



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Registro protozoológico en cinco
biotopos de la cueva de los Riscos,
Querétaro, México”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

ITZEL SIGALA REGALADO

TUTORA:

DRA. ROSAURA MAYÉN ESTRADA

COTUTOR:

DR. JUAN B. MORALES MALACARA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARÍA GENERAL
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Registro protozoológico en cinco biotopos de la cueva de los Riscos, Querétaro, México

realizado por **Sigala Regalado Itzel**, con número de cuenta **3-0001018-1** quien opta por titularse en la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Paz María Salazar Schettino

Propietario Dra. María Antonieta Aladro Lubel

Propietario Dra. Rosaura Mayén Estrada
Tutor(a)

Suplente Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra

Suplente Dr. Juan Bibiano Morales Malacara
Co-Tutor

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 27 de marzo de 2008
EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



**UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA**

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

*cigs

A mis abuelas

A mi padre, mi madre y mi hermana

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: mi padre, mi madre y mi hermana quienes siempre me han apoyado, y a mis dos abuelas que han sido mis grandes pilares.

A Andrés, mi compañero, por estar a mi lado apoyándome y empujándome siempre hacia adelante, y en especial por su ayuda en la realización de todos los esquemas contenidos en este trabajo.

A todos mis tíos y tías que han estado siguiendo siempre mi desarrollo académico, en especial a la familia González por su apoyo técnico y en particular a Agus por su ayuda en la edición de los videos, de los cuales se tomaron algunas imágenes. Y también a mi padrino, Salvador, quien me impulsa siempre a seguir adelante y me dio apoyo para la impresión de este trabajo.

A Ricardo Paredes y Arturo García, por su apoyo como amigos y por todo lo que me han enseñado. Les agradezco también por su ayuda en la búsqueda de información.

A todas esas personitas, “las Chicas” que me han acompañado en todo este camino, a Claudia, Candy, Dai, Tania, Daniela, Ingrid, Sara, Maritza y a Hugo y Cristian, que también estuvieron ahí.

A todos mis compañeros y amigos del taller, Sara, Marisol, Miguel, Stephani, Mayra, Yunuen y Adriana, que me brindaron mucha experiencia en campo y trabajo en equipo, y también grandes horas de diversión.

A mis amigos, que estuvieron también a mi lado, a Hugo, Juanito, Fabián, Miguel, Enrique, Nico, Andrés Becerril, Damián y a todos aquéllos amigos que me faltan y por espacio no he podido incluir.

A la profesora María Teresa Hernández Gómez, por despertar en mí el interés y amor por los protozoos.

Agradezco el apoyo prestado por parte de mis profesores del Taller de Bioespeleología para las colectas, a Lauris, Rafa y a Nidi, y en especial al Dr. Juan Morales Malacara quien fue mi cotutor y también me brindó gran apoyo.

A la M. en C. Edith Ponce Márquez, responsable del Taller de Biología de Hongos, por permitirme utilizar y apoyarme en el manejo de la campana de bioseguridad.

Agradezco la ayuda de la M. en C. Yolanda Guevara del Laboratorio de Parásitos “Dr. Jorge Tay” de la Facultad de Medicina, UNAM, para la realización de las pruebas de tinción de frotis y cortes histológicos para el diagnóstico de los parásitos de murciélagos. Igualmente agradezco al Dr. Manuel Gutiérrez del Laboratorio de Inmunoparasitología de esta misma Facultad, por la realización de las pruebas de hemoaglutinación.

A la Dra. Patricia Rivas del Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias, UNAM, quien realizó los cortes histológicos de los corazones de algunos de los murciélagos colectados.

Al M. en C. José Luis Bortolini, responsable del Taller de Biología de Animales III, quien también me enseñó y ayudó con los cortes histológicos, y a la Biól. Ana Leticia Cuevas Escudero, quien me auxilió en la manipulación de las muestras.

En especial agradezco profundamente a la Dra. María Antonieta Aladro Lubel, por todo el apoyo prestado, a la Biól. Margarita Reyes Santos por compartirme su amplia experiencia para el cultivo y la elaboración de las técnicas micrográficas para protozoos de vida libre y por todos sus consejos y continuo apoyo y también a Ricardo Mariño, por sus consejos y compañía, todos del Laboratorio de Protozoología de la Facultad de Ciencias, UNAM.

A mi jurado, por su tiempo y sus consejos. A la Dra. María Antonieta Aladro, a la Dra. Paz María Salazar Schettino, al Biól. Mauro Omar Vences Blanco, y en especial a la Dra. Elvia Gallegos Neyra, quien además me ayudó con la identificación de todas las amibas.

Y mi más grande agradecimiento es para mi asesora, la Dra. Rosaura Mayén Estrada, del Laboratorio de Protozoología de la Facultad de Ciencias, UNAM, quien me ha apoyado e impulsado desde el inicio del proyecto y a quien debo mi crecimiento como futura bióloga.

C O N T E N I D O

I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	4
1. PROTOZOOS	4
1.1 Definición y caracterización de protozoos	4
1.2 Esquemas de clasificación	4
1.3 Ecología	6
2. CUEVAS	12
2.1 Colonización de una cueva	12
2.2 Biotopos en una cueva	12
2.2.1 Agua	12
2.2.2 Suelo	13
2.2.3 Guano	13
2.2.4 Murciélagos	13
2.2.5 Musgo	13
3. ANTECEDENTES	14
3.1 Antecedentes de registros de protozoos en cuevas en el mundo y en México	14
3.2. Área de estudio	16
3.2.1 Ubicación	16
3.2.2 Descripción general	17
3.2.3 Zonas	18
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. OBJETIVOS	22
GENERAL	22
PARTICULARES	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23

1. TRABAJO EN CAMPO	23
1.1 Protozoos de vida libre	25
1.2 Protozoos endoparásitos de murciélagos	25
2. TRABAJO EN LABORATORIO	26
2.1 Protozoos de vida libre	26
2.2 Protozoos endoparásitos de murciélagos	28
VI. RESULTADOS	29
1. PROTOZOOS DE VIDA LIBRE	29
1.1 Descripción, registro fotomicrográfico y esquema de las especies registradas	30
1.2 Posición taxonómica de las especies registradas	75
1.3 Comparación de la diversidad de protozoos entre los biotopos	79
2. PROTOZOOS ENDOPARÁSITOS DE MURCIÉLAGOS	83
VII. DISCUSIÓN	86
VIII. CONCLUSIONES	93
IX. BIBLIOGRAFÍA	95
X. ANEXOS	101
ANEXO 1. Protozoos de cuevas en el mundo	101
ANEXO 2. Protozoos de cuevas en México	102
ANEXO 3. Desarrollo de las técnicas utilizadas	105
3.1 Técnicas micrográficas para protozoos de vida libre	105
3.2 Técnicas micrográficas, histológicas e inmunológicas para protozoos endoparásitos de murciélagos	108

I. RESUMEN

Los protozoos son un grupo muy diverso que presenta una distribución cosmopolita debido a que pueden tolerar amplios intervalos de condiciones ambientales. Un hábitat poco estudiado han sido las cuevas, existiendo en México en particular escasos registros, a pesar de ser un país con un gran número de cavernas. El presente estudio tuvo como objetivo aumentar nuestro conocimiento acerca de las especies de protozoos que se encuentran dentro de una cueva, considerando además que dentro de ella existen diversos sustratos donde pueden vivir. Se trabajó para ello en la cueva de los Riscos ubicada en el estado de Querétaro y se consideraron cinco biotopos, el agua, suelo, guano y musgo para protozoos de vida libre y los murciélagos para los protozoos endoparásitos. Se realizaron seis recolectas en diferentes épocas del año. En el caso de los protozoos de vida libre se cultivaron en el laboratorio con medios naturales y artificiales; se realizó su observación con microscopio óptico, se tomaron los datos, registros fotográficos y se realizaron las técnicas micrográficas necesarias para su identificación. Para el caso de los protozoos endoparásitos se realizaron dos pruebas directas (frotis sanguíneos y corte histológico de corazón) y una indirecta (hemoaglutinación indirecta cuantitativa) en búsqueda de algún protozoo del género *Trypanosoma*.

Se identificaron 24 especies y 20 géneros de protozoos de vida libre como flagelados, ciliados, amibas desnudas, amibas testadas y heliozoos, distribuidos en los distintos sustratos, siendo el musgo el más diverso gracias al gran aporte energético que éste provee al ser autótrofo, aunque por esta misma razón sólo se encontró cerca de las entradas. Los murciélagos analizados no mostraron tener endoparásitos.

De las especies registradas, 20 son nuevos registros en cuevas para el mundo y para México.

