

Instituto Tecnológico Superior de Abasolo

Organismo Público Descentralizado del Gobierno del Estado de Guanajuato.



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIQUENES EN LA MINA “SAN RAMÓN” Y EN LA COMUNIDAD ALTO DE NEGRETE

Tesis profesional para obtener el título de:
Ingeniero en Ingeniería Ambiental

PRESENTA:

Oscar Daniel Ramírez Moreno

ASESORES:

Dr. César Álvarez Mejía

Dra. Varinia López Ramírez

Abasolo, Gto. Junio de 2017

Agradecimientos

A mis padres Eliseo Ramírez Murillo y María Eugenia Moreno de la Torre, que con sacrificio siempre me apoyaron y me motivaron para seguir estudiando, y así poder concluir con esta gran etapa ya que sin su apoyo no hubiese sido posible.

Al Dr. César Álvarez Mejía y a la Dr. Varinia López Ramírez, por compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo, y sobre todo por su paciencia y confianza para poder realizar este proyecto.

A mis compañeros que de alguna manera fueron un factor muy importante durante todos estos años de estudio, ya que fueron capaces de compartir sus conocimientos, ideales, creencias y sobretodo su amistad todos estos años.

Resumen

Los líquenes son el resultado de una asociación simbiótica entre un hongo y un alga, al componente fúngico del liquen que es el hongo se denomina micobionte y al componente por parte del alga se denomina fitobionte.

El objetivo de este estudio fue coleccionar, identificar y comparar las poblaciones de líquenes presentes en jales Mineros y una comunidad rural. Lo cual se logro coleccionando muestras de líquenes en ambos sitios de interés, y posteriormente con el uso de guías taxonómicas y mediante distintas pruebas químicas en laboratorio se determinaron los géneros de los líquenes coleccionados.

De un total de 34 muestras coleccionadas en los sitios de interés de las cuales 24 fueron coleccionadas en las minas San Ramón, San Cayetano, en donde se logro identificar 8 géneros diferentes de líquenes y solo 10 muestras en comunidad Alto de negrete, de las cuales se identificaron 5 géneros diferentes de líquenes, de estos 12 géneros encontrados en ambos sitios, 4 coinciden en ambos.

Debido a la gran coincidencia de estos 4 géneros en ambos sitios se llego a la conclusión de que esto puede ser un indicio de que la comunidad de Alto de Negrete presenta un grado de contaminación, esto debido principalmente por las actividades agrícolas que se realizan en la comunidad.

Esta investigación ha permitido demostrar la presencia y distribución de especies líquénicas en jales mineros, en las Minas San Ramón y San Cayetano en Guanajuato y en la comunidad de Alto de Negrete.

Tabla de Contenido

Introducción.....	1
Capítulo I.....	2
Marco teórico.....	2
1.1 Minería en México	3
1.1.1 Minería en Guanajuato.....	3
1.2.1Jales Mineros	4
1.3 Líquenes	4
1.4 Formas de crecimiento (Biotipos).....	6
1.5 Reproducción de los líquenes	8
1.5.1 Reproducción asexual.....	8
1.5.2 Reproducción sexual.....	9
1.6 Sustancias Liquénicas.....	10
1.7 Líquenes como bioindicadores.....	12
Capítulo 2	14
Generalidades del proyecto.....	14
2.1 Justificación.....	15
2.2 Objetivos	15
2.2.1 Objetivo general	15
2.2.2 Objetivos específicos	15
2.3 Hipótesis	15
Capítulo 3	16
Materiales y métodos	16
3.1 Material de Campo	17
3.2 Colecta.....	17
3.3 Conservación	18
3.4 Identificación	18

3.5 Microcristalización	19
3.6 Cromatografía en capa fina.....	20
Capítulo 4	21
Resultados y discusión.....	21
4.1 Resultados de coloración	22
4.1.1 colecta en jales Mineros.....	22
4.1.2 Colecta de líquenes en Alto de Negrete.....	23
4.2 Identificación de sustancias líquénicas por microcristalización	24
4.3 Resultados de la cromatografía en capa fina	27
Conclusión	30
Perspectivas	31
Referencias	32

Índice de tablas

Tabla 3.1. Reactivos químicos utilizados para realizar la microcristalización y sus siglas internacionales y la concentración recomendada.	19
Tabla 4.1 Muestras de líquenes colectadas y analizadas en este trabajo, se muestran únicamente aquellas provenientes de la mina San Ramón y San Cayetano.	22
Tabla 4.2 Muestras de líquenes colectadas y analizadas en este trabajo, se muestran únicamente aquellas provenientes de Alto de Negrete.	23
Tabla 4.3 Sustancias Liquénicas identificadas por microcristalización.	25-26
Tabla 4.4 cromatografía en capa fina para Muestras de líquenes colectadas y analizadas en este trabajo.	27- 29

Índice de figuras

Figura 1.1 Liquen crustáceo de la especie <i>Lecanora</i>	6
Figura 1.2 Liquen foliáceo de la especie <i>Xanthoria</i>	7
Figura 1.3 Liquen fruticuloso de la especie <i>Cetraria</i>	7
Figura 1.4 Diferentes tipos de <i>Soredios</i>	9
Figura 1.5 Diferentes tipos de <i>Isidios</i>	9
Figura 1.6 <i>Apotecios</i> lecanoricos con borde propio y <i>apotecios</i> lecideinos sin borde propio.	10
Figura 1.7 clasificación de los compuestos liquénicos.....	12
Figura 4.1. Estructuras de algunas sustancias liquénicas identificadas mediante Microcristalización.	26
Figura 4.2 Se muestra la Presencia de los distintos compuestos liquénicos en placas de sílice gel.	29

Introducción

Los líquenes son organismos capaces de adaptarse a cualquier clima y habitar casi todos los hábitats terrestres, por cual son organismos de suma importancia en diferentes áreas de investigación, como es la biotecnología ya que presentan un gran potencial biotecnológico debido a que sintetizan de diversos metabolitos secundarios con gran actividad biológica.

También pueden ser utilizados como bioindicadores de contaminación ya que los nutrientes que necesitan los obtienen directamente de la atmosfera, lo que nos permite deducir si existe algún daño en su entorno esto se puede manifestar mediante su presencia o ausencia o al sufrir algunas malformaciones, ya que cada especie líquénica tiene la capacidad de tolerar cierta concentración de un contaminante, por lo cual al exceder esta concentración el liquen puede desaparecer y solo se hallaran los líquenes capaces de tolerar la contaminación del sitio en cuestión.

