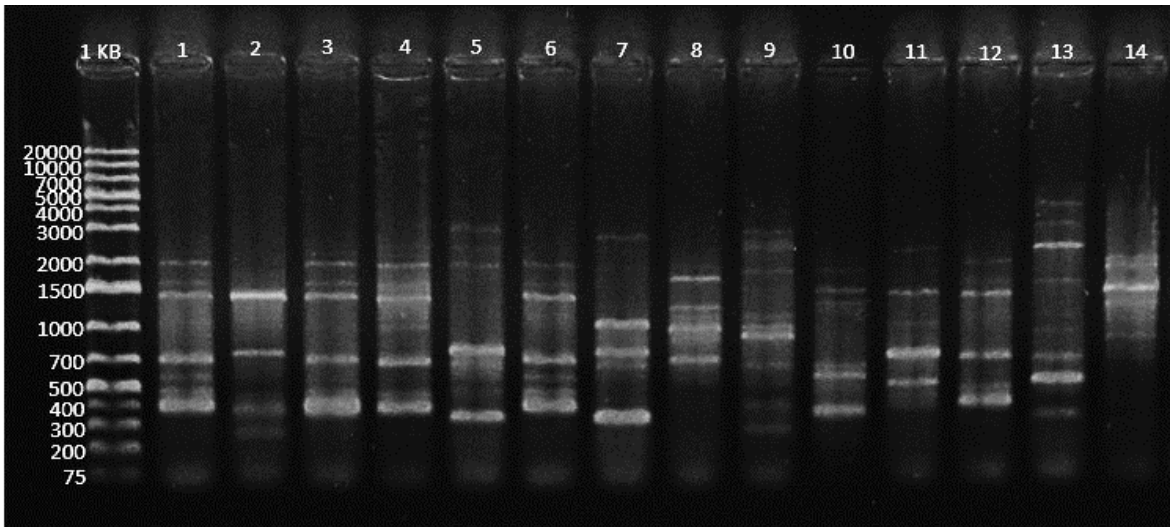


Figura 19. Patrones de BOX-PCR de los aislamientos bacterianos por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Marcador molecular 1 KB plus. 1 y 6: Grupo H. 2: Grupo D. 3 y 4: Grupo G. 5: Grupo A. 6: Grupo B. 7: Grupo C. 8: Grupo F. 9: Grupo I. 10: Grupo K. 11: Grupo L. 12: Grupo E. 14: Grupo J.

De la cual, se obtuvieron los productos de PCR del gen ARNr 16S de cada muestra, siendo representativa para cada morfogrupo (Figura 20) y se cuantificó la cantidad y calidad de ADN (Tabla 4).

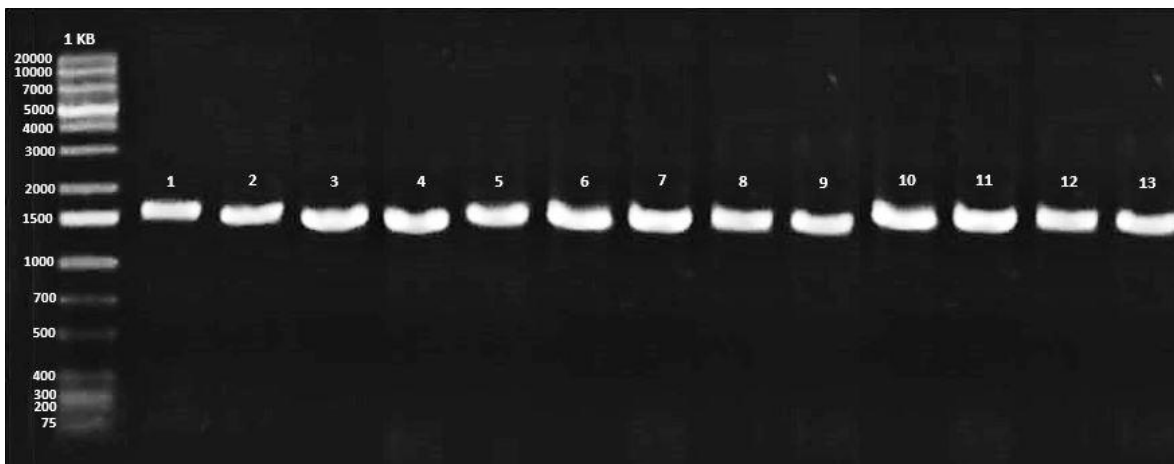


Figura 20. Amplicones del gen ARNr 16S bacteriano aislado del sedimento del PNL. De izquierda a derecha. Marcador molecular 1 KB plus. 1: ENC-EST-32, 2: ESM-EST-61, 3: ESM-EST-9, 4: ESM-EST-44, 5: ESM-LLU-12, 6: ESM-LLU-20, 7: ENC-EST-3, 8: ENC-EST-1, 9: ESM-LLU-38, 10: ESM-LLU-21, 11: ESM-EST-19, 12: ENC-LLU-47 y 13: ESM-LLU-10.

Cuadro 4. Cuantificación de los productos de PCR utilizando el equipo NanoDrop One. ng/μl: nanogramos/microlitro. A260/280: Absorbancia 260 nm-280 nm. A260/230: Absorbancia 260 nm-230 nm.

Muestra	ng/μl	A260/280	A260/230
1	200.7	1.66	0.82
2	272.9	1.65	0.97
3	250.4	1.64	0.93
4	488.8	1.65	1.01
5	453.8	1.66	1.02
6	419.2	1.64	1.02
7	405.7	1.65	1.02
8	250.4	1.64	0.93
9	507.6	1.72	1.72
10	458.2	1.70	1.21
11	205.2	1.69	1.28
12	443.7	1.69	1.09
13	473.6	1.68	1.43

Obteniendo al final 16 grupos, los cuales pertenecieron a ocho géneros y 16 especies (Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación de las secuencias obtenidas de los aislados con la base de datos NCBI.

COLONIA	Secuencia taxonómica (Match)	PORCENTAJE DE SIMILITUD
ESM-EST-9	<i>Arthrobacter oryzae</i> strain 4912	92%
ENC-EST-32	<i>Arthrobacter sp.</i> strain MMS17-SY291	99%
ESM-EST-61	<i>Arthrobacter sp.</i> strain S5-19	98%
ESM-EST-44	<i>Arthrobacter sp.</i> strain S5-19	98%
ENC-EST-1	<i>Bacillus albus</i> strain ATPMB16	100%
ENC-EST-3	<i>Bacillus cereus</i> strain KR3M-30	100%
ESM-LLU-12	<i>Bacillus pacificus</i> strain MSMNiB1	100%
ESM-LLU-20	<i>Bacillus toyonensis</i> strain RPW25	100%
ESM-LLU-38	<i>Deinococcus indicus</i> strain Wt/1 <sup>a</sup>	100%
ESM-LLU-21	<i>Exigobacterium sp</i> strain RYA7	100%

ESM-EST-19	<i>Microbacterium oxydans</i> strain P9-43	100%
ENC-LLU-47	<i>Pseudomonas koreensis</i> strain y5c	99%
ESM-LLU-10	<i>Psychrobacillus soli</i> strain PN60-139	97%
ESM-EST-5	<i>Rhodococcus erythropolis</i> strain DT02	99%
ESM-EST-16	<i>Rhodococcus sp</i> strain SNH-K27	99%
ESM-LLU-17	<i>Rhodococcus qingshengil</i> strain IMB16-075	100%

Basándose en el análisis filogenético por el método de Neighbor-Joining de las secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S, los géneros bacterianos encontrados fueron 4 especies de *Arthrobacter*, en este sentido la colonia ESM-EST-9 se agrupó a *Arthrobacter oryzae* strain 4912 con un porcentaje de similitud de 92%, la colonia ENC-EST-32 se agrupó a *Arthrobacter sp.* strain MMS17-SY291 con un porcentaje de similitud de 99%, mientras que las colonias ESM-EST-61 y ESM-EST-44 se agruparon a *Arthrobacter sp.* strain S5-19 con un porcentaje de similitud de 98% (Figura 21).

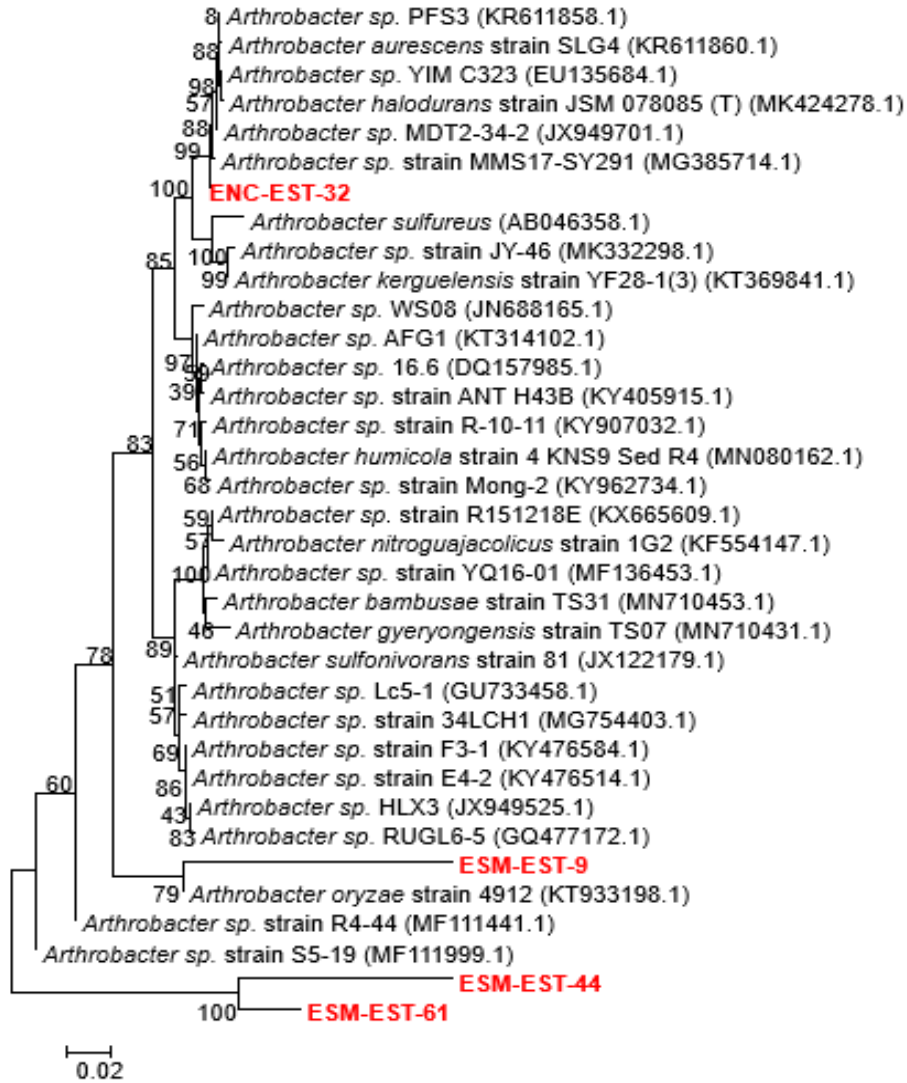


Figura 21. Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género *Arthrobacter*. Las colonias identificadas en este estudio están remarcadas en letras rojas.