II. INTRODUCCIÓN

1. PROTOZOOS

1.1 Definición y caracterización de protozoos

Corliss (1994) considera la existencia del Reino Protozoa y lo caracteriza como organismos en general unicelulares, a veces plasmodiales o coloniales, fagotróficos, sin color ni pared celular en el estado trófico. Presentan muy diversas formas, desde alargados, reniformes, piriformes, estrellados, entre otras. El reino incluye especies fotosintetizadoras (algunas mixotróficas) que típicamente poseen cloroplastos citosólicos con tilacoides, sin almidón y usualmente rodeados de tres membranas. En general presentan mitocondrias tubulares, o bien, hidrogenosomas, cuerpos de Golgi y peroxisomas. Su movimiento es por medio de flagelos, cilios o pseudópodos. Si presentan mastigonemas en los flagelos nunca son rígidos ni tubulares. La mayoría son de tamaño microscópico. Muchos son de vida libre y otros son simbioses.

1.2 Esquemas de clasificación

A mitad del siglo XVII Antonio Van Leeuwenhoek perfeccionó el microscopio con el cual pudo observar por primera vez un protozoo, dándole en ese momento el nombre de “animálculos” debido a que semejaban “pequeños animales” (cabe recordar que en esos momentos se consideraba la existencia de sólo tres reinos: Animal, Vegetal y Mineral) (Aladro-Lubel, 2006). Leeuwenhoek describió varias especies de protozoos, principalmente de agua dulce, siendo

Euglena el primer género del cual manda sus observaciones a la Royal Society of London (Corliss, 2002a).

En 1820 un naturalista alemán, Georg A. Goldfuss, introdujo el término Protozoa (primeros animales, del griego *proto*= primero y *zoon*= animal) a la literatura científica como una clase de organismos dentro del Reino Animal en la cual consideraba a los Infusoria (ciliados), Lithozoa (corales), Phytozoa (como *Cryptomonas*) y Medusinae. Años después, en 1845, Carl Theodor von Siebold (también alemán) estableció un phylum de animales invertebrados igualmente dentro del Reino Animal al que también llamó Protozoa y dentro del cual incluía las clases Infusoria (ciliados) y Rhizopoda (amibas y foraminíferos), considerándolos como “animales unicelulares” (Scamardella, 1999).

En 1860 el británico John Hogg propone y describe el Reino Protocista (“el reino primigenio”, del griego “creados primero”) que comprende “todas las criaturas inferiores o los inicios primarios orgánicos”. Es en 1866, cuando el alemán Ernst Haeckel propone eliminar el Reino Mineral y mantener un tercer reino, al que denomina Protista (el primero de todos, el primordial) en el cual agrupa a “todos los organismos de menor rango que no muestran afinidades decisivas hacia las plantas o animales”, es decir lo que hoy llamamos protistas; Haeckel considera este reino como el de las formas primitivas. Sin embargo en 1880, Otto Bütschli considera demasiado polifilético el reino propuesto por Haeckel y propone agrupar en el Phylum Protozoa sólo a los organismos unicelulares, nucleados y parecidos a animales (Scamardella, 1999). Dentro del phylum Bütschli propone cuatro clases: Mastigophora (flagelados), Sarcodina (amibas), Ciliophora o Infusoria (ciliados) y Sporozoa (esporozoos) (Aladro-Lubel, 2006).

De 1880 a 1980 existieron algunas tendencias de modificar este esquema de clasificación de Bütschli. En los primeros esquemas se reconocía un solo phylum, tendencia que dominó hasta la clasificación propuesta por Honigberg *et al.* (1964) y promovida por la Society of Protozoologists. Casi veinte años después, esta misma sociedad promovió la clasificación de Levine *et al.* (1980), la cual ya consideraba siete phyla de protozoos. Cavalier-Smith (1993) en sus trabajos, eleva a los Protozoa al estatus de reino.

Corliss (1994) propuso una clasificación basada en datos morfológicos pero también ultraestructurales y moleculares, pretendiendo que ésta sea amigable y comprensible. No considera que se debe ser demasiado rígido con la monofilia de los grupos e intenta rescatar el mayor número de nombres posible. Esta propuesta se basa en gran medida en Cavalier-Smith (1993), considera al Reino Protozoa dentro del Imperio Eukaryota y lo divide en 14 phyla.

Años más tarde surgen dos propuestas con diferentes enfoques, la de Patterson (2000) y la de Lee *et al.* (2000). El primero fragmenta los grupos del sistema de Bütschli y propone cuatro linajes mayores: alveolados (este grupo incluye apicomplexos, tres géneros de flagelados, ciliados y dinoflagelados), euglenozoa (agrupa aquí euglenoidinos, kinetoplástidos y diplomonemidos), opistocontes (el grupo comprende hongos verdaderos, quitridios y coanoflagelados) y estramenópilos (este ensamble incluye microalgas como crisofitas, diatomeas y sinurofitas, macroalgas pardas, oomicetes, labirintúlidos, protozoos como opalinas, bicosoécidos y ciliófridos). Por su parte Lee *et al.* (2000) no buscan reflejar dentro de su clasificación ninguna relación evolutiva, por lo cual sólo separan los protozoos en siete grandes conjuntos: grupos relacionados con los multicelulares (coanoflagelados, microsporidios, mixozoos y volvocidos), alveolados (Apicomplexa, Colpodellidae, Ciliophora y Dinozoa), estramenópilos (bicosoécidos, crisomonádidos, entre otros), protistas ameboides (amibas desnudas y testadas, heliozoos, entre otros), protistas ameboides con flagelo (pelobiontes y heteroloboseos), protistas flagelados (criptomonádidos, diplomonádidos, euglenozoos, oximonádidos, entre otros) y otros (especies de los grupos Haplospora y Plasmodiophora).

1.3 Ecología

Protozoos de vida libre. El ambiente en el cual crecen y se reproducen los protozoos es influenciado por los factores bióticos y abióticos que determinarán su presencia y distribución. Los factores abióticos pueden ser físicos (luz, temperatura, movimientos del agua) o químicos (humedad, concentración de

iones, pH, concentración de gases disueltos) y son cruciales en la determinación de dónde puede o no un protozoo en específico vivir en un determinado hábitat (Hausmann y Hülsmann, 1996). Dentro de los factores fisicoquímicos más importantes se encuentran (en orden): un mínimo de agua o humedad, salinidad, presencia de gases disueltos (O_2 , CO_2 , H_2S) y pH. Por otra parte los factores bióticos son los recursos alimenticios, sus relaciones con los organismos procariontes y eucariontes que los rodean (competencia, relaciones de depredador-presa) y son de principal importancia en la determinación de la abundancia relativa de las poblaciones (Bamforth, 1985).

Los protozoos en general son tolerantes a un amplio intervalo de factores ambientales físicos y químicos, por lo que son encontrados en una gran variedad de hábitats y biotopos (son cosmopolitas) y no se encuentran distribuidos al azar (Bamforth, 1985). En algunos casos se ha mostrado que ciertas especies de un mismo género viven en distintas partes del mundo, pero en la mayoría de los casos no hay datos confiables disponibles porque este aspecto de la ecología de protozoos no ha sido estudiado a detalle. Algunos protozoos viven exclusivamente en regiones tropicales, lo que es cierto para formas de agua dulce y marina. La distribución mundial de algunas especies de protozoos puede explicarse debido a que existen microhábitats similares disponibles, además de que hay un amplio intervalo de mecanismos y posibilidades de distribución (Corliss, 2002b). En el caso de los ciliados de vida libre las especies se encuentran en todos los lugares imaginables, muchos presentan distribución cosmopolita y su riqueza global específica es relativamente baja (Finlay *et al.*, 1998). Uno de los hábitats poco estudiados pero que ya cuenta con registros de la existencia de estos organismos son los ambientes subterráneos (Golemansky y Bonnet, 1994).

Las formas verdaderamente endémicas no son tan comunes como generalmente se pensaba en el pasado, aunque aún se necesitan más estudios para poder asegurar esto con certeza. Al respecto cabe notar que los hábitats donde encontramos a los protozoos incluyen nichos que manifiestan intervalos extremos en temperatura, oxígeno, humedad, contenido mineral, salinidad, pH, presión atmosférica y radiación (Corliss, 2002b).

Para encontrar protozoos en un determinado hábitat se necesita que exista al menos un poco de agua libre, sin importar si el fluido circundante es agua dulce, marina, el fluido de un tejido u órgano de otro organismo o inclusive la delgada capa de agua que cubre los granos del suelo o la superficie de las hojas como gotas de rocío. Podemos además encontrarlos viviendo en temperaturas que van desde el punto de congelación del agua hasta más de 40 °C. La mayoría de los protozoos dependen del oxígeno disuelto en el medio y no necesitan de altas concentraciones como los metazoos debido a su tamaño microscópico y a las cortas distancias de difusión, como resultado de esto muchas especies pueden sobrevivir en hábitats con concentraciones muy bajas de oxígeno o en ambientes totalmente anaeróbicos. Sin embargo, la ausencia de ciertas especies en un hábitat dado no nos dice nada acerca de sus demandas ya que se ha mostrado que numerosos ciliados típicos de agua dulce pueden también sobrevivir en agua de mar, si se adaptan lentamente (Hausmann y Hülsmann, 1996).