En el capítulo 1. Se detallan algunas características generales de los líquenes como son su forma de crecimiento, los tipos de reproducción y su uso como bioindicadores. En el capítulo 2. Se menciona el objetivo y la finalidad del proyecto. En el capítulo 3. Se describe la metodología utilizada para colecta y conservación de muestras, así como los métodos y pruebas químicas para lograr su identificación. En el capítulo 4. Se detallan los resultados y las conclusiones obtenidos del este proyecto.

Capítulo I

Marco teórico

1.1 Minería en México

La minería en México tiene antecedentes de la época prehispánica ya que se realizaban actividades mineras y metalúrgicas en lo que hoy es Taxco, Guerrero, en las Sierras de Querétaro, Oaxaca y Chiapas. Durante el Siglo XVI, esta actividad tuvo un gran desarrollo originando la creación de ciudades como Chihuahua, Durango, Guanajuato, Saltillo, San Luis Potosí y Zacatecas (INE, 2007).

En la actualidad, la actividad minera sigue teniendo una contribución importante en la economía nacional, una notable contribución a la producción mundial y es una fuente generadora de empleos para cerca de un millón de trabajadores, logrando esto a pesar de la caída de los precios de los metales a nivel internacional (INE, 2007).

La industria minera tiene un alto impacto ambiental ya que durante sus procesos se genera una gran cantidad de desechos como son gases, humos, partículas, aguas residuales, jales y escorias. Algunas de las afectaciones al ambiente por las actividades son: destrucción de la capa de suelo, flora y fauna durante el descapote; oxidación de minerales insolubles y formación de sustancias solubles ácidas con alto contenido de metales; alto consumo de agua; descarga de lixiviados con presencia de iones metálicos y reactivos tóxicos; generación de jales (Sepúlveda, 2003).

1.1.1 Minería en Guanajuato

El Estado de Guanajuato tiene una historia minera muy importante, ya que se encuentra localizado en una región rica en minerales y a pesar de los beneficios económicos que se obtienen esta actividad genera grandes impactos ambientales debido a los desechos que genera como son los jales mineros. (Mendoza Benítez, de la Rosa Álvarez, Cruz Jiménez, 2008).

En casos extremos la actividad minera puede destruir un ecosistema al deteriorar las tierras para cultivo, se genera la pérdida de la vegetación y erosión del suelo

además de contaminar cuerpos de agua con sales solubles de elementos potencialmente tóxicos (EPT), como lo es el As, Se, Pb, Cd y algunos óxidos de S (INE, 2005).

1.2.1 Jales Mineros

Los residuos mineros son conocidos como *colas*, relaves o jales, los cuales se generan durante los procesos de recuperación de metales a partir de minerales metalíferos después de moler las rocas que los contienen y mezclar las partículas que se forman con agua y pequeñas cantidades de reactivos químicos que facilitan la extracción de los metales de interés.

En otras palabras los jales mineros son apilamientos de las rocas que fueron molidas después de la extracción de los minerales de interés como el oro, cobre, plata, plomo, entre otros minerales (INE, 2007).

Los jales que se generan en el proceso de concentración de minerales de plomo, plata, zinc y cobre, generalmente contienen sulfuros metálicos residuales como la pirita (FeS_2), pirrotita (Fe_{1-x}S), galena (PbS), esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS_2) y arsenopirita (FeAsS) que son la origen de elementos potencialmente tóxicos como arsénico (As), cadmio (Cd), plomo (Pb), cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe), entre otros (Romero *et al.*, 2007).

1.3 Líquenes

Los líquenes en realidad no son organismos individuales como lo parecen, sino que es una asociación simbiótica entre hongos y algas (o cianobacterias). El hongo, conocido como micobionte crea una estructura resistente y estable que sirve de fijación para las algas, permitiéndoles realizar la fotosíntesis y protegerlas de los rayos UV. El alga denominada ficobiontes capaz de realizar fotosíntesis produciendo hidratos de carbono a partir de CO_2 y agua. El hongo es heterótrofo por lo que necesita compuestos orgánicos elaborados para su nutrición por lo cual aprovecha los nutrientes que produce el alga mediante la fotosíntesis, de esta

forma ambos organismos obtienen un beneficio mutuo por vivir en asociación (Cubas, Núñez, Crespo y Divakar, 2010).

Los hongos capaces de asociarse con algas para formar líquenes son principalmente del grupo de los ascomicetos (y unos pocos basidiomicetos), mientras que las algas pueden ser algas verdes (chlorophyceae) o algas verde-azules (Cyanobacteriae) (Nash III, 2008 en Darré Castell, 2011).

Los líquenes viven en casi todos los hábitats terrestres y crecen sobre diferentes sustratos naturales o antropogénicos. En los que los hongos y las algas no conseguirían sobrevivir por separado. Los más comunes crecen sobre los árboles y otras plantas los cuales se denominan (líquenes epífitos), o sobre las rocas (líquenes saxícolas). Otros son capaces de crecer sobre el suelo desnudo (líquenes terrícolas), y algunos pocos son capaces de vivir dentro de las rocas denominados líquenes endolíticos (Cubas et., al 2010).

Los líquenes no dañan o descomponen a los árboles. Crecen de 1 a 10 mm por año, su crecimiento depende principalmente de los nutrientes depositados desde la atmósfera, y en menor medida de los que se derivan del sustrato, tales nutrientes son captados por la superficie del talo por diferentes procesos como adsorción, absorción, transporte activo y pasivo. Pueden sobrevivir en condiciones severas y vivir hasta 1,000 años, son oportunistas: se encuentran activos mientras haya humedad, pero se encuentran en estado latente durante los períodos cálidos y secos (Darré, 2011).

1.4 Formas de crecimiento (Biotipos)

Normalmente los tejidos del hongo rodean al alga (o cianobacteria) fotosintética y esta relación entre ambos es la que determina el tipo de desarrollo: en forma de costra (crustosos), en forma de hoja (foliáceos), o en forma diminutos arbustos (fruticulosos) (Cubas et., al 2010).

Crustosos:

Se presentan en forma de costras irregulares adheridas fuertemente al sustrato, carecen de córtex inferior y no son fáciles de separar del sustrato, ya que están sujetos por medio de la médula o de un hipótalo al sustrato.



Figura 1.1 Liquen crustáceo de la especie *Lecanora* (Aragón, 2010).

Foliáceos:

Se presentan en forma de hoja, con estructura más compleja, córtex inferior diferente para cada género, parcialmente unidos al sustrato por lo que son fáciles de separar de él sin dañarlos, se fijan al sustrato por medio de hifas alargadas (rizinas), con las cuales absorben agua y sales minerales.



Figura 1.2 Liquen foliáceo de la especie *Xanthoria* (Aragón, 2010).