El siguiente género fue *Bacillus* con 4 especies, las colonias ENC-EST-1, ESM-LLU-3, ESM-LLU-12 y ESM-LLU-20 presentaron una similitud del 100% con *Bacillus albus* strain ATPMB16, *Bacillus cereus* strain KR3M-30, *Bacillus pacificus* strain MSMNiB1 y *Bacillus toyonensis* strain RPW25 respectivamente (Figura 22).

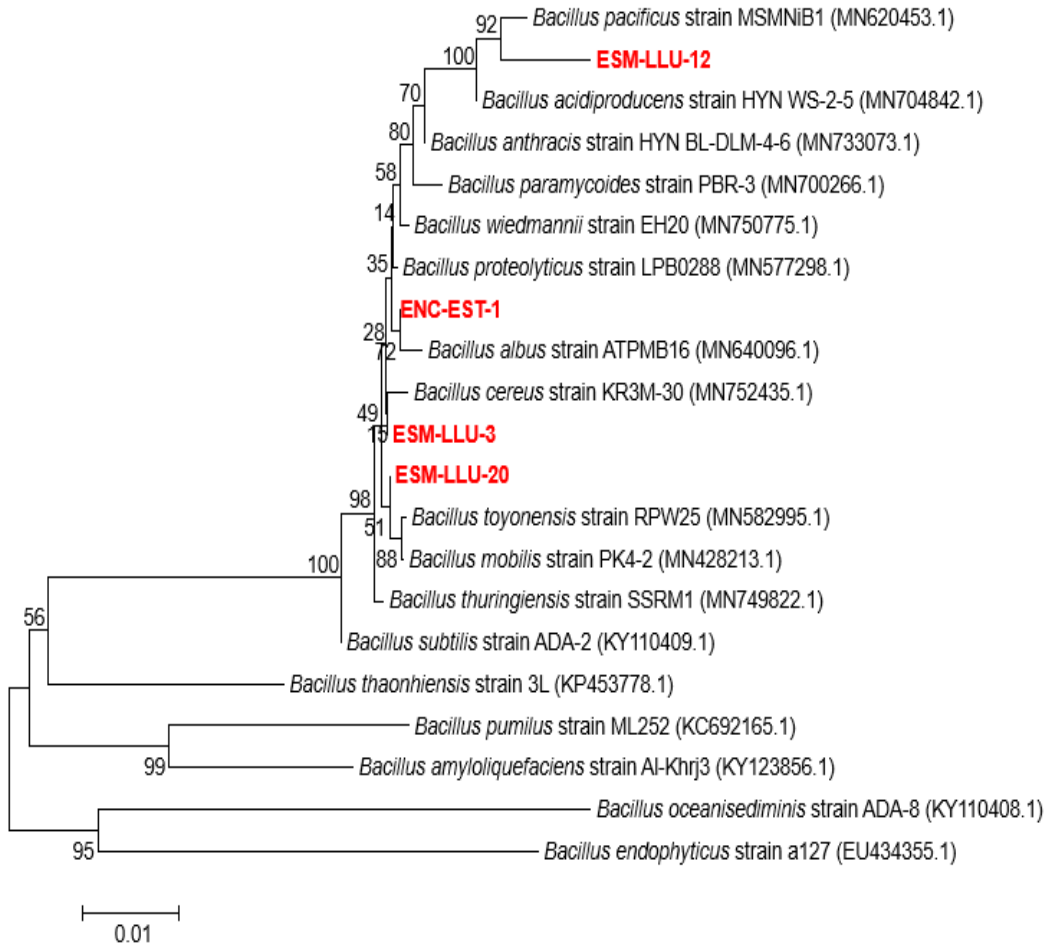


Figura 22. Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género *Bacillus*. Las colonias identificadas en este estudio están remarcadas en letras rojas.

Otro género que obtuvo más especies fue *Rhodococcus* con 3 especies, la colonia ESM-EST-5 presentó un porcentaje de similitud del 99% con *Rhodococcus erythropolis* strain DT02, la colonia ESM-EST-16 mostró un 99% de similitud con *Rhodococcus sp* strain SNH-K27 y la colonia ESM-LLU-17 presentó un 100% de similitud con *Rhodococcus qingshengii* strain IMB16-075 (Figura 23).

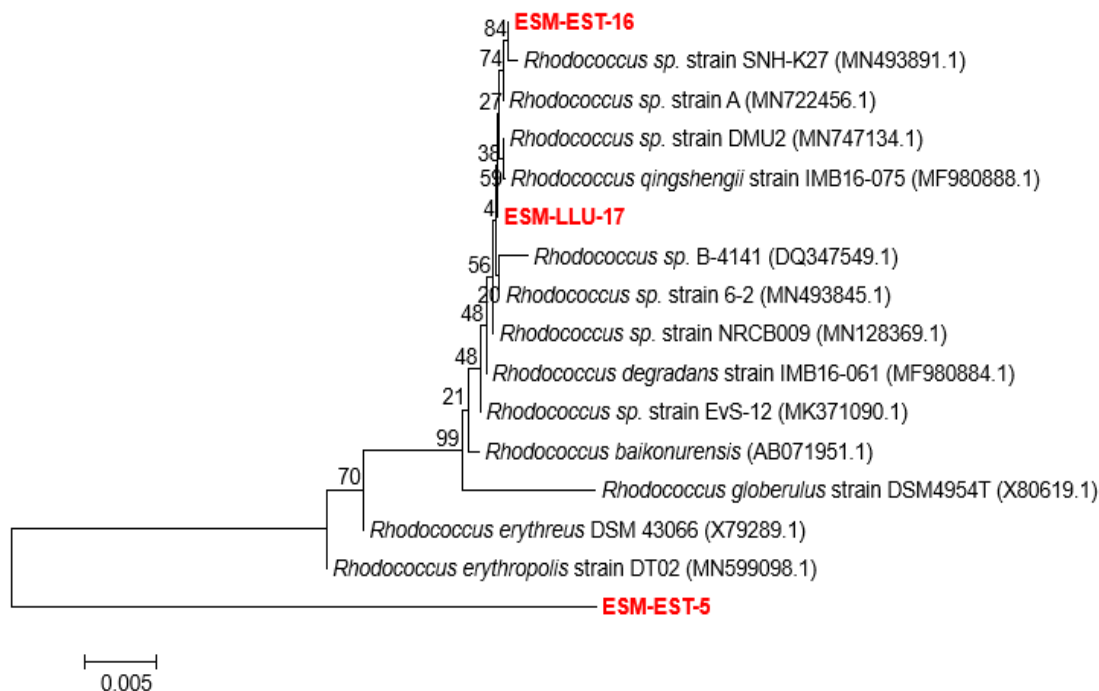


Figura 23. Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género *Rhodococcus*. Las colonias identificadas en este estudio están remarcadas en letras rojas.



Géneros que solo tuvieron una especie, *Deinococcus* en donde la colonia ESM-LLU-38 presentó un porcentaje de 100% de similitud con *Deinococcus indicus* strain Wt/1a (Figura 24). Mientras, la colonia aislada ESM-LLU-21 presentó un 100% de similitud con *Exigobacterium* sp strain RYA7 (Figura 25). Para el aislado ESM-EST-19, la secuencia presentó un 100% de similitud con *Microbacterium oxydans* strain P9-43 (Figura 26), La colonia ENC-LLU-47 presentó 99% de similitud con *Pseudomonas koreensis* strain y5c (Figura 27). Y por último, la colonia ESM-LLU-10 presentó un 97% de similitud con *Psychrobacillus soli* strain PN60-139 (Figura 28).

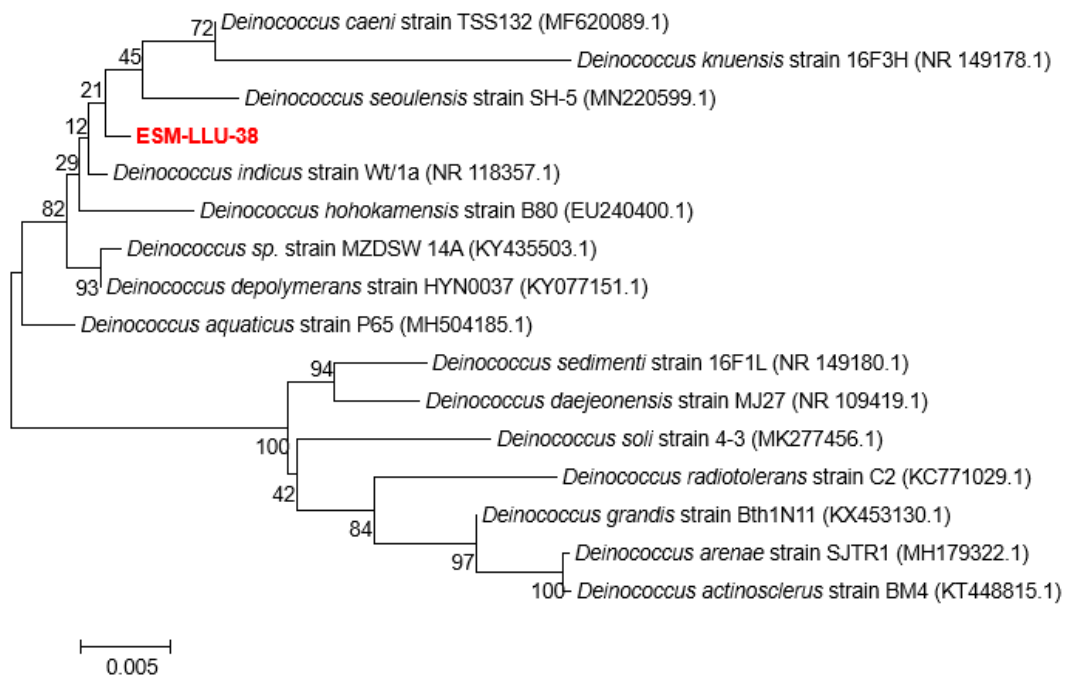


Figura 24. Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género *Deinococcus*. La colonia identificada en este estudio está remarcada en letras rojas.