Los protozoos juegan un importante papel en la red trófica como consumidores primarios, siendo los ciliados los más abundantes fagótrofos en la biosfera. Por su parte los flagelados, típicamente más pequeños pero mucho más abundantes que los ciliados, gracias a que la mayoría son mixótrofos en su nutrición, pueden formar parte del plancton o del bentos. Las especies de ambos grupos, ciliados y flagelados (y en menor medida las amibas), sirven como los mayores descomponedores y como mediadores del reciclaje de nutrientes en los ecosistemas (Corliss, 2002b). La distribución de las formas sin clorofila refleja el abastecimiento de comida (Bamforth, 1985).

El primer paso para formar una nueva biocenosis es el establecimiento de un nuevo hábitat. Las “especies pioneras” son normalmente pequeños flagelados, los cuales son seguidos por pequeñas amibas y ciliados. En el curso del establecimiento de la biocenosis el hábitat es modificado formando nuevos nichos ecológicos, especialmente para los protozoos depredadores (Hausmann y Hülsmann, 1996).

Los protozoos representativos dominantes que se presentan en el suelo son los ciliados y las amibas (desnudas y testadas). Entre los ciliados, los colpódidos, hipotricos y prostomátidos son de especial importancia y se alimentan preferencialmente de amibas o células suspendidas de levaduras y esporas de

hongos. Por su parte las amibas ingieren muchos organismos que se encuentran adheridos al sustrato. En términos de su productividad e importancia ecológica, las amibas testadas y ciliados son tan importantes para el suelo como las lombrices de tierra (Hausmann y Hülsmann, 1996).

Los protozoos pueden sobrevivir a condiciones desfavorables por medio del enquistamiento y posterior exquistamiento en respuesta a cambios favorables en los factores fisicoquímicos o sustancias bióticas del medio (Bamforth, 1985).

Protozoos endoparásitos de murciélagos. Algunas especies de protozoos tienen su crecimiento óptimo a temperaturas relativamente altas por lo que pueden vivir como endoparásitos facultativos inclusive en animales de sangre caliente. Esta pre-adaptación a las altas temperaturas es uno de los prerequisites para que un protozoo sobreviva y se desarrolle dentro de aves y mamíferos (Hausmann y Hülsmann, 1996).

Dentro de las cuevas pueden habitar distintos vertebrados que sirven como huéspedes para varios grupos de protozoos. Muchos de estos protozoos han sido encontrados como parásitos naturales de murciélagos, de los cuales relativamente pocos han sido catalogados como dañinos para el hombre o los animales domésticos. La mayoría de estos protozoos son transmitidos a los quirópteros mecánicamente por medio de un vector que es algún insecto (Hill y Smith, 1992).

Los murciélagos son animales de hábitos nocturnos que han ocupado multitud de nichos ecológicos, siendo los únicos mamíferos que pueden volar. Las condiciones de temperatura y humedad que prevalecen en las cuevas son idóneas para estos mamíferos, quienes las utilizan como refugio diurno y sitio para la crianza de los juveniles. No es de extrañar que la mayoría de las cuevas se encuentren habitadas por enormes poblaciones de murciélagos (Hoffmann *et al.*, 1986).

Algunos parásitos causantes de la malaria o paludismo (*Plasmodium*, *Hepatoctystis*, *Nycteria* y *Polychromophilus*) han sido encontrados en murciélagos a través del mundo. Diecinueve especies de tripanosomas han sido registrados en 52 especies de murciélagos representando diez familias de regiones tropicales y subtropicales del mundo (Hill y Smith, 1992). Son parásitos de murciélagos los

tripanosomas de tres subgéneros: *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* y *Megatrypanum*. Las infecciones más frecuentes son causadas por organismos de los subgéneros *Megatrypanum* y *Schizotrypanum* y los murciélagos insectívoros (Microchiroptera) son los más frecuentemente infectados. Pueden ocurrir infecciones mixtas de subespecies de *Schizotrypanum* (Molyneux, 1991). Los tripanosomas de éste subgénero han causado gran interés debido a su semejanza morfológica con *Trypanosoma cruzi* (Molyneux, 1991). Treinta especies de murciélagos representantes de seis familias (Emballonuridae, Noctilionidae, Phyllostomatidae, Desmodontidae, Vespertilionidae y Molossidae) han sido registrados con una infección de un tripanosoma morfológicamente idéntico a *T. cruzi*, pero a diferencia de éste, el tripanosoma del murciélago presenta poca o nula patogenicidad en ratones de laboratorio. Debido a que los murciélagos han mostrado ser uno de los distintos grupos de mamíferos que sirven como reservorios de *T. cruzi* se considera su estudio como de importancia para la salud pública (Constantine, 1970).

En Sudamérica el murciélago vampiro *Desmodus rotundus* actúa como huésped de algunos tripanosomas como *Trypanosoma evansi*, *T. equiperdum*, *T. rangeli* (Molyneux, 1991; Constantine, 1970) y *T. pessoai*, que fue aislado por primera vez en este mamífero (Rojas, 2005). Se ha descrito a *D. rotundus* como un vector de *T. evansi* debido a que, cuando chupa la sangre de la que se alimenta, el murciélago transmite el parásito (Molyneux, 1991). La infección comienza cuando el protozoo es inoculado primeramente hacia el huésped (como el ganado y otros mamíferos) por medio de dípteros hematófagos, posteriormente, cuando el murciélago se alimenta, el parásito pasa a su sangre debido a que la membrana de la mucosa oral no actúa como barrera contra los tripanosomas. Una vez ahí el parásito se multiplica aproximadamente por un período de un mes, luego del cual, pasa de nuevo a la mucosa oral en donde el murciélago lo transmite al morder a otro huésped (Rojas, 2005). Los murciélagos, que adquieren la infección al alimentarse de caballos y vacas infectados, parecen no ser afectados por los parásitos. Nada se sabe acerca de la frecuencia e importancia de este método de transmisión (Molyneux, 1991). No hay evidencia de que los tripanosomas que infectan murciélagos causen efectos adversos en sus huéspedes. Las especies “no

patogénicas” de *Schizotrypanum*, que se asumen como no infecciosas en humanos, producen quistes en los tejidos de los murciélagos (se han encontrado en corazón, diafragma, músculos del esternón, mucosa intestinal y ovarios). Se reconoce que *Trypanosoma cruzi* infecta murciélagos pero no hay mas información disponible acerca de las relaciones huésped-parásito o la patología de la infección (Molyneux, 1991).

Estudios en cepas sin caracterizar de *T. cruzi* han mostrado que algunos de estos tripanosomas son transmisibles a varias especies y géneros de murciélagos mientras que otros no. No hay información acerca de la producción de anticuerpos en murciélagos y hay poco acerca de las interrelaciones entre parásitos simpátricos. En chinches de la especie *Cavernicola pilosa* (Reduviidae) colectadas en cuevas han sido observados parásitos que parecen ser *T. cruzi marinkellei* (Molyneux, 1991).

Estudios en murciélagos capturados que se han infectado naturalmente y en murciélagos infectados en laboratorio muestran que las infecciones patentes pueden persistir por varios meses y las subpatentes por más de un año. El periodo de incubación, antes de que sea detectable la parasitemia, es tan sólo de algunos días. Se ha registrado que los murciélagos que se posan en viviendas o forman largas colonias en cuevas tienen bajas tasas de infección de tripanosomas del subgénero *Schizotrypanum* (Molyneux, 1991).

Por otra parte, *Toxoplasma gondii* es un parásito cosmopolita que se encuentra en animales de sangre caliente y en el humano. Los muestreos indican que la incidencia serológica de la infección puede ser alta en animales domésticos, y que la infección en animales silvestres es extensiva, por lo que no resulta sorprendente encontrar este parásito en murciélagos (Constantine, 1970).

Otros parásitos conocidos en murciélagos son del grupo de los apicomplexos (*Eimeria*, *Isospora* y *Klossia*) y Haemosporidia (*Babesia*, *Plasmodium*, *Nycteria*, *Polychromophilus* y *Hepatocystis*) (Constantine, 1970).

2. CUEVAS

2.1 Colonización de una cueva

Los mecanismos de dispersión por los cuales se da la entrada y colonización de los protozoos a formaciones kársticas y grutas en general tiene lugar por la intermediación de las aguas que penetran o se infiltran en las capas subterráneas y originan los ríos, riachuelos y aguas subterráneas (Golemansky y Bonnet, 1994).