Fruticulosos:

Se presentan en forma de diminutos arbustos ramificados, sobresalen del sustrato y pueden ser erectos o colgantes, su tamaño es variado: desde pequeños arbustos, hasta los que tienen varios centímetros de largo. Se fijan al sustrato mediante una pequeña superficie. Dependen de la humedad relativa del aire para su hidratación (aereohigrófilos), por lo cual los podemos encontrar en lugares donde las nieblas son muy frecuentes (Barreno Rodríguez, Pérez Ortega, 2003).



Figura 1.3 Liquen fruticuloso de la especie *Cetraria* (Aragón, 2010)

1.5 Reproducción de los líquenes

Los líquenes al ser una simbiosis de dos reinos diferentes la forma de reproducirse tiene características particulares: el hongo se reproduce de forma asexual por medio de esporas o fragmentación del talo y el alga se reproduce por fisión binaria o gemación.

Los líquenes como hongos que son producen los procesos de reproducción sexual y asexual propia de estos organismos. Dentro de la asociación simbiótica entre estos organismos el hongo (o micobionte) es el único que lleva a cabo la reproducción sexual y de manera restringida el alga (o fotobionte) realiza la reproducción asexual. El problema que tiene la reproducción del liquen se debe a la necesidad del hongo de encontrar en el medio las células del fotobionte adecuado para realizar la simbiosis (Barreno et al., 2003).

1.5.1 Reproducción asexual

La propagación de los líquenes mediante esta forma de reproducción se da mediante la formación de unas estructuras llamadas soledios e isidios, ambas estructuras son fáciles de diferenciarse. Los soledios no presentan córtex, se observan como una masa pulverulenta que sale del interior del talo por determinadas áreas llamados sororios y los isidios presentan córtex y en muchas ocasiones están pigmentados.

Las cuales contienen las células algales englobadas en masas de hifas, desprendiéndose del talo y así formando nuevos líquenes (Cubas et., al 2010).



Figura 1.4 Diferentes tipos de *Soredios* (Cubas et., al 2010).



Figura 1.5 Diferentes tipos de *Isidios* (Cubas et., al 2010).

1.5.2 Reproducción sexual

La capacidad de reproducirse sexualmente la tiene el hongo, formando esporas las cuales tienen que germinar, encontrar las células del alga adecuada y asociarse a ellas para formar un nuevo liquen. Las estructuras reproductoras denominadas ascomas son las más comunes y fácilmente observables de los hongos ascomicetes denominados apotecios, y tienen la forma de un pequeño disco plano se encuentran el córtex superior. Dentro del apotecio se encuentran las esporas dentro de unas células denominadas ascas que son las que constituyen la capa fértil denominada himenio.

La observación detallada de los ascomas y en especial las esporas contenidas en el interior de las ascas sirve para la identificación precisa de un líquen. Existen dos tipos comunes de apotecios los denominados lecanóricos, que presentan un borde semejante al resto del talo y los denominados lecideinos que no cuentan con borde (Cubas et., al 2010).



Figura 1.6 Apotecios lecanóricos con borde propio y apotecios lecideinos sin borde propio (Cubas et., al 2010).

1.6 Sustancias Liquénicas

Las sustancias líquénicas son sintetizadas solamente por los líquenes y corresponden a compuestos bien determinados. Los distintos colores que presentan los líquenes se deben a la acumulación de metabolitos secundarios, llamados sustancias líquénicas que son compuestos químicamente complejos. La mayoría de estos metabolitos secundarios son diferentes a los que producen las plantas. Se conocen más de 800 metabolitos secundarios sintetizados por líquenes, de los cuales varios tienen propiedades antibióticas y son efectivos contra el ataque de microorganismos, como bacterias Gram positivas y diversos hongos (Illana, 2012).

Estas sustancias tienen gran importancia en la taxonomía actual de los líquenes, ya que la mayoría de ellos las sintetizan debido a la simbiosis entre el hongo y el alga. Algunas de las sustancias liquénicas más comunes son:

En el Córtex: atranoria, parietina, los ácidos úsnicos, vulpínico y rizocarpico, algunas liquenxantonas. Médula: Ácido lecanórico, estictico, girofórico, norestictico, fumarprotocetrárico, protocetrárico, psorómico, entre otros ácidos (Barreno et al., 2003).

Se desconocen las funciones verdaderas de estas sustancias, se supone que tienen un papel importante en la defensa del talo contra las infecciones de microorganismos, la alteración del sustrato o protección contra las radiaciones u oxidaciones, un que ciertas sustancias proporcionan colores específicos como en el caso del ácido úsnico da una coloración verde amarillenta para los géneros *Usnea* spp y *Xanthoparmelias* pp. La parietina desde amarillo anaranjado o rojo ferruginoso para los géneros *Caloplaca* y *Xanthoria*.

Otros compuestos se conocen por sus propiedades como la hidrofobia del ácido fumarprotocetrárico que lo producen las especies que habitan en ambientes húmedos o expuestos a contaminación ácida, o la hidrofilia del ácido norestico, que es común en los líquenes de climas xéricos (Barreno et al., 2003). Los compuestos liquénicos se clasifican de acuerdo a su estructura. Dépsidos, Depsidonas, Depsonas, Ácidos úsnicos, Dibenzofuranos.