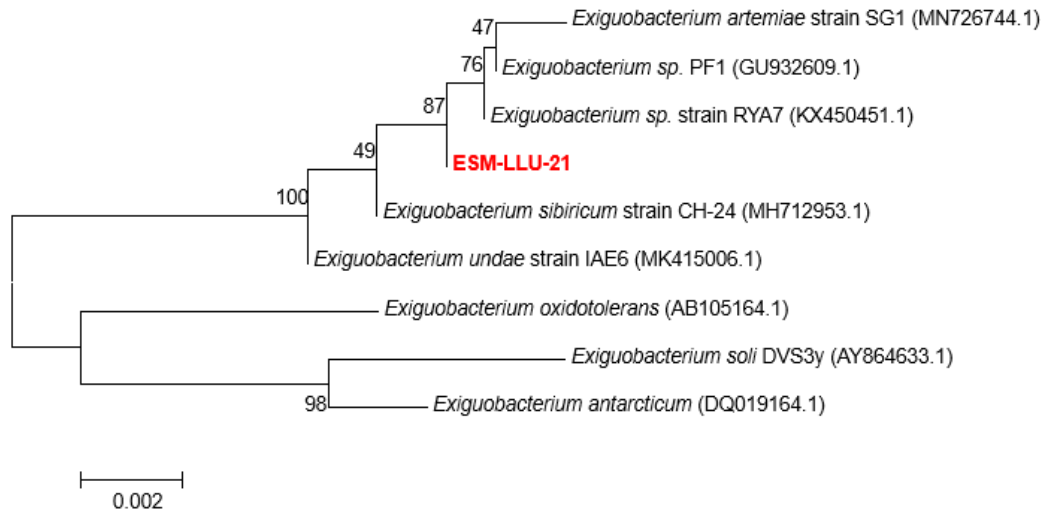


Figura 25. Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género *Exiguobacterium*. La colonia identificada en este estudio está remarcada en letras rojas.

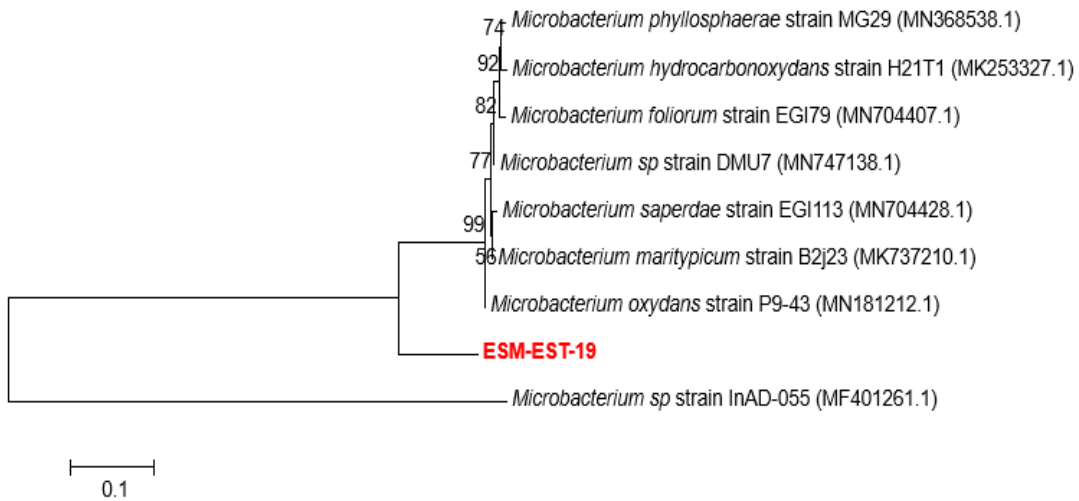


Figura 26. Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género *Microbacterium*. La colonia identificada en este estudio está remarcada en letras rojas.

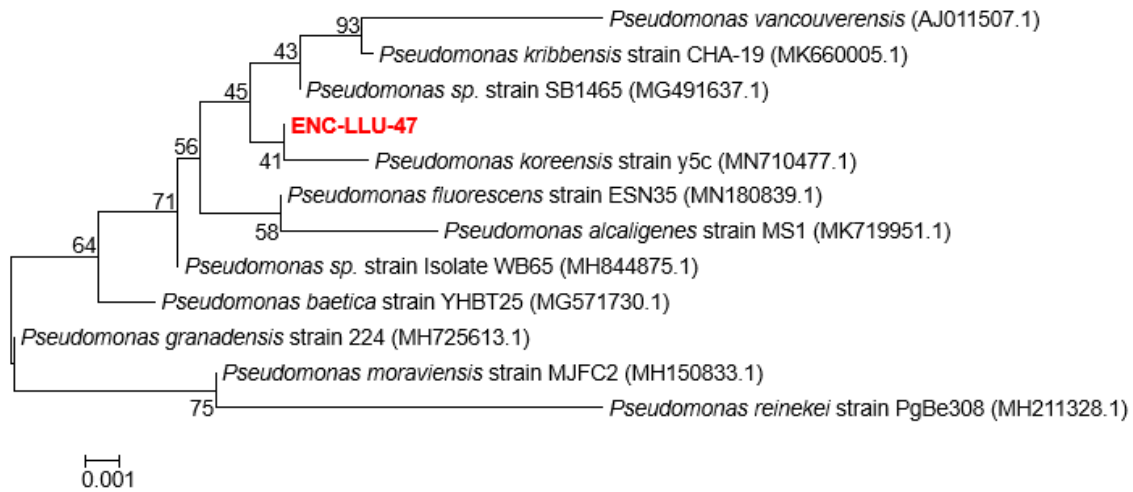


Figura 27. Arbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género *Pseudomonas*. La colonia identificada en este estudio está remarcada en letras rojas.

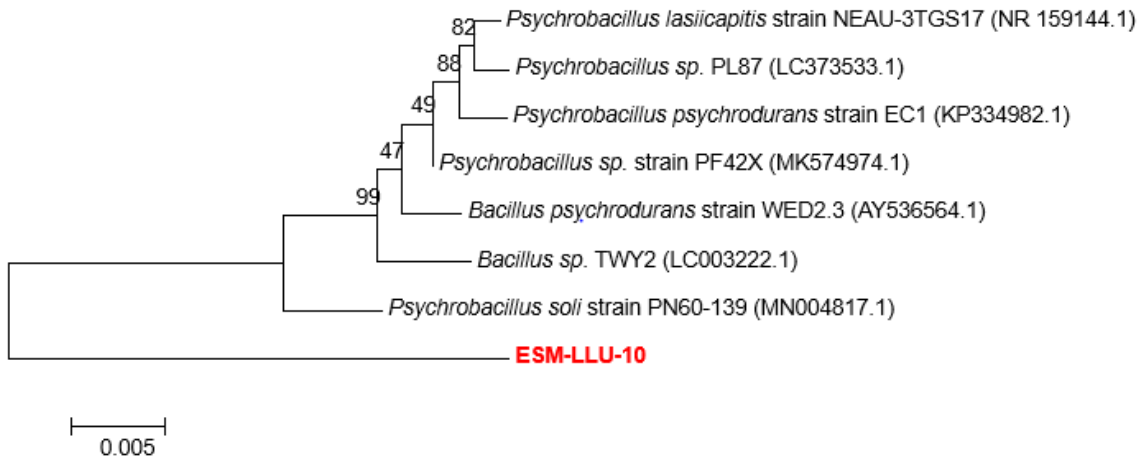


Figura 28. Árbol filogenético Neighbor-Joining con secuencias del gen ARNr 16S del género *Bacillus* y *Psychrobacillus*. La colonia identificada en este estudio está remarcada en letras rojas.

## VIII. DISCUSIÓN

En esta investigación el análisis de componentes principales demostró que existe una correlación de 0.941, entre las variables de  $CO_T$  y  $N_T$ , siendo estas variables agrupadas como una componente orgánica en el lago Esmeralda. Por otra parte estos resultados fueron similares a los reportados en el lago Longbao con una alta correlación (0.960) entre las variables  $CO_T$  y  $N_T$ , la correlación de las variables indican las fuentes de materia orgánica, explican los autores, que la correlación de estas variables puede ser atribuida a procesos de endogénesis la cual implica los desechos de los organismos acuáticos, mientras la exógena proviene de los pastizales y actividades que se desarrollan alrededor del lago principalmente el pastoreo, siendo esta última fuente, el factor principal para el potencial de eutrofización (Lu *et al.*, 2016). Por su parte, la clasificación del lago “Esmeralda” se encuentra como ultraoligotrófico debido a la concentración de clorofila (Vera *et al.*, 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos señalan el aumento en la concentración de  $CO_T$  y  $N_T$  en este lago, además, alrededor existen diferentes tipos de tulares, carrizales y actividades como la ganadería y la agricultura (SEMARNAT, 2007), las cuales pueden propiciar la existencia de un proceso de eutrofización dentro del lago “Esmeralda” tal y como fue reportado en el lago Longbao.