De esta manera penetran tanto trofozoítos, como una gran cantidad de quistes, lo que permite explicar la existencia en las grutas de una comunidad rica y diversa de protozoos, entre ellos representantes de los fitoflagelados, que normalmente no pueden existir mucho tiempo en condiciones de oscuridad total (Golemansky y Bonnet, 1994).

Asimismo, no queda excluido el ingreso de protozoos (de quistes en primer lugar) por las entradas de las grutas a través de corrientes de aire o por la intermediación de otros habitantes cavernícolas (como invertebrados o vertebrados, como es el caso de murciélagos, entre otros) e inclusive en las grutas acondicionadas y visitadas por el hombre éste mismo puede servir como medio para la entrada de los protozoos a la cueva (Golemansky y Bonnet, 1994).

2.2 Biotopos en una cueva

2.2.1 Agua. Reddell (1981) propone que las cuevas con depósitos, corrientes de agua o que al menos mantengan un alto grado de humedad, pueden albergar protozoos de los Phyla Euglenozoa, Parabasala y Heliozoa, así como ciertos miembros del Phylum Rhizopoda (como los géneros *Arcella* y *Diffugia*) y del Phylum Ciliophora (como representantes de los géneros *Coleps* y *Vorticella*).

Las comunidades acuáticas en las grutas se caracterizan por su extraordinaria simplicidad. La ausencia absoluta de luz impide la existencia de organismos fotosintetizadores, provocando una dependencia de los organismos por

el flujo de nutrientes del exterior. La acción de los factores limitantes sobre las poblaciones de organismos acuáticos cavernícolas queda patente al comparar la diversidad y abundancia de protozoos en un cuerpo de agua que se encuentra dentro de una cavidad con un estanque del exterior. Es lógico suponer que esta relativa escasez en el número de especies de individuos resulta de la pobreza en cuanto a nutrientes que presenta la biocenosis acuática en las cuevas (Morales-Malacara y Vázquez, 1983).

2.2.2 Suelo. En ambientes exteriores, en el suelo (así como en las hojas desprendidas o sobre plantas) podemos encontrar protozoos con alto grado de adaptación junto con especies conocidas de agua dulce con un grado relativamente bajo de especialización. El horizonte superior del suelo se provee con agua de lluvia y agua subterránea; esta agua se acumula en capilares y poros cuyo tamaño depende del tamaño de grano del mineral que conforma el sustrato (Hausmann y Hülsmann, 1996). Hay muy pocos registros de protozoos encontrados en este sustrato en cuevas debido a que la mayoría de los estudios se han realizado en los cuerpos de agua. Sin embargo, aunque en menor cantidad, sí se pueden encontrar especies que seguramente serán distintas a las que viven sobre los demás sustratos. Los únicos registros disponibles citan que en este sustrato se encuentran amibas desnudas, flagelados sin pigmentos y ciliados (Golemansky y Bonnet, 1994).

2.2.3 Guano. De este sustrato también hay muy pocos estudios realizados, Hoffmann *et al.* (1986), citan que se han encontrado protozoos y son parte de una compleja biocenosis, sin especificar las especies, mientras que Golemansky y Bonnet (1994) registran que se han encontrado amibas desnudas, flagelados sin pigmentos y ciliados viviendo sobre guano y suelo en general. En realidad no se conocen bien las especies que viven en este sustrato.

2.2.4 Murciélagos. Estos vertebrados pueden albergar endoparásitos como protozoos flagelados de la familia Trypanosomatidae o protozoos del Phylum Apicomplexa, los cuales son transmitidos entre los murciélagos por algunos de sus numerosos ectoparásitos, insectos y ácaros (Hoffmann *et al.*, 1986).

2.2.5 Musgo. Este sustrato en general no ha sido estudiado por separado, pero al menos para el caso de los protozoos no se puede considerar como un sub-biotopo dentro del suelo debido a que además del aporte energético que supone la

vegetación, la existencia de una película de agua asociada en general a ésta cambia las condiciones en el suelo y por tanto los protozoos que puedan ser ahí encontrados. Adicional a esto, el musgo no siempre lo encontraremos sobre el suelo, pudiendo crecer sobre rocas o árboles, marcando así una mayor diferencia entre las especies que puedan habitar estos biotopos. Golemansky y Bonnet (1994) citan que se han encontrado amibas testadas, ciliados y flagelados viviendo en grandes cantidades sobre este sustrato.

La mayor parte de los protozoos de vida libre encontrados en cavernas son acuáticos. Un número relativamente pequeño de especies (alrededor del 20%), como las amibas desnudas, flagelados sin pigmentos y ciliados, han sido encontrados en el guano, restos orgánicos en descomposición y la arcilla húmeda del suelo (Golemansky y Bonnet, 1994).

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes de registros de protozoos en cuevas en el mundo y en México

Los primeros registros que se tienen de protozoos dentro de una cueva fueron publicados en la segunda mitad del siglo XIX y los estudios fueron realizados en cavernas de Europa (Yugoslavia, Checoslovaquia, Francia) y América del Norte, encontrando protozoos de diferentes grupos como ciliados, rizópodos y heliozoos, entre otros (Golemansky y Bonnet, 1994).

A finales del siglo XIX se encontraron los primeros parásitos gregarínidos y ciliados en crustáceos cavernícolas, a principios del siglo XX se descubrió y describió un microsporidio desconocido hasta entonces. Durante los siguientes años muchos protozoos endoparásitos como algunos ciliados y apicomplexos fueron encontrados en insectos, miriápodos, crustáceos y otros animales de cuevas (Golemansky y Bonnet, 1994).

Aunque dentro de las cuevas se han encontrado un gran número de protozoos de vida libre (más de 180 especies) la opinión de los especialistas es que no hay ningún troglobio estricto (habitante exclusivo de cavernas adaptado totalmente a la vida dentro de ellas). Las pruebas residen en la vasta repartición de protozoos cavernícolas, conocidos también en los biotopos terrestres y la falta de particularidades adaptativas morfológicas, biológicas y ecológicas en relación con su vida dentro del biotopo subterráneo (Golemansky y Bonnet, 1994). Es por esto que más bien son considerados como epigeomorfos (que viven y se reproducen dentro de la cueva sin presentar cambios morfológicos) (Hoffmann *et al.*, 1986).

En cuanto a los protozoos que establecen algún tipo de asociación con otro organismo que habita en una cueva, se considera a los epibiontes (de artrópodos en general) como troglobios por su especificidad hacia sus huéspedes, siempre y cuando éste también sea troglobio (Golemansky y Bonnet, 1994). Algunos autores consideran que los parásitos de murciélagos sólo presentan adaptaciones para la vida parásita y no a la cavernícola y por ello, deben separarse en una categoría especial (Hoffmann *et al.*, 1986).

Golemansky y Bonnet (1994) hacen un listado de los protozoos más comúnmente encontrados en cuevas a nivel mundial (principalmente cuevas de Europa y Asia), citando 58 especies, de las cuales 13 especies, distribuidas en 10 géneros, corresponden a flagelados, 10 especies en cuatro géneros corresponden a amibas desnudas y 19 especies en siete géneros son amibas testadas. En cuanto a los heliozoos citan cuatro especies distribuidas en tres géneros, una especie de foraminífero y 11 de ciliados (Anexo 1).

En México se tienen registros de protozoos en cuevas de San Luis Potosí y Guerrero, que corresponden a ocho especies de flagelados, tres amibas desnudas, cuatro especies de amibas testadas distribuidas en tres géneros, 14 especies de ciliados en 12 géneros y una especie de heliozoo (Osorio-Tafall, 1943; Hoffmann *et al.*, 1986) (Anexo 2). Asimismo en estudios realizados entre los años 1982 y 1990 por alumnos de la carrera de biología de la Facultad de Ciencias, en la Universidad Nacional Autónoma de México, se encontraron 14 especies de flagelados distribuidas en 14 géneros, cuatro especies de amibas desnudas en tres géneros, dos especies de amibas testadas, 19 especies de ciliados en 17 géneros, así como una

especie no identificada de heliozoo, en cuevas de los estados de Veracruz, Guerrero y Querétaro, sin embargo estos trabajos no fueron publicados (Morales-Malacara y Losoya, 1989-1990; Morales-Malacara y Vázquez, 1982 a y b, 1983, 1983-1984, 1985, 1986) (Anexo 2). En particular para la cueva de los Riscos ubicada en el estado de Querétaro, México, en 1986 se realizó un listado faunístico dentro del cual se incluyó el estudio de una muestra de agua tomada de la zona C, en el invierno de ese año. La muestra fue tomada de la superficie de un gour (cuerpo de agua ubicado al interior de una cueva) que se mantuvo de aproximadamente cuatro metros de diámetro en todas las visitas a la cueva, aunque fue bajando. En el laboratorio se le agregó a la muestra infusiones de trigo y chícharo en búsqueda de protozoos. Los protozoos encontrados mostraron una sucesión: primero aparecieron los flagelados y luego los ciliados. Las especies más abundantes en los cultivos fueron, en orden, *Cyclidium glaucoma* y *Chilodonella* sp. Además se registró la presencia de géneros como *Tetrahymena* sp., *Cinetochilum* sp. y *Bodo*? (Morales-Malacara y Vázquez, 1986).