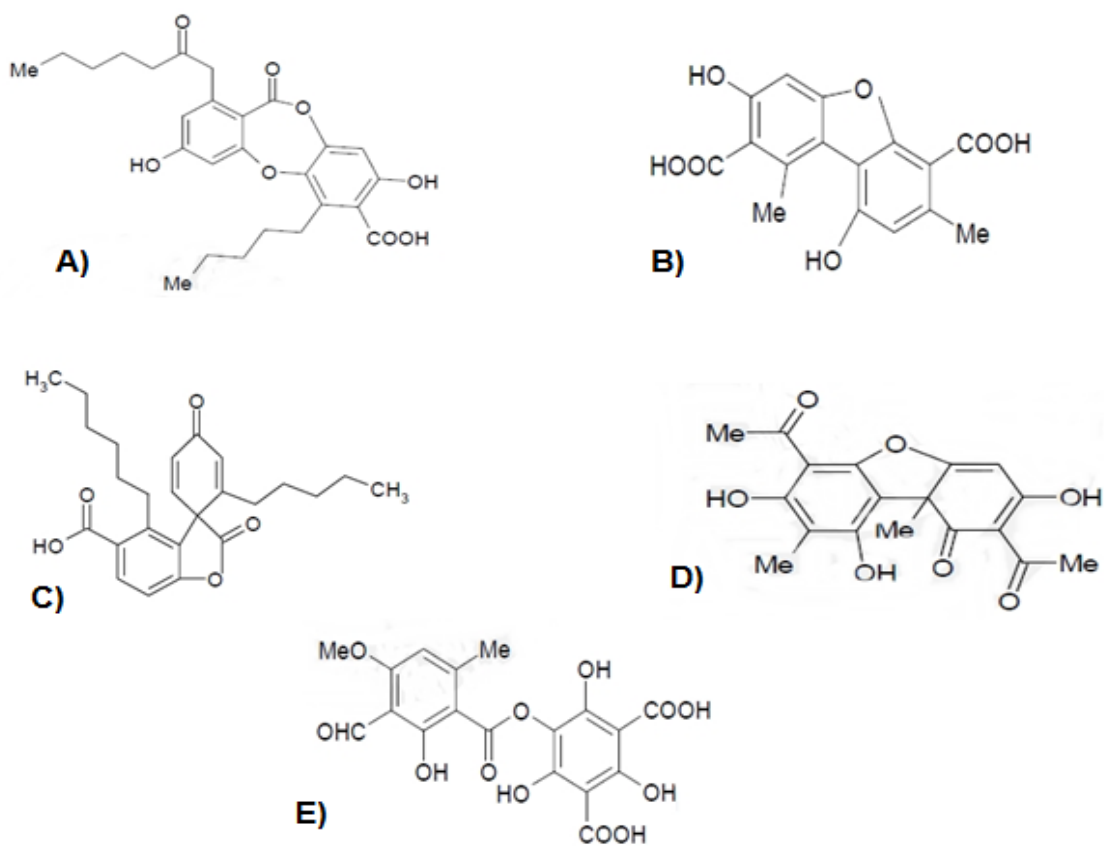


Figura 1.7 clasificación de los compuestos líquénicos **A)** Estructura de un Dépsido (Ácido thamnólico), **B)** Estructura de una Depsidona (Ácido Fisódico), **C)** Estructura de un Dibenzofurano (Ácido panárico), **D)** Estructura de una Depsona (Ácido Picrolíquénico), **E)** Estructura de un (+) - (R) - Ácido Úsnico (Castro, 2004).

1.7 Líquenes como bioindicadores

Un bioindicador se refiere a organismos sensibles que puede manifestar algún síntoma particular a los cambios ambientales, de manera cuantitativa. Al presentarse una alteración en su entorno, presenta cambios específicos en sus funciones vitales o su composición química o genética, y pueden almacenar el agente causante de la alteración (Hawksworth et al., 2005).

Un organismo se considera como bioindicador cuando permite deducir alguna característica del medio donde está presente, Se conocen numerosos organismos que pueden ser utilizados como bioindicadores; se incluyen especies de plantas vasculares, algas, líquenes, hongos, animales invertebrados y vertebrados. La manera en que se manifiesta un bioindicador puede ser forma simple mediante su presencia o ausencia en el entorno, o al sufrir malformaciones. Los bioindicadores nos permiten evaluar la calidad del suelo, del aire y del agua de forma fiable y económica (Lijteroff, Lima y Prieri, 2009).

En muchos países se han realizado estudios utilizando a los líquenes como bioindicadores principalmente para monitorear la calidad del medio ambiente, ya que los líquenes carecen de raíces obtienen sus nutrientes directamente del medio atmosférico y al hacer esto están expuestos a elevadas concentraciones de diversos contaminantes atmosféricos emitidos principalmente por las actividades del ser humano, por lo cual son muy utilizados para detectar perturbaciones en diferentes ambientes, ocasionadas por diferentes situaciones como puede ser contaminación y calidad del aire, entre otras cuestiones que pueden afectar un ecosistema. Los líquenes son sensibles a los efectos de algunos contaminantes, cada especie tiene la capacidad de tolerar cierta concentración de un contaminante y al exceder esta concentración la especie puede desaparecer, cuando un ecosistema este contaminado solo se hallarán líquenes capaces de tolerar esta contaminación.

Dentro de los contaminantes a los cuales los líquenes son susceptibles se encuentran los óxidos de azufre (SO_x), los óxidos de nitrógeno (NO_x), el monóxido y el dióxido de carbono (CO , CO_2), también algunos metales pesados, entre otros compuestos químicos (Anguita, 2003; Castell, 2011; Cubas et al., 2010; Hugo et al., 2011).

Capítulo 2

Generalidades del proyecto

2.1 Justificación

La contaminación que se genera debido a las actividades humanas en materia de extracción de minerales, ha dejado como consecuencia muchos problemas ambientales entre ellos los desechos conocidos como jales mineros, por lo cual la presencia de organismos en estos sitios indica la recuperación que ha tenido el sitio y la tolerancia de organismos a los contaminantes presentes en estos lugares. Por lo cual es importante conocer indicadores de contaminación por metales pesados para que sirvan como herramienta ambiental para estudiar los problemas y mejoras que existan en los procesos de extracción de minerales para poder reducir este tipo de contaminación. Los líquenes son una gran opción para ser empleados como bioindicadores de contaminación por metales pesados por su capacidad de acumularlos.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Identificar las poblaciones de líquenes en jales mineros y en un área rural.

2.2.2 Objetivos específicos

1. Colectar líquenes en jales mineros de las minas San Ramón, San Cayetano y en la comunidad de Alto de Negrete.
2. Identificar las poblaciones de líquenes colectados mediante el uso de guías y pruebas químicas.
3. Comparar y determinar la relación que existe entre las poblaciones de líquenes encontrados en jales mineros y la comunidad de Alto de Negrete.

2.3 Hipótesis

Los organismos que crecen cercanos a minas presentaran estrategias para tolerar el efecto contaminante de los minerales que han sido extraídos. Los líquenes que se encuentren más cercanos a la mina presentarán mayor tolerancia hacia los metales y por ello indicarán la presencia de contaminación.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1 Material de Campo

Un cuaderno donde se anotó el número de recolección de cada muestra, los datos necesarios respecto al sitio de la colecta, como: tipo de sustrato, fecha, y coordenadas GPS. Para la colecta se utilizaron sobres de papel en los cuales se guardaron cada muestra por separado, y se les anotaron el número de recolección que les correspondía. Se utilizó navaja para desprender cuidadosamente el material del sustrato. En algunos casos se utilizó cincel y martillo para separar pequeños trozos de roca donde se encontraba el espécimen adherido. En otras situaciones, se utilizó una lupa para determinar si el ejemplar presenta las estructuras maduras necesarias para su determinación taxonómica. Se utilizó una aplicación de GPS para la geolocalización del lugar donde se tomó cada una de las muestras (Cruz, Herrera, Lucas, Nolasco, y Uribe, 2000).

3.2 Colecta

La colecta se realizó en un Jale Minero, en las Minas San Ramón, San Cayetano y en la comunidad de Alto de Negrete, con base a la cantidad de líquenes que se observaron, se tomó una muestra representativa de los organismos a los cuales posteriormente se les realizaron algunas pruebas químicas en el laboratorio para su identificación.