Por otro lado, las variables de pH y oxígeno disuelto tuvieron una correlación de 0.689, estas variables forman la componente *in situ*, que agrupa al lago “Encantada”. El pH del lago “Encantada” ha sido alcalino (García, 2019), lo cual coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación. En consecuencia, los sedimentos alcalinos o ligeramente alcalinos son propensos a sedimentar más rápido los metales pesados o sustancias tóxicas que cuando el pH es ácido, además estos sistemas tienen la capacidad natural de atrapar dichos contaminantes, lo cual se explica con las variables fisicoquímicas *in situ* que se estudian como la temperatura, pH, salinidad y conductividad eléctrica en los sedimentos de la laguna de Tampamachoco (López *et al.*, 2012).

Al mismo tiempo, se ha incrementado la concentración de oxígeno disuelto en los lagos Encantada y Esmeralda, esto indica que el cambio en las concentraciones de oxígeno, logran alterar las propiedades bioquímicas y la calidad misma del sistema (García, 2019). También, los resultados de oxígeno fueron similares en el lago Encantada, donde se apreció una concentración mayor de oxígeno disuelto. Este incremento de oxígeno disuelto está influenciado por otro parámetro fisicoquímico, la temperatura, dado que los incrementos mayores de 5° C en latitudes tropicales provocan pérdidas de oxígeno (López *et al.*, 2012), sin embargo; en el caso del lago “Encantada” la temperatura no es elevada y existe una alta concentración de oxígeno disuelto de modo que el suministro de dicho elemento en el agua puede provenir del intercambio con la atmósfera o de la fotosíntesis de las plantas verdes y las cianobacterias (algas azul-verdes). La fotosíntesis depende de la luz y del intercambio atmosférico que ocurre en la superficie del agua, así, el oxígeno solo puede ingresar en las aguas superiores (Lampert y Sommer, 2007).

En este estudio se lograron aislar 75 colonias bacterianas en medios BRN y BBR. En el lago Encantada se aislaron 30 colonias y Esmeralda 45 colonias, ambas en dos temporadas, estiaje y lluvia. Existen estudios donde se han utilizado los medios BRN y BBR, logrando aislar 469 colonias. Sin embargo, las estaciones muestreadas incluyen: verano, primavera, otoño e invierno (Pucci *et al.*, 2009). De nuevo, con los mismos medios se aislaron 251 colonias durante dos años (Pucci *et al.*, 2010). Un mayor número de estaciones y mayor tiempo de muestreo, podrían ser las razones por las cuales se lograron obtener un número mayor de colonias, que el estudio realizado en Montebello ya que solo se muestrearon dos temporadas en un año. Además, estos medios solo se habían utilizado para sedimentos marinos. Sin embargo, se aislaron 80 colonias bacterianas de la península de Fildes relacionadas al agua, suelo y sedimento, el número de bacterias recuperadas se le atribuye al tipo de sustrato del que se obtuvieron las muestras ambientales (González *et al.*, 2017), el número de bacterias recuperadas fue aproximado al estudio realizado en el PNLN. De manera que, los sedimentos de agua dulce presentan concentraciones apropiadas de

nutrientes como el carbono, nitrógeno y fósforo, además de contener algunos contaminantes, por lo tanto, este medio es propicio para albergar bacterias, ya que estas actúan en las transformaciones biogeoquímicas que conectan con las funciones de un ecosistema acuático (Kou *et al.*, 2016).

El ADN extraído de las muestras y sus amplicones tuvieron una alta concentración (28.9-507.6 ng/μl) y pureza (1.61-1.86 A260/280). En base a la relación al índice de absorbancia corregida a 260 nm en relación a la absorbancia corregida a 280 nm (A260/A280) indica que un índice mayor o muy cercano a 1.8 es aceptado como muestra pura en la cuantificación de ADN genómico, mientras que el índice de absorbancia corregida a 260 nm en relación a la absorbancia corregida 230 nm (A260/A230) indica que el índice de pureza de la muestra debe estar entre 1.8 a 2.2 (Thermo Scientific, 2016).

En este estudio fueron identificadas cuatro especies del género *Arthrobacter*, las cuales tuvieron forma circular y puntiforme en cultivos frescos, los colores fueron amarillo verdoso y blanco, elevación plana y consistencia cremosa. La tinción de Gram fue positiva en formas variadas (bacilo, cocobacilo y cocos). Estas características coinciden, ya que el cultivo en placa es de consistencia suave a blanda y puntiforme, las características microscópicas presentan morfología variada de bacilos a cocos y Grampositivos (Busse, 2016). Inicialmente estos microorganismos tienen forma de bacilos durante la fase logarítmica, luego se acortan en la fase estacionaria y adquieren la apariencia de cocos grandes, sin embargo, en cultivos envejecidos se han observado ambas formas (Comi y Cantoni, 2016). Por otra parte, el color de las colonias puede variar ya que este género produce una gran variedad de pigmentos de color naranja, amarillo, azul, verde e incluso rojo (Sutthiwong *et al.*, 2014). *Arthrobacter* es característico de los suelos, ambientes antárticos marinos y lacustres, son también considerados como indicadores, ya que, estos se presentan con frecuencia en suelos contaminados con productos químicos o radioactivos, son capaces de crecer en este tipo de ambientes debido a su versatilidad metabólica, lo que permite a las bacterias

producir nuevas enzimas. En entornos como el suelo, la regulación eficiente de la expresión enzimática permite la explotación de nutrientes escasos y complejos; ofrece una ventaja selectiva lo que permite un crecimiento óptimo. Esta estrategia de crecimiento es común entre las bacterias dominantes en los ambientes del suelo (Dsouza *et al.*, 2015). El lago “Encantada” presentó un pH alcalino, y por lo tanto, esta propenso a sedimentar contaminantes; por otro lado Esmeralda tenía un mayor de nutrientes (CO<sub>T</sub> y N<sub>T</sub>). Se infiere que esta sean las razones por la cual estas especies estén presentes en ambos lagos. Por último, se enumeran algunas aplicaciones ambientales e industriales, ya que a menudo se usan diferentes colonias en la biorremediación y en la degradación de compuestos de organosulfuro heterocíclicos, haloaromáticos y otras fuentes de carbono (herbicidas, pesticidas) del medio ambiente. Mediante la producción de quitinasa, algunas colonias del género *Arthrobacter* han sido usadas como control biológico de las enfermedades por *Fusarium* (Comi y Cantoni, 2016).

Por otro lado, en este estudio se identificaron 4 especies del género *Bacillus* las cuales presentaron colonias de formas irregulares y filamentosas de color blanco, bordes lobulado y dentados, sin elevación y de consistencia quebradiza, cremosa y suave, mayormente opaco. La tinción de Gram fue positiva mostrando bacterias en forma de bacilos. Estas especies bacterianas se han logrado aislar de sedimentos de agua dulce y marinos, presentan características diversas con formas irregulares y regulares, coloración de blanca a crema. Todos los aislados presentaron una tinción de Gram positiva y forma de bacilos (Tariq *et al.*, 2016). Recientemente, se realizó un análisis metagenómico en los lagos Encantada y Agua Tinta del PNLM y se encontró al género *Bacillus* en los sedimentos (Díaz, 2019), lo cual coincide con los resultados de esta investigación, y permitió el aislamiento de especies de este género. Con respecto a su ecología en hábitats acuáticos, se sabe que las colonias del género *Bacillus* están ampliamente distribuidas en el agua dulce de ríos y lagos, se infiere que una de las causas de la presencia de estas bacterias proviene de las heces y animales invertebrados, estas pueden asociarse con plantas acuáticas y factores abióticos, por

la formación de las biopelículas donde se multiplican, además se ha demostrado que pueden vivir en interacciones con diferentes animales. Además, las especies *Bacillus cereus sensu lato*, están influenciadas por la lluvia y estas a su vez impactan en la calidad microbiológica del agua, estas llegan a los cuerpos de agua probablemente debido a la escorrentía superficial y la contaminación con aguas residuales (Bartoszewicz y Czyzewska, 2017). Las aguas residuales sin tratamiento y las condiciones de temperatura, elevada concentración de nutrientes y otras variables como el pH hacen que el ambiente en los trópicos sea diferente comparado con los de regiones templadas, provocando que estas especies se vuelvan autóctonas, y en consecuencia, se genera una problemática ambiental en estos ecosistemas acuáticos (Larrea *et al.*, 2013). Es posible que la presencia de *Bacillus* se deba a la alta concentración de nutrientes y la alcalinidad que se presenta en los lagos de acuerdo a los que se obtuvo en esta investigación. Por último, se ha propuesto este género para el uso en aplicaciones como la producción de biocombustibles, biopolímeros a base de combustibles no fósiles, agentes antimicrobianos y moléculas bioactivas para uso terapéutico (Kumar *et al.*, 2013).

El género *Rhodococcus* presentó tres especies y sus colonias se describen de forma circular, color crema, borde entero, consistencia mucosa y cremosa, grampositivas y negativas, en formas de cocos y cocobacilos. Este género se ha descrito por la forma característica que presenta después de cuatro días de crecimiento en medios sólidos, presenta colonias mucoides de color rosa salmón a rojo en forma de lágrima. Generalmente en el microscopio se presentan como Gram positivas y tienen la forma de bacilos a cocobacilos (Prescott, 1991; Yamshchikov *et al.*, 2010). La mayoría de ellas son benignas y se ha descubierto que prosperan en una amplia gama de entornos, incluidos el suelo, el agua, células vegetales y eucariotas (Warhurst y Fewson, 1994; Bell *et al.*, 1998; Kuyukina y Ivshina, 2010). Además, pueden persistir y crecer en suelos y aguas altamente contaminados, e incluso en condiciones limitadas de oxígeno y nutrientes. Su ocurrencia natural en ambientes contaminados, la amplia versatilidad catabólica, las adaptaciones



fisiológicas y ecológicas a condiciones ambientales extremas implican que pueden desempeñar un papel importante tanto en la degradación natural de contaminantes persistentes, así mismo se ha colocado como un indicador, ya que estas especies se han presentado en entornos donde hay hidrocarburos presentes. Se sugiere que estas bacterias son alcalinotróficas típicas del suelo a través de diversos tipos ecológicos y regiones climáticas (Kuyukina y Ivshina, 2010). Este supuesto ayudaría a entender la presencia de este género en los lagos de Montebello que presentaron un pH alcalino. Por último, demuestra una notable capacidad para degradar y transformar una amplia variedad de compuestos orgánicos naturales y xenobióticos a través de diversas vías catabólicas. Además de la capacidad de metabolizar un amplio espectro de compuestos químicos, la tolerancia celular a sustratos y solventes tóxicos, la falta frecuente de represión de catabólitos, la producción de biosurfactantes y la persistencia ambiental los hacen excelentes candidatos para la biorremediación y la bioconversión (Larkin *et al.*, 2006; Martínková *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2018).