En los murciélagos *Pteronotus davyi fulvus* colectado en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas y en *Macrotus mexicanus* colectado en Coquimatlán, Colima se encontró una especie de protozoo flagelado que se consideró como *Trypanosoma vespertilionis* (Hoffmann *et al.*, 1986). Asimismo se tienen registros de esta especie en el murciélago *Leptonycteris yerbabuenae* colectado en las grutas de Juxtlahuaca, Guerrero (Madrazo-Garibay *et al.*, 1986).

3.2 Área de estudio

3.2.1 Ubicación. La cueva de los Riscos se encuentra ubicada en el Municipio de Jalpan de Serra, Querétaro, México, entre las coordenadas 21° 11' 797" N y 99° 30' 972" W, a una altitud de 1,122 msnm.

La siguiente descripción de la cueva fue tomada de Lazcano (1986), sin embargo durante la realización del estudio se completó la topografía agregándose dos zonas (G y H) y algunos túneles.

La cueva es muy conocida en la región y es muy frecuentada por los habitantes de la localidad. Los primeros espeleólogos en explorarla fueron: John Fish, David McKenzie, James Reddell, Janie Reddell y Richard Smith, en agosto de 1966, todos ellos miembros de la Asociación para el Estudio de Cuevas en México (AMCS por sus siglas en inglés).

3.2.2 Descripción general. La cueva es una cavidad horizontal de 35 metros de profundidad y cerca de 500 metros de longitud (Fig. 1).

Es una cavidad fósil, originada en las calizas de la formación El Abra. Es probable que antiguamente haya captado al río Jalpan, pero al horadar su cauce a mayor profundidad, la cueva de los Riscos fue abandonada, aprovechándose el Puente de Dios. Cuando el río Jalpan tiene crecidas penetra algo de agua a esta caverna. Las numerosas filtraciones producidas por las lluvias han originado gran cantidad de concreciones.

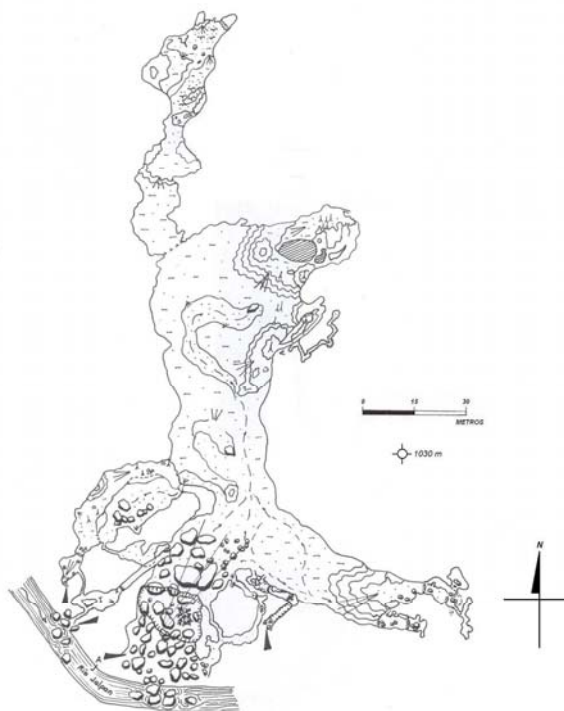


Figura 1. Mapa de la cueva de los Riscos.

Tiene cuatro entradas, dos laterales que corresponden a pasillos estrechos y desembocan en una amplia galería y la principal que forma un pequeño puente natural, que accede a una amplia boca que se abrió debido a un antiguo colapso. Se desciende entre grandes bloques rocosos hasta llegar a una amplia galería, ésta tiene 100 metros de largo, 25 m de ancho, 18 m de alto y accede a un espacioso salón que presenta gran cantidad de concreciones. La cuarta entrada corresponde a la nueva topografía y se ubica del otro lado de la principal, es un pasillo estrecho que desemboca en la galería más amplia, a cuatro metros del suelo.

La fauna que se ha encontrado ahí está comprendida por ranas (*Syrrhophus longipes*), murciélagos (*Dyphilla eucaudata* y *Desmodus rotundus*), anélidos, crustáceos (Isopoda), dípteros, ortópteros (Gryllidae), coleópteros (Tenebrionidae), lepidópteros, tisanuros (Machilidae), arañas (Pholcidae, Dipluridae, Ctenidae, Linyphidae), opiliones (Laniatore), hemípteros, himenópteros, quilópodos y diplópodos, así como ácaros parásitos de murciélagos. Además se presentan hongos (*Histoplasma* no confirmado, entre otros). Todos estos organismos son heterótrofos y por tanto consumidores secundarios o terciarios que necesitan obtener su alimento de fuentes tales como los protozoos y bacterias.

3.2.3 Zonas. Para su estudio, la cueva se ha dividido en ocho zonas (A-H):

Zona A. Esta zona comprende la entrada principal, que debido a que se formó por un derrumbe está constituida principalmente por rocas como sustrato. Esta zona se caracteriza por estar completamente iluminada, gracias a lo cual puede mantener pequeñas poblaciones de vegetación, desde musgo hasta árboles. Es una zona inclinada que en general presenta la misma fauna que se encuentra en el exterior. También

está comprendida dentro de esta zona una gran galería al pie de los bloques rocosos, cuyo sustrato es arena y que todavía está bien iluminada (Fig. 2).



Figura 2. Zona A, cueva de los Riscos.

Zona B. Esta zona se encuentra a la derecha de la entrada principal, cuyo sustrato es arena y barro seco, se observan viejos meandros y se encuentra poco iluminada. Presenta

escurrimientos pero no llegan a formar cuerpos de agua. Además hay un gran macizo rocoso que puede ser escalado sin necesidad de equipo, de

aproximadamente 50 metros de altura y en cuya cima se encuentran más túneles hacia los lados, arriba y hacia abajo, pero que no llegan muy lejos. Esta zona elevada ya no está iluminada (Fig. 3).



Figura 3. Zona B, cueva de los Riscos.

Zona C. Esta zona comprende un pasillo largo y amplio con poca iluminación cuyo sustrato es barro seco que en general se observa cuarteado, es cruzado por una depresión de aproximadamente un metro y que parece ser huella de un antiguo río. Al lado derecho se encuentran dos elevaciones, una de las cuales, de aproximadamente 20 metros, no lleva a ningún lado mientras que la otra, de aproximadamente 10 metros, presenta un túnel cerrado hacia abajo después del cual continúa horizontalmente, llevando finalmente a un cuerpo de agua de aproximadamente tres metros de diámetro, poco profundo (cerca de 50

cm), con agua transparente y que presenta una muy pequeña población de peces. Esta zona elevada es de completa oscuridad. Presenta varias pozas de escurrimiento pequeñas, además del gour permanente. Del otro lado del gour hay una gran abertura que permite observar desde arriba parte del pasillo de esta zona (Fig. 4).



Figura 4. Zona C, cueva de los Riscos.

Zona D. Esta es la parte terminal del pasillo formado por la zona C, presenta varios niveles, de aproximadamente un metro de altura

cada uno y separados por breves zonas planas. Es una zona de completa oscuridad, en cuyo fondo se presentan poblaciones de

murciélagos, su sustrato presenta por tanto grandes cantidades de guano. Presenta escurrimientos importantes, formando pequeños gours temporales (Fig. 5).



Figura 5. Zona D, cueva de los Riscos.

Zona E. Esta zona comprende la otra entrada de la cueva, que desemboca a la zona A, es un pasillo estrecho de paredes largas que no presenta escurrimientos, el sustrato es arena. Está iluminado solamente en una pequeña parte correspondiente a la boca y a la parte donde se junta con la zona A (Fig. 6).

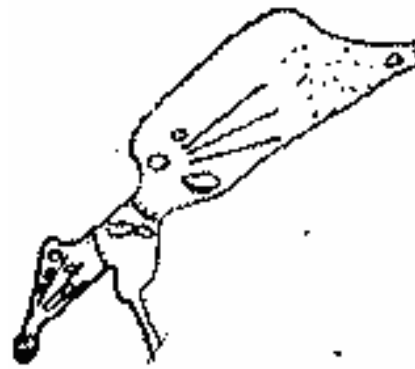


Figura 6. Zona E, cueva de los Riscos.

Zona F. Este es otro pasillo estrecho que comunica la zona E con la A, es una zona oscura (Fig. 7).