Antes de realizar la toma de muestra, se observó el espécimen en el contexto natural, y se estimó la población líquénica para evitar su extinción en la zona. Se determinó la cantidad adecuada de la muestra para su estudio, la cual sería utilizada para realizar la identificación taxonómica y luego sería desechada.

Se fotografió el ejemplar al momento de tomar la muestra o removerlo del sustrato se realizó sin causarle daño al líquen, en algunos casos fue necesario trasladar una pequeña parte del sustrato. Las colectas se llevaron a cabo tomando las coordenadas geográficas con ayuda de una aplicación para móvil (Cruz et al., 2000).

3.3 Conservación

Las muestras se conservaron en sobres de papel identificados con el numero de muestra correspondiente, la fecha del día en que se realizo la colecta, las coordenadas GPS en el punto donde se tomo la muestra, posteriormente los sobres fueron guardados en una caja de plástico (Cruz et al., 2000).

3.4 Identificación

Muchas sustancias líquénicas pueden ser detectadas macroscópicamente debido a los colores que adquieren al mezclarse con diferente sustancias químicas o a la fluorescencia que generan al contacto con radiaciones ultravioleta.

Para la identificación de las muestras líquénicas colectadas, se utilizaron claves taxonómicas, y se realizaron pruebas químicas. Las pruebas químicas en los líquenes, son un medio práctico y útil para identificar especies líquénicas. Los líquenes producen sustancias químicas únicas, la mayoría son fenoles débiles o ácidos grasos, que son depositados en la superficie de las hifas.

Las pruebas químicas de coloración con reactivos se han usado en la liquenología desde el siglo pasado, se pueden realizar adicionando unas gotas del reactivo de forma directa con una micropipeta en el talo, en los apotecios, los soralios, entre otras partes del liquen.

Los reactivos que se suelen utilizar y que siempre aparecen referidos por siglas, son:

- **K** (solución 10% de hidróxido de potasio en agua), produce reacciones de color amarillo, hasta rojo o pardo. El ácido norstíctico se identifica con K porque forma cristales microscópicos rojos, la parietina se detecta por la coloración rojo violeta que adquiere.

- **C** (hipoclorito de sodio), produce una coloración rosa, roja, naranja o verde, la reacción que se genera es rápida por lo que se debe observar cuidadosamente, Se utiliza para detectar, ácido lecanórico y girofórico al observar un color rojo sangre.
- **KC o CK.** Esta prueba se utiliza para identificar ácido alectórico o ácido fisódico, agregando primero un reactivo y en seguida el otro reactivo.
- **I** (solución iodada, 1.5% de I en 10% de IK= Lugol), produce una coloración azulada, verdosa o rojiza y se utiliza para diferenciar las estructuras del asco (paredes, tholus, capa periascal) o de la gelatina del himenio.

3.5 Microcristalización

La microcristalización es un método que se basa en la capacidad de las sustancias líquénicas para reaccionar con ciertas sustancias químicas, originando formas cristalinas características, que se pueden observar fácilmente con ayuda de un microscopio (Robles C., 1992).

Tabla 3.1. Reactivos químicos utilizados para realizar la microcristalización y sus siglas internacionales y la concentración recomendada.

Siglas	Sustancias Químicas	Concentración
GE	Glicerina: Ácido Acético	(1:3 v/v)
GAW	Glicerina: Etanol: Agua	(1:1:1 v/v)

La prueba de microcristalización se basa en la extracción de las sustancias y su posterior microcristalización mediante la utilización de un solvente (acetona), que posteriormente se evapora y se analiza la forma de los cristales.

Se selecciona una muestra, con la ayuda del bisturí se le hacen pequeños cortes y los cuales se colocan en un portaobjetos, y se les agregó una gota de acetona se debe esperar un momento hasta secarse la gota de cetona, este paso se realizó tres veces; posteriormente se retira la muestra del portaobjetos con la ayuda de unas pinzas, se le agrega una gota de glicerina: ácido acético (1:3), y se cubre con el cubreobjetos y se pasa por el fuego de una lámpara de alcohol o de un mechero y se retira hasta observar unas pequeñas burbujas, se deja enfriar y se observan los cristales formados en el microscopio óptico y en el caso de no obtener resultados, se realizó en mismo procedimiento pero ahora con la solución glicerina:alcohol:agua (1:1:1) (Barreno et al.,2003).

3.6 Cromatografía en capa fina

La cromatografía es la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre una fase estacionaria y otra fase móvil. Hay varios tipos de cromatografía, las cuales dependen de las fases involucradas: sólido-liquido (capa fina), líquido-líquido y gases-líquido.

En la cromatografía en capa fina se utiliza una placa recubierta con fase estacionaria manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa, por la cual el eluyente ascenderá por capilaridad y arrastrara los componentes a lo largo de la placa formando manchas de los componentes.

Cada una de las 34 muestras fue depositada en tubos eppendorf a los cuales se les agrego 100 µl de acetona, y se dejo reposar 24 hrs para extraer las sustancias líquénicas, de la solución resultante que es una mezcla de acetona con diferentes sustancias líquénicas, se utilizan 10 µl de cada muestra que son depositados en una placa de gel de sílice, se deja secar y se introduce la placa en un vaso de precipitado que contiene una solución de tolueno y ácido acético (7:3), se tapa el vaso y se deja que los eluyentes hagan y arrastren los compuestos, hasta un límite definido, se saca la placa y se deja secar, posteriormente se introduce en un vaso de precipitado que contiene vapores de yodo que se utiliza como revelador de los compuestos líquénicos.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1 Resultados de coloración

4.1.1 colecta en jales Mineros

La colecta se realizó en las minas San Ramón y San Cayetano, donde se colectaron 24 muestras etiquetadas como ORM#, para su correcta identificación y ubicación de muestra. En la tabla 4.1 se muestran los líquenes colectados, laquimiotipificación y el probable género identificado.