Por otro lado, se aisló ESM-LLU-38 perteneciente a *Deinococcus indicus* que mostró colonias en forma circular de color rojo, borde entero y elevación convexa de consistencia cremosa, Gram positiva y la forma microscópica de bacilos. La especie es reportada y aislada de un acuífero en la India y se describe como un microorganismo con una pigmentación de color rojo y en forma de bacilo gramnegativa (Suresh *et al.*, 2004), lo cual fue similar con algunas características mencionadas de la colonia de este estudio en Montebello, sin embargo, la tinción fue grampositiva. Esto puede explicarse ya que la mayoría de las bacterias de este género se pueden clasificar fácilmente como Gram positivas o Gram negativas debido a la presencia o ausencia de una pared celular gruesa de peptidoglicano que secuestra la mancha de colorante después del tratamiento. La envoltura celular difiere según la especie y exhibe una estructura y composición inusuales (Gerber *et al.*, 2015). El género se aísla de distintos sitios, como la rizósfera de las plantas, agua dulce, suelo del desierto, peces marinos y el aire (Lai *et al.*, 2006; Im *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009; Shashidhar y Bandekar, 2009; Yoo *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2016a), incluyendo el sedimento de

ríos, como el río Han en Seúl, Corea. *Deinococcus sedimenti*, esta especie puede ser propia del sedimento (Lee *et al.*, 2016b). Estos microorganismos son conocidos por ser los más resistentes a la radiación que se han descubierto, muestran una resistencia notable a una gama de daños causados por la radiación ionizante, la desecación, la radiación UV y los agentes oxidantes, además se ha demostrado la robustez de este género poliextremófilo para su uso en el metabolismo o la biorremediación de compuestos tóxicos como moléculas orgánicas o metales pesados en entornos radiactivos, incluso se ha logrado descubrir colonias industriales con la capacidad de usar desechos orgánicos y biomasa lignocelulósica de manera más eficiente y con una tolerancia mejorada a diversos tipos de estrés abióticos y bióticos (Gerber *et al.*, 2015).

También, en este estudio se encontró la presencia del género *Exiguobacterium*, con colonias características de forma circular, color naranja con un halo blanco, borde entero, plano y cremoso, tinción de Gram positiva en forma de bacilos, dichas características son similares a las reportadas de una especie aislada del sedimento marino en la India, las células son Gram positivas en forma de bacilos a cocobacilos, el color es naranja amarillento y borde entero (Dastager *et al.*, 2015). También, se ha evidenciado que estos microorganismos miembros de este género forman dos grupos distintos, el grupo I incluye colonias aisladas de ambientes de temperatura baja y el grupo II de ambientes de aguas termales, marinos y ligeramente alcalinos (Vishnivetskaya *et al.*, 2009), las muestras del sedimento obtenidas de Montebello, presentaron un pH alcalino, por lo cual se sobrentiende que pertenece al grupo II. Por otro lado, se registran algunos hábitats donde este género se ha logrado aislar, mayormente en suelos de ambientes fríos, contaminados químicamente por desechos industriales, muestras de mineral de uranio, de ríos, del agua de mar, la rizosfera de las plantas, suelos de lagos salados, manantiales y aguas termales. Teniendo en cuenta estas muestras ambientales, está claro que varían en la concentración alta o baja de nutrientes, sugiere la supervivencia utilizando una amplia gama de nutrientes (Kasana y Pandey, 2018). De manera que los sedimentos obtenidos específicamente

del lago “Esmeralda” presentaron un mayor contenido de nutrientes ( $\text{CO}_T$  y  $\text{N}_T$ ), justifique la presencia de este género.

Estudios sobre el genoma de varias especies de este género han detectado genes relacionados al estrés térmico, compuestos tóxicos como antibióticos, arsénico, cadmio, cromo y mercurio; genes de transporte para diversos iones, sistema de reparación de ADN y la oxidación podrían ser responsables de la adaptabilidad a una amplia gama de ambientes extremos. Por último, enfatizan el potencial biotecnológico de los microorganismos del género *Exiguobacterium* las que han sido utilizadas para la producción de enzimas, la biorremediación y la degradación de sustancias tóxicas liberadas al medio ambiente (Kasana y Pandey, 2018).

Mientras tanto *Pseudomonas koreensis* presentó una forma circular de color crema, borde entero y plano, consistencia cremosa, tinción de Gram positiva en forma de cocobacilos. Esta especie presentó células en forma de bacilos, las colonias son circulares y de color blanco-amarillo en agar Luria-Bertani (LB), esta coloración depende del medio donde se siembre y se vuelven mucosas después de 2 días (Kwon *et al.*, 2003). Esta especie presenta células gramnegativas, sin embargo, existen distintos factores sobre los cuales la tinción de Gram cambie en las distintas especies, incluida la mala calidad de la muestra, la preparación del frotis e incluso la interpretación de los frotis (Samuel *et al.*, 2016). En un análisis metagenómico basándose el gen ARNr 16S en sedimentos de lagos del PNLM se demostró la presencia del género *Pseudomonas* con abundancia relativa del 8% (Díaz, 2019), lo cual ha sido un antecedente para poder aislar este género bacteriano en el presente estudio. El género puede tener importancia ecológica significativa ya que hidrolizan una amplia variedad de compuestos orgánicos (por ejemplo, varios carbohidratos y biomacromoléculas), este género se encuentra dentro de los lagos de agua dulce oligotróficos y eutróficos (Michaud *et al.*, 2012). *Pseudomas* puede ser encontrada en el suelo y se comporta como desnitrificante, teniendo un papel importante en el ciclo del nitrógeno en la naturaleza (SOARES, 1996; Marchand, 2002). Una variable ambiental que influye en la desnitrificación es el pH, ya que las condiciones óptimas

para llevarse a cabo se encuentran dentro de los valores ligeramente alcalinos (Cervantes *et al.*, 2000). Esto justifica la presencia de *Pseudomonas*, ya que el sedimento del lago “Encantada” presenta un pH alcalino, además de inferir que este microorganismo está implicado en la desnitrificación.

Otro microorganismo aislado fue *Microbacterium oxydans*, el cual presentó en su colonia la forma puntiforme de color verde amarillo, borde entero, plana, consistencia suave, y en el microscopio se observó una tinción Gram positiva en forma de bacilos. La familia *Microbacteriaceae*, como *M. oxydans*, es bien conocida por su capacidad para producir pigmentos de tipo carotenoide, posee un pigmento amarillento, que se ha demostrado se produce bajo la exposición de la luz, lo cual protege a la exposición a la luz UV, observando colonias puntiformes (Meddeb-Mouelhi *et al.*, 2016). Este microorganismo también se ha logrado aislar de sedimentos del lago Taihu en China con forma de bacilos y presentan tinción Gram positiva, también se ha demostrado su capacidad de degradar fenol, y con ello demuestra su potencial en la biorremediación de ambientes contaminados con dicho solvente (Wang *et al.*, 2016). El uso biotecnológico de la especie ha sido enfocado en la biorremediación de iones metálicos de sitios contaminados, en el suelo y el agua, iones como el cobre y níquel, que en rangos óptimos la eliminación ha sido mayor al 80%, por lo tanto, podrían usarse como una alternativa poderosa a otros métodos costosos que se usan para eliminar iones metálicos (Heidari *et al.*, 2020).

La colonia perteneciente a *Psychrobacillus soli* presentó en forma circular de color blanco, borde entero y plano, consistencia cremosa tinción de Gram positiva en forma de cocobacilos. No todas las características de esta especie se han descrito, sin embargo, se sabe que estas bacterias son grampositivas en forma de bacilos/cocos. Esta especie fue aislada de suelos contaminados con petróleo en Mongolia, y se demostró la capacidad de degradar este hidrocarburo, por lo cual tiene potencial para la aplicación ambiental (Thi-Pham *et al.*, 2015). Los microorganismos del género *Psychrobacillus* se han clasificado como psicrotolerantes debido a que contienen

algunos genes implicados en la adaptación a entornos extremos de baja temperatura al cambiar su contenido del genoma para obtener una mayor capacidad de reparación del ADN, traducción y transporte de membrana (Choi *et al.*, 2020).

## IX.CONCLUSIÓN

- El contenido de CO<sub>T</sub> y N<sub>T</sub> tienen una correlación de 0.941 en el sedimento del lago “Esmeralda”, lo cual puede deberse al proceso de endogénesis que se produce por desechos de organismos acuáticos y procesos exógenos como actividades de ganadería, agricultura y el crecimiento de tulares y carrizales, lo cual infiere un proceso de eutrofización.
- El lago “Encantada” presentó un sedimento con una correlación de 0.689 entre el pH y oxígeno disuelto, al tener un pH alcalino de 9.13 tiende a sedimentar mayormente los metales pesados y sustancias tóxicas, mientras la concentración de oxígeno disuelto de 9 mg/L puede deberse al intercambio gaseoso y a la fotosíntesis.
- Se aislaron 75 colonias, 30 de las cuales fueron del lago “Encantada” y 45 del lago “Esmeralda” durante las temporadas de estiaje y lluvia, el número de aislados se ha relacionado con las características fisicoquímicas de la muestra ambiental, por lo tanto, el sedimento presentó una mayor concentración de nutrientes lo cual hace posible el aislamiento de una cantidad considerable de bacterias.
- El secuenciamiento del gen ARNr 16S de las colonias aisladas permitió la identificación de varios géneros que se presentaron en los lagos “Encantada” y “Esmeralda” tales como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*. En el lago Encantada se encontró el género *Pseudomonas*, mientras que en el lago Esmeralda los géneros *Deinococcus*, *Microbacterium*, *Psychrobacillus* y *Rhodococcus*. Estos microorganismos han sido utilizados ampliamente con potencial biotecnológico en el área ambiental para la biorremediación y degradación de sustancias tóxicas en los mismos ecosistemas de donde fueron aislados.