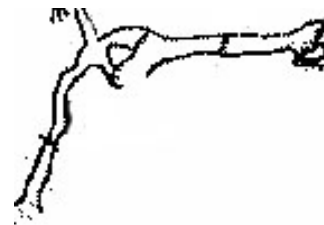


Figura 7. Zona F, cueva de los Riscos.

Zona G. Esta zona es un túnel estrecho que tiene su entrada en la parte superior de la zona A, continúa hacia el noreste para regresar unos metros adelante hacia el noroeste y

desembocar otra vez en la zona A, algunos metros debajo de donde se encuentra la entrada. Es una zona de completa oscuridad, a excepción de sus entradas (Fig. 8).

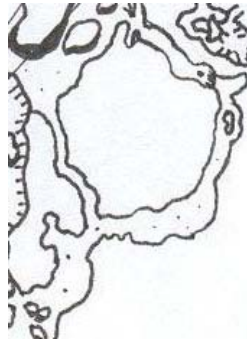


Figura 8. Zona G, cueva de los Riscos.

Zona H. Es un tiro estrecho que comienza en una de las entradas laterales y desemboca en la zona B a aproximadamente cuatro metros sobre el nivel del suelo. Es una zona de completa oscuridad, excepto cerca de sus entradas (Fig. 9).



Figura 9. Zona H, cueva de los Riscos.

III. JUSTIFICACIÓN

Los protozoos son un grupo muy diverso de organismos eucariontes unicelulares con un amplio registro en aguas dulces y marinas, así como en suelos e inclusive son utilizados en sistemas de tratamiento de aguas, sin embargo han sido muy poco estudiados dentro del ambiente cavernícola. De los escasos estudios de protozoos en cuevas, los más recientes tienen al menos 20 a 30 años de haberse realizado, habiendo más registros del siglo XIX. Lo anterior manifiesta un abandono o estancamiento en el estudio de los protozoos en cuevas, añadiendo que estos registros son en su mayoría de cuevas de Europa y Asia. El presente estudio pretende colaborar al mejor conocimiento de la diversidad, distribución y ecología de los protozoos en una cueva de la Sierra Gorda, Querétaro, México e incentivar con esto el desarrollo de más estudios de este tipo, para sentar las bases que permitan elaborar a futuro estudios que nos lleven al mejor conocimiento y conservación de las cuevas.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Contribuir al conocimiento de los protozoos que habitan en la cueva de los Riscos, Querétaro, México.

PARTICULARES

- a) Identificar las especies que se encuentran en cada uno de los biotopos de la cueva (agua, guano, suelo, murciélagos y musgo).
- b) Tipificar las comunidades de protozoos en cada biotopo.
- c) Comparar las comunidades de protozoos de los cinco biotopos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. TRABAJO EN CAMPO

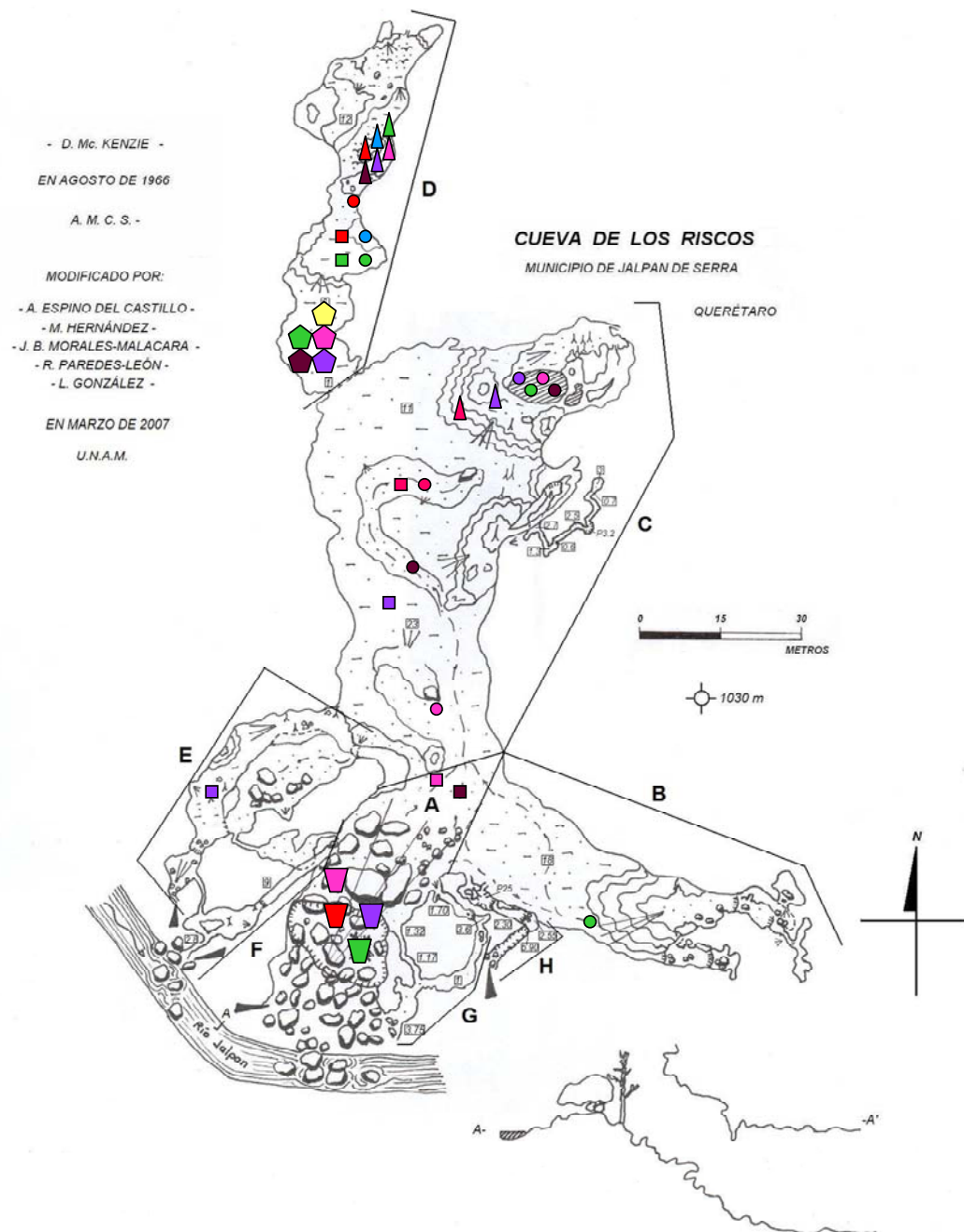
En total se realizaron seis recolectas en distintas épocas del año en el periodo de noviembre de 2005 a octubre de 2007, en la cueva de los Riscos, Querétaro, México (Tabla 1 y Fig. 10). Para entrar a la cueva se tomaron diversas medidas de seguridad como el uso de casco y mascarilla.

Tabla 1. Datos de las recolectas para protozoos de vida libre.

BIOTOPO	2005	2006			2007	
	Noviembre	Abril	Junio	Octubre	Marzo	Junio
	ZONA					
Agua (pequeños charcos formados por escurrimiento)	D	C, D	B, D	C	-	C
Agua (gour permanente)	-	-	C	C	C	C
Suelo	-	C, D	D	A	C, E	A
Guano	D	C, D	D	D	C, D	D
Musgo	-	A	A	-	A	A

- No se recolectó el sustrato en esa fecha

En las zonas F, G y H no se colectó por ser túneles que conectan las demás zonas.



COLECTAS (Se distinguen por color):

● Noviembre-05 ● Abril-06 ● Junio-06 ● Octubre-06 ● Marzo-07 ● Junio-07 ● Octubre-07

Simbología: ○ AGUA □ SUELO ▲ GUANO ▼ MUSGO ⬠ MURCIÉLAGO

Figura 10. Mapa de la cueva de los Riscos con zonas (A-H) y lugares de recolecta.

1.1 Protozoos de vida libre

La mayor parte de las muestras se recolectaron manualmente en frascos de vidrio de 20 y 30 ml, previamente esterilizados en autoclave durante 35 minutos y sellados con parafilm. En las recolectas se tomaron muestras de distintas zonas para cada biotopo (Tabla 1 y Fig. 10); las muestras de agua se tomaron tanto del gour permanente como de charcos de escurrimiento y en todas la ocasiones se tomó un poco de sedimento. El musgo también fue recolectado en los frascos de 30 ml estériles y en bolsas transparentes de plástico de 15 x 20 cm. En todos los casos se dejó un espacio considerable para que los organismos tuvieran suficiente oxígeno.

Una vez tomadas las muestras se etiquetaron los frascos y bolsas y se mantuvieron en frío dentro de una hielera hasta llegar al laboratorio.