Tabla 4.1 Muestras de líquenes colectadas y analizadas en este trabajo, se muestran únicamente aquellas provenientes de la mina San Ramón y San Cayetano

Muestra	C	K	CK	KC	Lugol	HNO ₃	Género
ORM 1						Blanco	<i>Punctelia</i>
ORM 2		X	X		X	Blanco	<i>Punctelia</i>
ORM 3			X	X		Blanco	<i>Lecanora</i>
ORM 4			X		X	X	<i>Lecanora</i>
ORM 5	X	X	X	X	X	X	X
ORM 6	X	X	X	X	X	X	X
ORM 7	X	X				Blanco	<i>Lecanora</i>
ORM 8	X		X	X		X	<i>Lecanora</i>
ORM 9			X	X	X	X	<i>Hypotrachyna</i>
ORM 10			X	X	X	Blanco	<i>Phycia</i>
ORM 11		X	X	X		Blanco	<i>Permella sulcata</i>
ORM 12	X	X	X	X	X	X	X
ORM 13					X	X	<i>Caloplaca</i>
ORM 14			X	X	x	x	<i>Candelariella</i>
ORM 15			X		x	Blanco	<i>Punctelia</i>
ORM 16	x	x	X	x	x	x	X
ORM 17		x	X		x	x	<i>Flavoparmelia</i>
ORM 18			X	x		x	<i>Phycia</i>
ORM 19			X			Blanco	<i>Phycia</i>
ORM 20			X	x		Blanco	<i>Phycia</i>
ORM 21	x	x	x	x	x	x	X
ORM 22			X	x	x	Blanco	<i>Phycia</i>
ORM 23	x		X	x	x		<i>Candelariella</i>
ORM 24	x		X		x	Blanco	<i>Phycia</i>

Mediante la realización de pruebas químicas de Hipoclorito de sodio (C), Hidróxido de potasio 10% (K), Hipoclorito de sodio + Hidróxido de potasio 10% (CK), Hidróxido de potasio 10% + Hipoclorito de sodio (KC), Lugol, ácido nítrico (HNO₃) y el uso de las guías taxonómicas fue posible la identificación de los géneros de líquenes colectados en las Minas San Ramón y San Cayetano. Se puede observar que existe una mayor reacción de coloración con la prueba C, K, KC, mientras que con la prueba CK solo se observan tres reacciones de coloración. Estas pruebas de coloración nos permiten la identificación de algunas sustancias líquénicas ya que al combinarse con algunos compuestos químicos producen una reacción de coloración de algún color específico la cual permite la posible identificación de un compuesto líquénico.

4.1.2 Colecta de líquenes en Alto de Negrete

La colecta se realizó en la comunidad Alto de Negrete, donde se colectaron 10 muestras etiquetadas como ORM #, para su correcta identificación y ubicación de muestra. En la tabla 4.2 se muestran los líquenes colectados, la identificación y el probable género identificado.

Tabla 4.2 Muestras de líquenes colectadas y analizadas en este trabajo, se muestran únicamente aquellas provenientes de Alto de Negrete.

Muestra	C	K	CK	KC	Lugol	HNO ₃	Género
ORM 25			x			Blanco	<i>Physcia</i>
ORM 26			x	x		x	<i>Candelariella</i>
ORM 27			x	x		Blanco	<i>Physcia</i>
ORM 28	x	x	x	x	x	x	X
ORM 29			x	x	x	Blanco	<i>Scoliciosporum</i>
ORM 30			x	x	x	Blanco	<i>Parmelia</i>
ORM 31			x	x		Blanco	<i>Physcia</i>
ORM 32			x	x	x	x	<i>Caloplaca</i>
ORM 33			x	x		Blanco	<i>Physcia</i>
ORM 34			x	x		Blanco	<i>Physcia</i>

De la misma manera que a las muestras colectadas en las minas, a las muestras colectadas en la comunidad Alto de Negrete se les realizaron las mismas pruebas químicas con los mismos compuestos químicos C, K, CK, KC, Lugol, HNO_3 , y también con ayuda de las guías taxonómicas para determinar su posible género, se puede observar que hay una menor cantidad de reacciones de coloración en comparación de las muestras colectadas en las minas, pero coincide en una mayor reacción en las pruebas C y K, se puede observar que para prueba K solo hubo una reacción en la muestra ORM#25, que corresponde al género *Physcia* y para la prueba CK no hubo ninguna reacción para ninguna de las muestras. Se puede observar en ambas tablas que hay algunas muestras no identificadas esto se debe a que quizás no era un líquen. También se observa que las reacciones de coloración no son las mismas aunque se trate del mismo género identificado, esto se puede deber a que dentro de estos géneros identificados existen especies diferentes dentro de un mismo género, o quizás a existe un error de identificación del género mediante su taxonomía o incluso un error en realización las pruebas químicas de coloración.

4.2 Identificación de sustancias líquénicas por microcristalización

El objetivo principal de este método aplicado en líquenes es identificar los metabolitos secundarios que producen los líquenes mediante su cristalización y posterior identificación con ayuda de un microscopio y guías establecidas internacionalmente, el procedimiento de la microcristalización se describe en el capítulo 3. En la tabla 4.3 se muestran los líquenes colectados, así como los géneros identificados y las sustancias líquénicas identificadas mediante el método de microcristalización.

Tabla 4.3 Sustancias Liguénicas identificadas por microcristalización

Muestra	Género	Sustancia Liguénica
ORM 1	<i>Punctelia</i>	Ácido úsnico y salacinico
ORM 2	<i>Punctelia</i>	Ácido lecanorico
ORM 3	<i>Lecanora</i>	Ácido úsnico, salacinico, y alectorinico
ORM 4	<i>Lecanora</i>	Ácido úsnico, salacinico, y alectorinico
ORM 5	x	x
ORM 6	x	x
ORM 7	<i>Lecanora</i>	Ácido úsnico, salacinico, y alectorinico
ORM 8	<i>Lecanora</i>	Ácido úsnico, salacinico, y alectorinico
ORM 9	<i>Hypotrachyna</i>	-----
ORM 10	<i>Physcia</i>	Ácido gyrofarico
ORM 11	<i>Permelia sulcata</i>	Ácido gyrofarico, grayanico
ORM 12	x	x
ORM 13	<i>Caloplaca</i>	-----
ORM 14	<i>Candelariella</i>	Ácido grayanico
ORM 15	<i>Punctelia</i>	Ácido lecanorico
ORM 16	x	x
ORM 17	<i>Flavoparmelia</i>	Ácido protocetrarico, lecanorico
ORM 18	<i>Physcia</i>	Ácido salacinico
ORM 19	<i>Physcia</i>	Ácido salacinico
ORM 20	<i>Physcia</i>	Ácido salacinico
ORM 21	x	x
ORM 22	<i>Physcia</i>	-----
ORM 23	<i>Candelariella</i>	Ácidonorstictico, Úsnico
ORM 24	<i>Physcia</i>	----
ORM 25	<i>Physcia</i>	Ácido úsnico, salacinico
ORM 26	<i>Candelariella</i>	Ácidograyanico, ácidoalectorinico
ORM 27	<i>Physcia</i>	Ácidosalacinico, ácidoalectorinico

ORM 28	x	x
ORM 29	<i>scoliciosporum</i>	----
ORM 30	<i>Punctelia</i>	Ácidoprotocetrarico
ORM 31	<i>Physcia</i>	Ácido salacinico, á.úsxico
ORM 32	<i>Caloplaca</i>	Ácidograyanico
ORM 33	<i>Physcia</i>	Ácido úsnico, á. salacinico
ORM 34	<i>Physcia</i>	Ácido úsnico, á. salacinico