## **X. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES**

- Realizar el monitoreo de las variables fisicoquímicas por mayor tiempo, contemplando más estaciones del año, sobre todo en las variables  $CO_T$ ,  $N_T$  y  $P_T$  para predecir los procesos de eutrofización en los lagos.
- El uso de medios específicos con la finalidad de aislar una mayor diversidad de géneros e incluso evaluar las condiciones anaeróbicas, ya que estas bacterias son abundantes en los sedimentos de agua dulce.
- Establecer estrategias experimentales para el aprovechamiento biotecnológico de las especies nativas aisladas e identificadas mediante el gen ARNr 16S, en procesos de biorremediación y degradación de ciertas sustancias a nivel ambiental.

## XI. LITERATURA CITADA

- Abarca, F. J. 2002. Definición e importancia de los humedales. En: Abarca, F. J. y Herzing, M. (Eds.). Manual para el Manejo y Conservación de los Humedales en México. INNE, PRONATURA, SEMARNAT, North American Wetlands Conservation Council, RAMSAR, The Nature Conservancy, Society of Wetlands Scientists, Comité Pigua, Ducqs Unlimited de Mexico, Arizona Game and Fish, WNCCWS. México. Pp. 33-45.
- Alcocer, J. 2007. El agua epicontinental de México. *Ciencia*. 58 (3): 26-35
- Alcocer, J., Oseguera L. A., Ardiles V. S., Mora L. y Prado B. 2018. Sediment characteristics of 18 tropical, karst lakes in Chiapas, Mexico. Memorias del VI Simposium Internacional sobre Manejo de Sedimentos. San Cristóbal de las Casas, Chiapas. México. Pp. 77-82.
- Alcocer, J., Oseguera, L. A., Sánchez, G., González, C. G., Martínez, J. R., y González, R. 2016. Bathymetric and morphometric surveys of the Montebello Lakes, Chiapas. *Journal of Limnology*. 75: 56–65. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1343>
- Alejos-Velázquez L. P., Aragón-Martínez M. C. y Cornejo-Romero A. 2014. Extracción y Purificación de ADN. En: Cornejo-Romero A., Serrato-Díaz A., Rendón-Aguilar B., Rocha-Munive M. G. (Eds.). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. SEMARNAT, INECC. México. Pp. 1-19.
- Baron J. S., LeRoy-Poff N., Angermeier P. L., Dahm C. N., Gleick P. H., Hairston N. G., Jackson R. J., Johnston C. A., Richter B. D. y Steinman A. D. 2003. Ecosistemas de agua dulce sustentables. *Tópicos en ecología*. 10: 2-16.
- Bartoszewicz, M. y Czyzewska, U. 2017. Spores and vegetative cells of phenotypically and genetically diverse *Bacillus cereus sensu lato* are common bacteria in fresh water of northeastern Poland. *Canadian Journal of Microbiology*. 63(12): 939-950. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0337>



- Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. J. y Christofi, N. 1998. The genus *Rhodococcus*. A review. *Journal of Applied Microbiology*. 85:195–210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00525.x>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., y Valdezate, S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Busse, H. J., 2016. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 66:9-37. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000702>.
- Carroll, K. C., Morse, S. A., Mietzner, T. y Miller, S. 2016. Jawetz, Melnick, & Adalberg's Medical microbiology. 27ª edición. McGraw-Hill Education. EUA.
- Carter, P. W. y Miterer R. M. 1978. Amino acid of organic matter associated with carbonate and non-carbonate sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 42 (8): 1231-1238. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(78\)90116-3](https://doi.org/10.1016/0016-7037(78)90116-3)
- Cervantes-Carrillo, F., Pérez, J. y Gómez J. 2000. Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42: 73-82.
- CFE-GEIC. 2012. Estudio para conocer la calidad del agua de las Lagunas de Montebello, Chiapas. Primera etapa: Diagnóstico. 1-4. Chiapas
- Cheng, W., Zhang, J., Wang, Z., Wang, M., y Xie, S. 2014. Bacterial communities in sediments of a drinking water reservoir. *Annals of Microbiology*, 64(2): 875–878. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0712-z>

- Choi, J. Y., Kim, S. C. y Lee, P. C. 2020. Comparative genome analysis of *Psychrobacillus* strain PB01, isolated from an Iceberg. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30(2): 237-243. <https://doi.org/10.4014/jmb.1909.09008>
- Comi, G. y Cantoni, C. 2016. *Arthrobacter* spp. In milk and milk products. Elsevier Inc. Amsterdam. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.01029-5>
- Cowgill, U. M., Hutchinson, G. E., Racek, A. A., Goulden, C. E., Patrick, R., y Tsukada, M. 1966. The history of Laguna de Petenxil: A small lake in Northern Guatemala. *Memoirs of the Connecticut Academy of Arts and Sciences*. 17: 1-126.
- Cranwell, P. A. 1982. Lipids of aquatic sediments and sedimenting particulates. *Progress in Lipid Research*. 21(4): 271-308. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(82\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0163-7827(82)90012-1)
- Dastager, S. G., Mawlankar, R., Sonalkar, V. V., Thorat, M. N., Mual, P., Verma, A., Krishnamurthi, S., Tang, S. K. y Li, W. J. 2015. *Exiguobacterium enclense* sp. nov., isolated from sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65: 1611-1616. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.000149>
- De Dios, T., Ibarra C. y Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reaccion en cadena de la polimerasa (PCR) y dela PCR e tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2(2): 70-78.
- Díaz-Cancino, C. E. 2019. Estudio ambiental y comunidades bacterianas en sedimentos de lagos de Montebello Chiapas, en diferentes épocas del año. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tecnológico Nacional de México. México Chiapas.
- Dodds, W. y Whiles M. R. 2010. Freshwater ecology: Concepts and environmental applications of limnology. 2ª edición. Elsevier. EUA.

- Dodson, S. I. 2005. Introduction to Limnology. McGraw-Hill. EUA.
- Dsouza, M., Taylor, M. W., Turner, S. J. y Aislabie, J. 2015. Genomic and phenotypic insights into the ecology of *Arthrobacter* from antarctic soils. *BMC Genomics*. 16(36): 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1220-2>
- Fierro-Fierro, F. 2014. Electroforesis de ADN. En: Cornejo-Romero A., Serrato-Díaz A., Rendón-Aguilar B., Rocha-Munive M. G. (Eds.). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. SEMARNAT e INECC. México. Pp. 27-51.
- García-Rodríguez J. A. 2019. Estructura y diversidad de comunidades de arqueas asociadas a sedimentos de Lagos de Montebello, Chiapas, México. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tecnológico Nacional de México. México Chiapas.
- Gerber, E., Bernanrd, R., Castang, N., Chabot, F., Coze, F., Dreux-Zigha, A., Hauser, E., Hivin, P., Joseph, P., Lazarelli, C., Letelier, G., Olive, J. y Leonetti, J. P. 2015. *Deinococcus* as new chassis for industrial biotechnology: biology, physiology and tools. *Journal Applied Microbiology*. 119: 1-10. <https://doi.org/10.1111/jam.12808>
- González-Rocha, G., Muñoz-Cartes, G., Canales-Aguirre, C. B., Lima, C. A., Domínguez-Yévenes, M., Bello-Toledo, H. y Hernández C. E. 2017. Diversity structure of culturable bacteria isolated from the Fildes peninsula (King George island, Antartica): A phylogenetic analysis perspective. *PLoS ONE*.12(6): 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179390>
- Heidari, P., Mazloomi, F. y Sanaeizade, S. 2020. Optimization study of nickel and copper bioremediation by *Microbacterium oxydans* strain CM3 and CM7. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*. 29(4): 438-451. <https://doi.org/10.1080/15320383.2020.1738335>

- Im, W. T., Jung, H. M., Ten, L. N., Kim, M. K., Bora, N., Goodfellow, M., Lim, S., Jung, J., y Lee, S.T. 2008. *Deinococcus aquaticus* sp. nov., isolated from fresh water, and *Deinococcus caeni* sp. nov., isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 2348-2353. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64082-0>
- Kasana, R. C. y Pandey, C. B. 2018. *Exiguobacterium*: an overview of a versatile genus with potential in industry and agricultura. *Critical Reviews in Biotechnology*. 38(1): 141-156. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1312273>
- Kim, D., Choi, K. Y., Yoo, M., Zylstra, G. J. y Kim, E. 2018. Biotechnological Potential of *Rhodococcus* Biodegradative Pathways. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(7): 1037-1051. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.08.064>
- Kou, W., Zhang, J., Lu, X., Ma, Y., Mou X. y Wu, L. 2016. Identification of bacterial communities in sediments of Poyang lake, the largest freshwater lake in China. *SpringerPlus*. 5(401): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2026-7>
- Kumar, P., Patel, S. K. S., Lee, J. K., Kaila, V. C. 2013. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 31: 1543-1561. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.007>
- Kurt, H. 2019. Depth distribution of microbial diversity in lakes. En: Bandh, S. A., Shafi, S. y Shameem, N. (Eds.). *Freshwater microbiology: Perspectives of bacterial dynamics in lake ecosystems*. Academic Press. Reino Unido.
- Kuyukina, M. S. y Ivshina I. B. 2010. Application of *Rhodococcus* in Bioremediation of Contaminated Environments. En: Alvarez, H. (Eds.). *Biology of Rhodococcus*. Springer. Berlin, Heidelberg. Pp. 231-262. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-12937-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-12937-7_9)