En otras ocasiones, para la recolecta de muestras primero se preparó en el laboratorio medio de cultivo (infusiones de chícharo, arroz, maíz y medio artificial RPMI-1640) que se colocó en un tubo Falcon con tapa, el cual fue esterilizado en autoclave y sellado con parafilm. Ya en la cueva se vació un poco de cada sustrato dentro del tubo, el agua se tomó con pipetas Pasteur estériles, para el suelo y guano se utilizaron cucharas estériles y para el musgo la recolecta se realizó con pinzas. Los tubos fueron colocados en una hielera a temperatura ambiente y únicamente fueron cerrados durante su transporte de la cueva a la camioneta, donde se mantuvo semi-abierto hasta el laboratorio.

1.2 Protozoos endoparásitos de murciélagos.

Se recolectaron murciélagos con una red de niebla puesta en la entrada o en ocasiones a la mitad de la zona D (Tabla 4). En algunos casos los murciélagos capturados se mantuvieron vivos hasta llegar al hotel, donde se sacrificaron e inmediatamente después se tomaron muestras de sangre arterial con jeringas para insulina, con ellas se realizaron frotis en portaobjetos nuevos que fueron fijados con metanol. También se colocó una gota de sangre en papel filtro y se dejó secar. En la recolecta de marzo de 2007, la extracción de sangre se hizo *in situ*, debido a que algunos de los ejemplares fueron liberados nuevamente para

no afectar su población, ya que en esa ocasión se capturaron muchos murciélagos. Se realizó la disección de siete murciélagos para obtener sus corazones, colocándolos envueltos en una gasa y dentro de un frasco de vidrio con formol al 10% para fijarlos y proceder en el laboratorio a realizar los cortes histológicos. Para las disecciones se utilizó bata, guantes estériles de cirujano, cubrebocas y lentes de protección.

2. TRABAJO EN LABORATORIO

2.1 Protozoos de vida libre.

Al llegar al laboratorio las muestras se refrigeraron y posteriormente, en un lapso no mayor a tres días, se tomó un poco de cada muestra colocándola en cajas de Petri pequeñas o grandes, cajas para cultivo de tejidos, frascos o tubos Falcon. Se utilizaron distintos medios, tanto naturales (infusiones de trigo, arroz, maíz, paja y chícharo) como artificiales (Chalkley, Peptona y medio RPMI-1640), los cuales se añadían en cantidades constantes (1-2 ml) por semana. En general se puso la misma muestra en distintos medios para encontrar aquél en el que mejor crecieran los organismos. Las muestras de guano fueron manipuladas bajo una campana de extracción de bioseguridad 3, para evitar una posible infección por el hongo *Histoplasma capsulatum*. Todo el material utilizado era previamente esterilizado a presión.

Los cultivos se mantuvieron en la estufa a 25 °C y fueron revisados periódicamente al microscopio óptico, registrándose la presencia de organismos y su abundancia relativa. Se elaboraron esquemas de cada uno y se obtuvieron los datos morfométricos de cada especie, utilizando un microscopio óptico Nikon Optiphot® o Zeiss® con ocular calibrado y reglilla.

Para mantener la abundancia se hicieron resiembras constantes, tomando una pequeña cantidad del cultivo y adicionándole nuevo medio, utilizando en algunos casos la centrifugación para concentrar a los organismos.

Se realizó el registro microfotográfico de los organismos *in vivo* (Microscopio Nikon Labophot-2® y Microscopio Zeiss Axioskop 2 plus®) tanto en formato analógico (cámara Nikon FX-35DX® con microflex Nikon HFX-DX®) como digital (Cámara Nikon Digital Sight DS-2MV® y Cámara Zeiss AxioCam MRC®), además de videgrabación (Microscopio Nikon Optiphot®, Cámara Nikon CCD TTNE-2700® de video a color, Videograbadora Sony SLV-LX55® para videocasete formato VHS). Para esta observación y registro fotográfico se utilizaron tres diferentes técnicas de iluminación: campo claro, contraste de fases y contraste diferencial de interferencia (DIC).

Para llevar a cabo la elaboración de preparaciones permanentes se utilizaron cultivos con abundantes organismos, empleando las técnicas micrográficas de (Anexo 3):

- Hematoxilina de Harris
- Klein (en Kudo, 1971)
- Protargol (Lee *et al.*, 1985)
- Protargol (Silva-Neto, 2000)
- Butanol-Nigrosina (Borror, 1969)

Para la identificación de los protozoos se consultó bibliografía especializada (Borror y Wicklow (1983), Corliss (1979), Foissner (1993), Foissner *et al.* (1991, 1992, 1994, 1995), Foissner y Berger (1996), Kahl (1930-1935), Lee *et al.* (2000), Leedale (1967), López-Ochoterena (1965), Page (1988), Page y Siemensma (1991), Pätsch (1974), Patterson y Hedley (1992), Patterson y Larsen (1991), Smirnov y Brown (2004), Smirnov y Goodkov (1999), Warren (1986), Wu y Curds (1979) y Kudo (1971)). Para cotejar el registro previo de las especies en México se consultó a Aladro-Lubel *et al.* (2006).

Para la ubicación taxonómica de los protozoos incluidos en diferentes grupos se siguieron las propuestas presentadas por diferentes autores en Lee *et al.*, 2000 (Leedale y Vickerman, Lynn y Small, Meisterfeld a y b, Mikrjukov *et al.*, Patterson *et al.* a y b, Rogerson y Patterson).

2.2 Protozoos endoparásitos de murciélagos.

En el laboratorio de Biología de Parásitos “Dr. Jorge Tay” de la Facultad de Medicina, UNAM, se tiñeron los frotis con giemsa (Anexo 3) y se observaron al microscopio óptico con el objetivo de 100x para localizar formas de tripomastigotes de *Trypanosoma*. Los papeles filtro con la gota seca de sangre se utilizaron para realizar pruebas de hemoaglutinación indirecta cuantitativa (Anexo 3), lo cual se trabajó en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, para detectar la presencia de parásitos.

Los corazones se fijaron en formol al 10% y para obtener los cortes histológicos primero se lavaron con agua corriente y después se deshidrataron con alcoholes graduales (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, 100%) y xilol. Posteriormente se incluyeron en una solución de paraplast.

Los cortes histológicos fueron de 7 μm y se realizaron en dos laboratorios de la Facultad de Ciencias, en el Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal y en el Taller de Biología de Animales III, donde fueron cortados con microtomo Leica RM2125RT® acomodando cinco cortes por portaobjetos, posteriormente fueron seleccionados algunos portaobjetos y teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina. Los cortes teñidos fueron observados al microscopio óptico a 100x para localizar a los parásitos.

VI. RESULTADOS

1. PROTOZOOS DE VIDA LIBRE

De los 44 protozoos de vida libre identificados, distribuidos en los distintos sustratos, se lograron determinar 24 hasta especie y 20 hasta género (Tablas 2-3 y Figs. 11-56). De los protozoos flagelados se encontraron siete géneros (Figs. 11-17), la mayoría pertenecientes al Phylum Euglenozoa. En el caso de los ciliados fueron identificadas 20 especies distribuidas en 16 géneros del Subphylum Intramacronucleata (Figs. 18-37). En cuanto a las amibas, se registraron ocho géneros de amibas desnudas (Figs. 38-45) y ocho géneros de amibas testadas (Figs. 46-53). También se identificó una especie de heliozoo perteneciente al Orden Centrohelida (Fig. 54).

De las especies identificadas, 19 ciliados, una amiba desnuda, tres amibas testadas y el heliozoo encontrado, son un nuevo registro para cuevas en el mundo y/o para México (Tabla 3) (Golemansky y Bonnet, 1994; Hoffmann *et al.*, 1986 y Osorio-Tafall, 1943).

1.1 Descripción, registro fotomicrográfico y esquema de las especies registradas.

***Astasia* sp.**

Flagelado euglenoide con forma que va de ovoide a piriforme. Midió entre 11.8 y 13.6 μm de longitud (desde la punta de la prolongación hasta el extremo truncado) por 4.8-6.4 μm de anchura. Es ligeramente truncado en la región anterior (de donde emerge un flagelo (*fa*) más largo que el cuerpo) y prolongado en su región posterior (*pr*). No tiene pigmentos. Se presentó en las muestras de agua y guano de prácticamente todas las recolectas. Fue abundante en los cultivos de diversas infusiones, sobre todo en chícharo y peptona (Fig. 11).