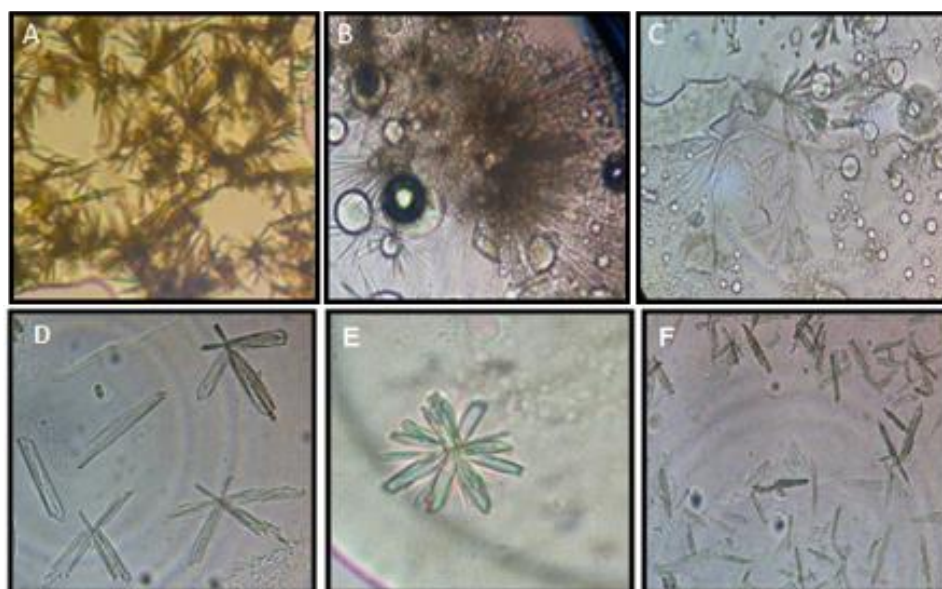


Figura 4.1. Estructuras de algunas sustancias líquénicas identificadas mediante Microcristalización. **A)** Ácido grayanico, **B)** Ácido lecanorico, **C)** Ácido protocetrarico, **D)** Ácido úsnico **E)** Ácido alectorinico, **F)** Ácido salacinico.

Mediante la realización del método de microcristalización se logró identificar y corroborar algunos de los géneros de las muestras de líquenes colectadas en los sitios de interés, así como también nos permitió identificar una gran variedad de las sustancias líquénicas sintetizadas por los líquenes en estos sitios. Se lograron identificar 8 tipos diferentes de compuestos líquénicos los cuales fueron los siguientes ácidos (úsxico, salacinico, lecanorico alectorinico, girofarico, grayanico,

protocetrarico y norstictico), de los cuales el ácido úsnico y el ácido salacinico son los que se identificaron con más frecuencia y en comparación de los de más ácidos identificados, el ácido norstictico fue el menos frecuente el cual solo fue identificado solo una vez en el género candelariella. A pesar de que hay una gran coincidencia en los géneros identificados, no siempre se identificaron los mismos compuestos para el mismo género, esto pudiera ser debido a la ubicación o quizás exista alguna alteración en el lugar donde la muestra líquénica fue colectada.

4.3 Resultados de la cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina es un procedimiento que se utiliza para separar moléculas relativamente pequeñas. La cromatografía en capa fina es una técnica muy utilizada para la separación y detección de las sustancias líquénicas.

En la tabla 4.4 se observan las muestras y los distintos RF para cada una de las muestras colectadas en las minas San Ramón, San Cayetano y la comunidad Alto de Negrete.

Tabla 4.4 cromatografía en capa fina para Muestras de líquenes colectadas y analizadas en este trabajo.

Muestra	RF
ORM 1	0.2162
ORM 2	0.4050
	0.4864
	0.6757
	0.8918
ORM 3	0.4864
	0.6756
	0.8378
ORM 4	0.8378
ORM 5	x
ORM 6	x
ORM 7	0.4594
	0.7297
ORM 8	x
ORM 9	x
ORM 10	0.675
ORM 11	0.425
ORM 12	x

ORM 13	0.425
	0.85
ORM 14	0.7
	0.87
ORM 15	0.45
ORM 16	x
ORM 17	0.1714
ORM 18	x
ORM 19	0.1714
	0.2857
	0.3428
	0.4
	0.6571
ORM 20	0.2857
	0.4571
	0.6857
ORM 21	0.4285
	0.6857
ORM 22	x
ORM 23	x
ORM 24	0.1142
ORM 25	0.5675
	0.7027
ORM 26	0.5675
	0.8108
ORM 27	0.5405
	0.7027
ORM 28	0.5405
	0.7267
ORM 29	0.3783
	0.5405
ORM 30	0.3783
	0.5405
	0.7027
ORM 31	0.4615
	0.6153
ORM 32	0.333
	0.6410
ORM 33	0.5128
	0.666
ORM 34	0.5128
	0.666