- Kwon, S. W., Kim, J. S., Park, I. C., Yoon, S. H., Park, D. H., Lim, C. K. y Go, S. J. 2003. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsungensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 21-27. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02326-0>
- Lai, W. A., Kämpfer, P., Arun, A. B., Shen, F. T., Huber, B., Rekha, P. D., y Young, C. C. 2006. *Deinococcus ficus* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Ficus religiosa* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56, 787–791. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64007-0>
- Lampert, W. y Sommer, U. 2007. Limnoecology. 2ª edición. Oxford University Press Inc. Nueva York.
- Larkin, M.J., Kulakov, L. A., Allen, C. C. 2006. Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology, and genetic adaptation. *Advances in applied microbiology*. 59: 1-29. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(06\)59001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(06)59001-X)
- Larrea-Murrell, J. A., Rojas-Badía, M. M., Romeu-Álvarez, B., Rojas-Hernández, M. y Heydrich-Pérez M. 2013. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 44(3): 24-34.
- Lee, J. J., Lee, Y. H., Park, S. J., Lim, S., Jeong, S. W., Lee, S. Y., Park, S., Cho, Y. J., Kim, M. K. y Jung, H. Y. 2016a. *Deinococcus seoulensis* sp. nov., a bacterium isolated from sediment at Han River in Seoul, Republic of Korea. *Journal of Microbiology*. 54(8): 537-542. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6253-y>
- Lee, J. J., Lee, Y. H., Park, S. J., Lim, S., Jeong, S. W., Lee, S. Y., Park, S., Choi, H. W., Kim, M. K. y Jung, H. Y. 2016b. *Deinococcus sedimenti* sp. nov. isolated from river sediment. *Journal of Microbiology*. 54(12): 802-808. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6361-8>

- López-Jácome L. E., Hernández-Durán M., Colín-Castro C. A., Ortega-Peña S., Cerón-González G. y Franco-Cendejas R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación de discapacidad*. 3 (1): 10-18.
- López-Jiménez, M. A., Monks, S., Serrano, A., Pulido-Flores, G., Gaytan-Oyarzun J. C. y López-Ortega M. 2012. Dinámica de las variables fisicoquímicas del sedimento de la laguna de Tampamachoco, Veracruz, México. *Revista científica UDO agrícola*. 12 (4): 965-972.
- Luque, J. y Herráez, A. 2001. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier science. España
- Lu, S., Si, J., Qi, Y., Wang, Z., Wu, X. y Hou C. 2016. Distribution characteristics of TOC, TN and TP in the wetland sediments of Longbao Lake in the San-Jiang head waters. *Acta geophysica*. 64 (6): 2471-2486. <https://doi.org/10.1515/acgeo-2016-0093>
- Madigan M. T., Martinko J. M., Bender K. S., Buckley K. S. y Stahl D. V. 2015. *Biología de los microorganismos*. 14ª Edición. Pearson Education.
- Marchand-Pajares, E. O. 2002. Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en Lima Metropolitana. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú.
- Margaleff R. 1983. *Limnología*. OMEGA. España. Barcelona.
- Márquez-Valdelamar, L. M., Serrato-Díaz, A. y Cerritos-Flores, R. 2014. Secuenciación de fragmentos de ADN. En: Cornejo-Romero A., Serrato-Díaz A., Rendón-Aguilar B., Rocha-Munive M. G. (Eds.). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. SEMARNAT, INECC. México. Pp. 1-19.
- Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nesvera, J. y Kren, V. 2009. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*. 35: 162-177. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.018>

- Meddeb-Mouelhi, F., Moisan, J. K., Bergeron, J., Daoust, B. y Beauregard, M. 2016. Structural characterization of a novel antioxidant pigment produced by a photochromogenic *Microbacterium oxydans* strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 180(7): 1286-1300. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2167-8>
- Michaud, L., Caruso, C., Mangano, S., Interdonato, F., Bruni, V. y Lo-Giudice. 2012. Predominance of *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, and *Polaromonas* within the prokaryotic community of freshwater shallow lakes in the northern Victoria Land, East Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*. 82:391-404. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01394.x>
- Mitra A., Fazli P., Zaman S., Pramanick P. y Mitra A. 2014. Lakes and their origin. <https://doi.org/10.13140/2.1.2865.0880>. Consultado el 11 de Julio de 2018.
- Mora L. P., Bonifaz R. y López-Martínez R. 2016. Unidades geomorfológicas de la cuenca del Río Grande de Comitán, Lagos de Montebello, Chiapas-México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 68 (3): 377-394.
- Morales-Sánchez D. y Gallo-Ramírez L. E. 2006. Curso: Métodos físicoquímicos en biotecnología. Plataformas de proteómica. [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas\\_de\\_proteomica.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf). Consultado el 08 de mayo de 2019.
- NCBI. 2019. Blast® Help. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1762/pdf/Bookshelf\\_NBK1762.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1762/pdf/Bookshelf_NBK1762.pdf) Consultado el 13 de abril 2019
- NCBI. S.d. Our Mission. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/about/mission/>. Consultado el 01 mayo de 2019
- Olive, D. M. y Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-Based typing of microbial organisms. *Journal of clinical microbiology*. 37 (6): 1661-1669. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1661-1669.1999>
- Passarge, E. 2007. *Génética: Texto y atlas*. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. España.

- Peng, F., Zhang, L., Luo, X., Dai, J., An, H., Tang, Y., y Fang, C. 2009. *Deinococcus xinjiangensis* sp. nov., isolated from desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59: 709–713. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.004564-0>
- Peña, C. 2011. Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*. 18 (2): 265-267. <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i2.243>
- Prescott, J. F. 1991. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 4: 20-34. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.1.20>
- Pucci, G. N., Acuña, A. J., Llanes M. L, Tiedemann M. C. y Pucci O. H. 2009. Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad Introducción Material y métodos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44(1): 49–58. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572009000100005>
- Pucci, G. N., Acuña, A. J., Tonin, N., Tiedemann M. C. y Pucci O. H. 2010. Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdova, Argentina. *Revista peruana de biología*. 17 (2): 237-244. <https://doi.org/10.15381/rpb.v17i2.34>
- Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Versalovic, J. y De Bruijn, F. J. 2004. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. En: Kowalchuk, G. A., De Bruijn, F. J., Head, I. M., Akkermans, A. D., Van Elsas J. D. (Eds.). *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publisher. Holanda, Dordrecht. Pp 1-33.
- Rodríguez, A. y Arenas, R. 2018. Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología cosmética, médica y quirúrgica*. 16 (2): 166-167.
- Rogers, M. A. 1965. Carbohydrates in aquatic plants and associated sediments from two Minnesota lakes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 29 (3): 183-200. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(65\)90114-6](https://doi.org/10.1016/0016-7037(65)90114-6)
- Roldán-Pérez G. y Ramírez-Restrepo J. J. 2008. *Fundamentos de Limnología neotropical*. 2ª Edición. Universidad de Antioquia. Colombia. Medellín.



- Samuel, L. P., Balada-Llasat, J. M., Harrington, A. y Cavagnolo, R. 2016. Multicenter assessment of Gram stain error rates. *Journal of Microbiology*. 54(6): 1442-1447. <https://doi.org/10.1128/JCM.03066-15>
- Schutl F., A. prins R. y Gottschal J. C. 1997. Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquatic Microbial Ecology*. 12: 177-202. <https://doi.org/10.3354/ame012177>
- SEMARNAT. 2007. Programa de conservación y manejo Parque Nacional Lagunas de Montebello. <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/568.pdf>. Consultado el 28 de agosto de 2018.
- Shashidhar, R. y Bandekar, J. R. 2009. *Deinococcus piscis* sp. nov., a radiation-resistant bacterium isolated from a marine fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59: 2714–2717. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.003046-0>
- Shendure J., Balasubramanian S., Church G. M., Gilbert W., Rogers J., Scholss J. A. y Waterston R. 2017. Review: DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 1-9. <https://doi:10.1038/nature24286>
- Sigee D. V. 2005. Freshwater microbiology. John Wiley & Sons, LTD. EUA
- Smith R. L. y Smith T. M. 2001. Ecología. 4ª edición. Pearson Education. España
- Smith R. L. y Smith T. M. 2007. Ecología. 6ª edición. Pearson Education. España
- Soares, P., Silva, C. y Da Cruz, O. 1996. *Pseudomonas aeruginosa* como indicador em análises bacteriológicas de águas de abastecimento público. *Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental*. 2(14): 1-64.
- Spring, S., Schulze, R., Overmann, J., y Schleifer, K. H. 2000. Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: Molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5): 573–590. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00046-2)

- Straskrabova, V. y Komarkova, J. 1979. Seasonal changes of bacterioplankton in a reservoir related to algae. 1. Numbers and biomass. *International Review of hydrobiology*. 64(3): 285–302. <https://doi.org/10.1002/iroh.19790640302>
- Suresh, K., Reddy, G. S. N., Sengupta, S. y Shivaji, S. 2004. *Deinococcus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium from an aquifer in West Bengal, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 457-461. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02758-0>
- Sutthiwong, N., Fouillaud, M., Valla, A., Caro, Y. y Dufossé, L. 2014. Bacteria belonging to the extremely versatile genus *Arthrobacter* as novel source of natural pigments with extended hue range. *Food Research International*. 65: 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.024>
- Tamaki, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Nomura, N., Matsumura, M., Nakamura, K., y Kamagata, Y. 2005. Comparative Analysis of Bacterial Diversity in Freshwater Sediment of a Shallow Eutrophic Lake by Molecular and Improved Cultivation-Based Techniques Comparative Analysis of Bacterial Diversity in Freshwater Sediment of a Shallow Eutrophic Lake by Molecul. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4): 2162–2169. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2162>
- Tariq, A. L., Sudha, S. y Reyaz, A. L. 2016. Isolation and screening of *Bacillus* species from sediments and application in bioremediation, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5(6): 916-924. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.099>
- Thermo Scientific. 2016. Espectrofotómetros micro-UV/Vis NanoDrop One: Guía de usuario. Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington.
- Thi-Pham, V. H., Jeong, S. W. y Kim, J. 2015. *Psychrobacillus soli* sp. nov., capable of degrading oil, isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65: 3046-3052. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000375>
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. 2007. Introducción a la microbiología. 9ª edición. Médica Panamericana. Argentina.

- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E. y Vargas-Albores, F. 2015. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*. 41 (4): 297-313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A. y Hays J. P. 2008. Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer Science y Bussiness Media. Nueva York.
- Vásquez-Sánchez M. A. y Méndez-Gómez E. 1994. Aspectos generales de la región: Lagos de Montebello. Reporte del trabajo para el curso de conservación de naturaleza y recursos naturales. Tesis de Maestría. ECOSUR. México.
- Vera-Franco, M. N., Hernández-Victoria, P. P., Alcocer J., Ardiles-Gloria, V., y Oseguera, L. A. 2015. Concentración y distribución vertical de la clorofila-a fitoplanctónica en los lagos de Montebello, Chiapas. *Tendencias de Investigación En Limnología Tropical: Perspectivas Universitarias En Latinoamérica*. 107–114.
- Vishnivetskaya, T. A., Kathariou, S. y Tiedje, J. M. 2009. The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles*. 13: 541-555. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0243-5>
- Wang, L., Li, Y., Niu, L., Dai, Y., Wu, Y. y Wang, Q. 2016. Isolation and growth kinetics of a novel phenol-degrading bacterium *Microbacterium oxydans* from the sediment of Taihu lake (China). *Water Science & Technology*. 73(8): 1882-1890. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.036>
- Warhurst, A. M. y Fewson, C. A. 1994. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 14: 29–73. <https://doi.org/10.3109/07388559409079833>
- Wetzel, R. G. 2001. Limnology: Lake and river ecosystems. 3ª edición. Academic press. EUA.
- Yamshchikov, A. V., Schuetz, A. y Lyon, M. 2010. *Rhodococcus equi* infection. *Grand Round*. 10(5): 350-359.

- Yoo, S. H., Weon, H. Y., Kim, S. J., Kim, Y. S., Kim, B. Y., y Kwon, S. W. 2010. *Deinococcus aerolatus* sp. nov. and *Deinococcus aerophilus* sp. nov., isolated from air samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 1191–1195. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016030-0>
- Zhang, J., Yang, Y., Zhao, L., Li, Y., Xie, S., y Liu, Y. 2015. Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau freshwater lakes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99(10): 3291–3302. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6341-z>
- Zymo Research. S.d. Instruction Manual: Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit. [https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_d6005\\_quick-dna\\_fungal-bacterial\\_miniprep\\_kit.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_d6005_quick-dna_fungal-bacterial_miniprep_kit.pdf). Consultado el 07 de mayo de 2019

## XII. ANEXOS

### Anexo 1.

Anexo 1: Morfologías y tinciones de Gram de los géneros identificados en los lagos la Encantada y la Esmeralda del Parque Nacional Lagunas de Montebello.

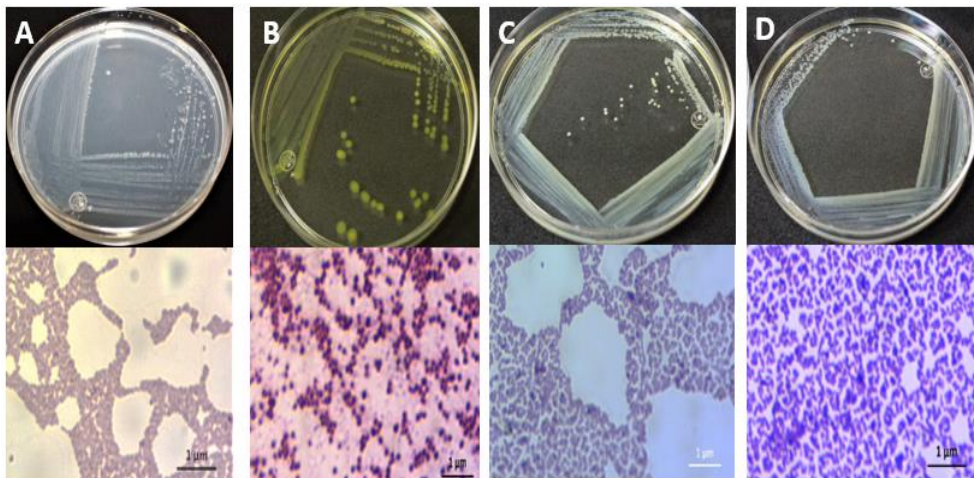


Figura 29. Morfología (arriba) y tinción (abajo) del género *Arthrobacter*. A) Colonía ESM-EST-9 B) Colonía ENC-EST-32 C) Colonía ESM-EST-44 D) Colonía ESM-EST-61.

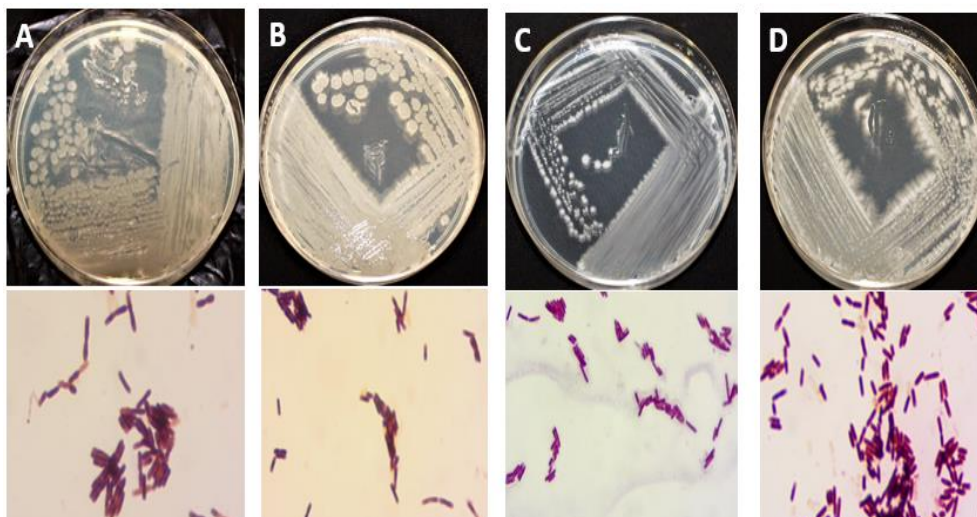


Figura 30. Morfología (arriba) y tinción (abajo) del género *Bacillus*. A) Colonía ENC-EST-1 B) Colonía ESM-LLU-3 C) Colonía ESM-LLU-12 D) Colonía ESM-LLU-20.

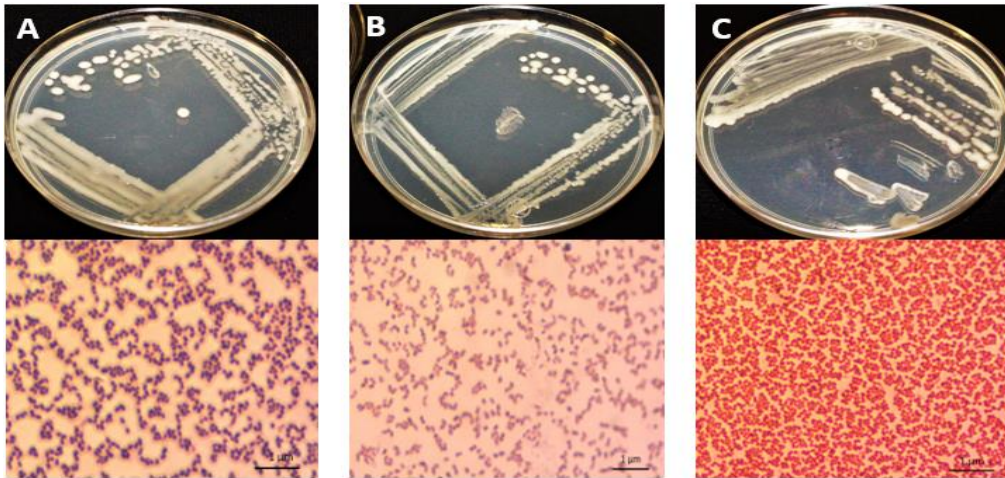


Figura 31. Morfología (arriba) y tinción (abajo) del género *Rhodococcus*. A) Colonia ESM-EST-5 B) Colonia ESM-EST-16 C) Colonia ESM-LLU-17.

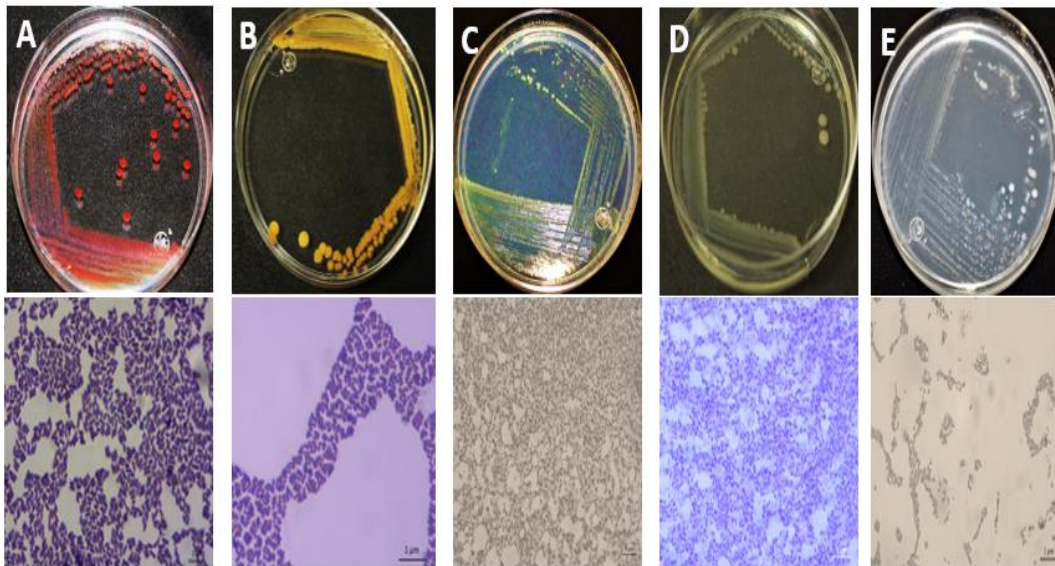


Figura 32. Morfología (arriba) y tinción (abajo) de los géneros A) *Deinococcus* colonia ESM-LLU-38 B) *Exiguobacterium* colonia ESM-LLU-21 C) *Microbacterium* colonia ESM-EST-19 D) *Pseudomonas* colonia ENC-LLU-47 E) *Psychrobacillus* colonia ESM-LLU-10.