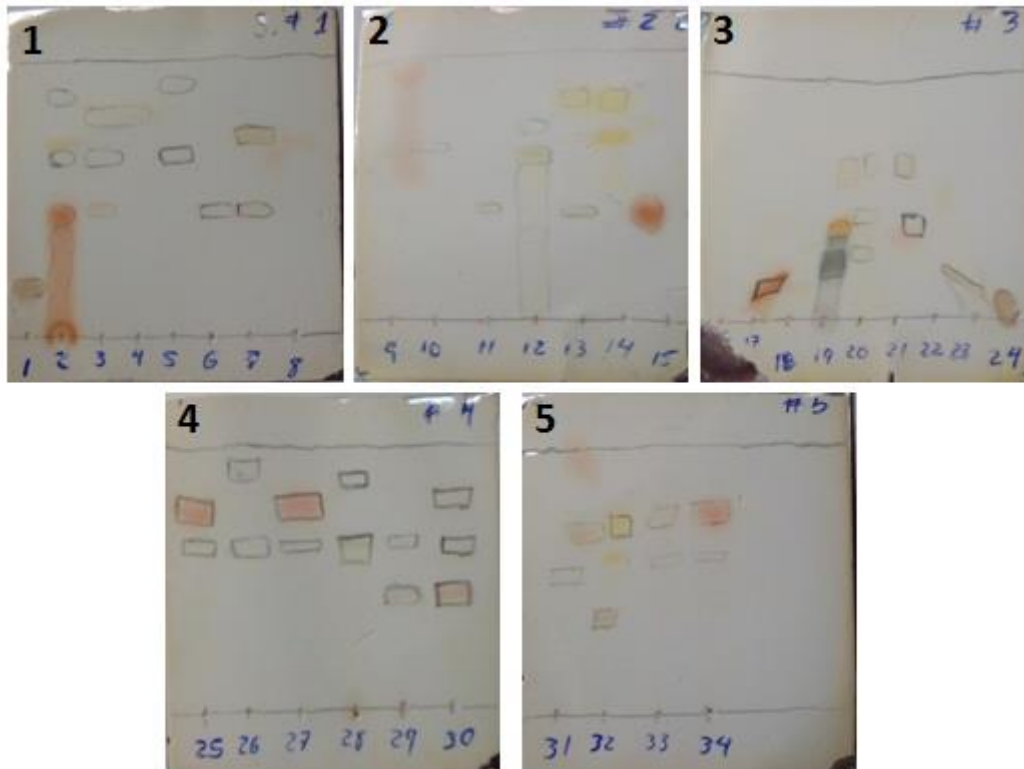


Figura 4.2 Se muestra la Presencia de los distintos compuestos líquénicos en placas de sílice gel. **1)**#1 *Punctelia*, #2 *Punctelia*, #3 *Lecanora*, #4 *Lecanora*, #5 N.I, #6 N.I, #7 *Lecanora*, #8 *Lecanora*, **2)**#9 *Hypotrachyna*, #10 *Physcia*, #11 *Permelia sulcata*, #12 N.I, #13 *Caloplaca*, #14 *Candelariella*, #15 *Punctelia*, **3)** #16 N.I, #17 *Flavoparmelia*, #18 *Physcia*, #19 *Physcia*, #20 *Physcia*, #21 x, #22 *Physcia*, #23 *Candelariella*, **4)**#25 *Physcia*, #26 *Candelariella*, #27 *Physcia*, #28 N.I, #29 *Scoliciosporum*, #30 *Punctelia*, **5)**#31 *Physcia*, #32 *Caloplaca*, #33 *Physcia*, #34 *Physcia*.

Conclusión

Identificamos la presencia y distribución de especies liquénicas en jales mineros (Minas San Ramón y San Cayetano en Guanajuato) y en la comunidad Alto de Negrete.

En los sitios donde se realizó la colecta solo se encontraron dos biotipos de líquenes, crustosos y foliáceos, haciéndose notable la ausencia del tipo fruticuloso.

No se encontraron líquenes fruticosos, ya que estos tipos de líquenes no son tolerantes a la contaminación.

En la comunidad Alto de Negrete no se encontraron una diversidad de líquenes, por ello en la comunidad se presenta un grado de contaminación debido a las actividades agrícolas.

Se demostró que los líquenes identificados producen diversas sustancias liquénicas, que probablemente tienen un papel importante, permitiéndoles tolerar y acumular diferentes contaminantes que se encuentran en su entorno.

Perspectivas

- Identificar molecularmente a los líquenes aislados.
- Determinar la estrategia de tolerancia a metales pesados.
- Correlacionar los compuestos químicos de los líquenes con respecto a la tolerancia.
- Determinar la presencia de metales pesados en un área natural protegida utilizando a *Lecanora* spp como indicador

Referencias

- Sepúlveda, D. T. (2003). Remediación De Sitios Contaminados Por Metales Pesados Provenientes De Jales Mineros. Distrito De El Triunfo San Antonio Y Santa Rosalía, Baja California Sur, México
- Alejandra Cruz D., J. M. (2000). Estudio De La Diversidad De Líquenes Saxícolas De La Peña De Perritos. Tlalnepantla, Estado de, México.
- Castell, E. D. (2011). Líquenes como Bioindicadores de Contaminación Atmosférica en Montevideo - Uruguay.
- Isabel Mendoza Benítez, M. G. (2008). Identificación De Especies Vegetales Relacionadas Con Jales Mineros Del Distrito Minero De Guanajuato. Morelia, Michoacán, México.
- Juana Robles C., P. M. (1992). Líquenes Y Sustancias Liguénicas. Revista De Química. Vol. Vi. , 73.
- Ortega, E. B. (2003). Las Sustancias Liguénicas Y Los Test Microquímicos En La Identificación. En E. B. Ortega, Líquenes De La Reserva Natural Integral De Muniellos, Asturias (Págs. 71, 72, y 77-79). Asturias.
- Margulis, L. (1993). Biología de los líquenes.
- Aragon G., Martinez I. yBurgaz A.R. 2002. Macrolíquenes de Castilla- La Mancha. Instituto de Estudios Manchegos. Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
- OPAL (2013). The OPAL guide to epiphytic lichens in orchards in the East of England. Fiel Studies Council, Shrewsbury.
- Illana, C. (2012). Líquenes Usados en Medicina Tradicional. Alcalá de Henares, Madrid, España.
- Cient, N. A., Naturais, R., & Ambiente, M. (2006). Determinación de la contaminación atmosférica en la ciudad de Pontevedra mediante bioindicadores liquénicos, (1926), 37–46.
- Rubén Lijteroff, L. L. (2009). Uso de Líquenes como Bioindicadores de Contaminación Atmosférica en la Ciudad de San Luis, Argentina. San luis, Argentina.

Barreno E. (1998). Los líquenes epífitos del castaño. Ecología de los árboles. Los líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica. pag 9-96. Ed. Mundi Prensa, Madrid.

Anze, R., Franken, M., Zaballa, M., Pinto, M., Zeballos, G., Cuadros, M. Á., Canseco, Á., De la Rocha, A., Es-tellano, V.H. y Del Granado, S. (2007). Bioindicado-res en la detección de la contaminación atmosférica en Bolivia. Revista Virtual REDESMA, 1, 54-74.

Cubas, P., Núñez, J., & Divakar, A. C. P. K. (2010). Líquenes: que son y su uso como bioindicadores, 1-9.

Nájera, V. H. (2011). El uso de líquenes como biomonitores para evaluar el estado de la contaminación atmosférica a nivel mundial. Bíocenosis, 51-67.

Lijteroff, R., Lima, L. &Prieri, B. (2009). Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en la ciudad de San Luis, Argentina. Rev. Int. Contaminación Ambiental, 25, 111-120.

E. Hale, M. (1969). How to know the Lichens pdf. (D., Iowa, Ed.). WM. C. BROWN COMPANY PUBLISHERS

Ferrer, E., & Pérez-Ortega, S. (2003). Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos. Dirección General de Recursos Naturales y Protección AMbiental del principado de Asturias (KRK.).

Orr, R. (2011). Guide to the Lichens of Howard County , MD List of lichens known from Howard County , Maryland.

Hawksworth, D.L., Iturriaga, T. y Crespo, A. 2005. Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medio-ambientales en los trópicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22: 71-82.

Ragón Rubio, G. (2010). Guía para Identificar Marcolíquenes Epífitos en el Centro de España.

V. Campos, L., Uribe M., J., & Aguirre C., J. (2008). Santa maría líquenes, hepáticas y musgos. Bogotá D. C., Colombia.