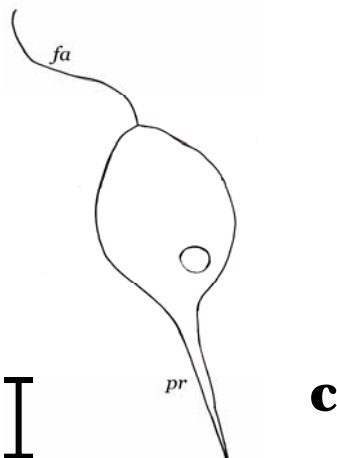
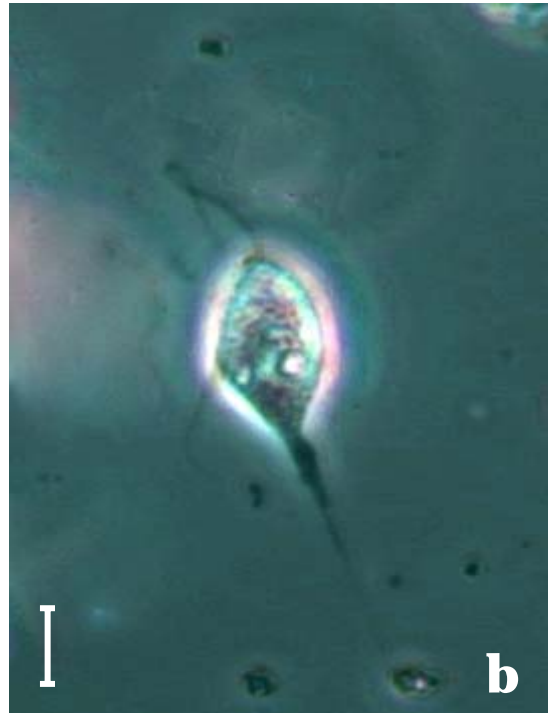


Figura 11. ***Astasia* sp.** **a**, Contraste de fases 40x, **b**, DIC 40x, **c**, esquema. *fa*-flagelo anterior, *pr*-prolongación. Barra de referencia = 2.5 μm .

***Distigma* sp.**

Flagelado euglenoide alargado con forma de botella, el extremo anterior es más ancho que el posterior y la región media está muy adelgazada. Midió entre 7.6 y 9.2 μm de longitud por 2.8 μm de anchura en su región más ensanchada. El cuerpo es muy plástico y tiene dos flagelos anteriores (*fa*), de los cuales el más corto es lateral. Sólo se presentó en la muestra de agua de la primera recolecta (noviembre de 2005) en cultivos de chícharo. En general fue poco abundante (Fig. 12).

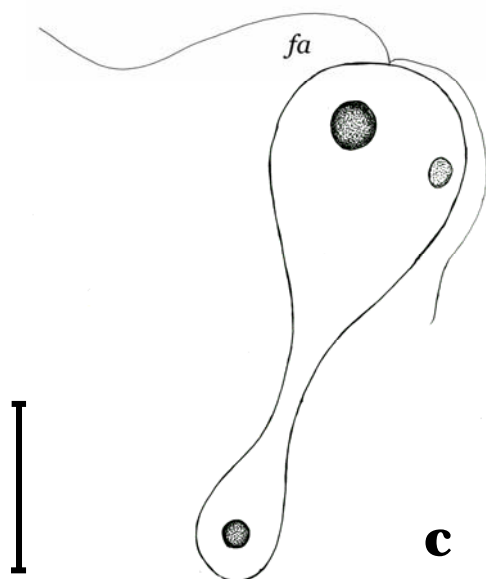
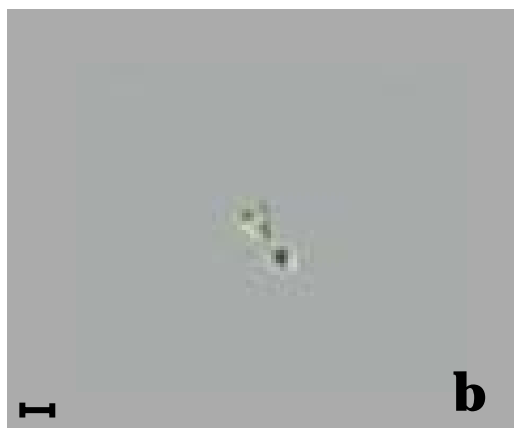
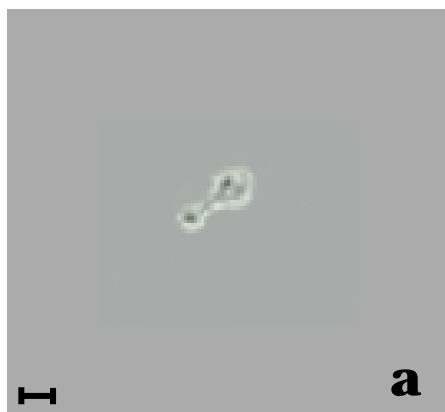


Figura 12. ***Distigma* sp.** **a-b**, Campo claro 40x, **c**, esquema. *fa*-flagelos anteriores. Barra de referencia = 2.5 μm .

***Entosiphon* sp.**

Flagelado euglenoide ovalado. El cuerpo midió entre 19.6 y 25.2 μm de longitud por 11.2 - 14 μm de anchura, los flagelos midieron entre 30.8 y 36.4 μm desde su base hasta la punta. Posee dos flagelos anteriores (*fa*) que se dirigen posteriormente. No tiene pigmentos, presenta una vacuola contráctil (*vc*) lateral. El organismo se distingue por presentar un tubo cónico protrusible llamado sifón (*sf*) que recorre casi todo el cuerpo. Se presentó sólo en musgo, tanto en la muestra original como en cultivos de maíz y Chalkley de las recolectas de abril y junio de 2006 y marzo de 2007 (Fig. 13).

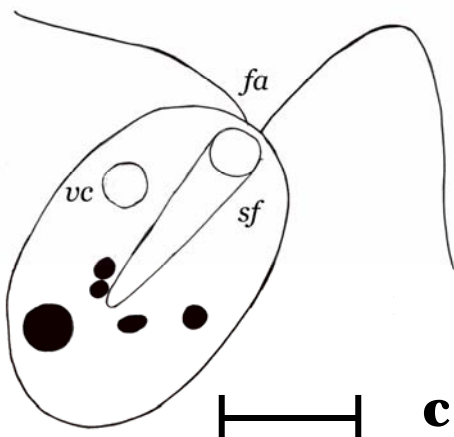


Figura 13. ***Entosiphon* sp.** **a**, Contraste de fases 40x, **b**, DIC 40x *in vivo* con verde de metilo, **c**, esquema. *fa*-flagelos anteriores, *sf*-sifón, *vc*-vacuola contráctil. Barra de referencia = 10 μm .

***Heteronema* sp.**

Flagelado euglenoide piriforme. Midió entre 8.4 y 10 μm de longitud por 2.8 - 4 μm de anchura. Tiene dos flagelos anteriores (*fa*) que salen y se dirigen posteriormente. Presenta de la región media a la posterior gránulos de reserva de paramilo (*gr*). Se encontró en baja abundancia en cultivos de agua, suelo y guano de las recolectas de octubre de 2006 y junio de 2007, desarrollándose sobre todo en cultivos de peptona (Fig. 14).

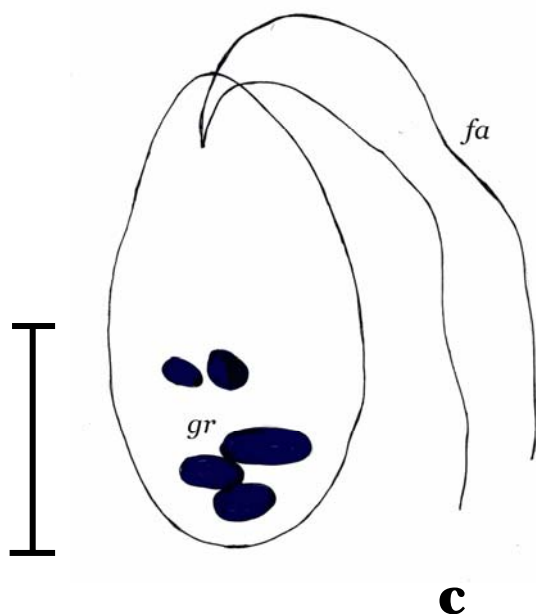


Figura 14. ***Heteronema* sp.** a-b, Campo claro 40x, c, esquema. *fa*-flagelos anteriores, *gr*-gránulos de reserva de paramilo. Barra de referencia = 5 μm .

***Peranema* sp.**

Esta especie es un flagelado de tipo euglenoide, es plástico y la forma del cuerpo recuerda el contorno de una ameba. Midió entre 14 y 20 μm de longitud y 2.8 - 5.6 μm de anchura. Se le observa un solo flagelo anterior (*fa*) muy largo (de hasta 42 μm), que sale de la región anterior y presenta otro flagelo (*f*) que no se observa porque se encuentra pegado al cuerpo. Posee una vacuola contráctil (*vc*). Se observó en cultivos de peptona y chícharo de agua de la primera recolecta (Fig. 15).

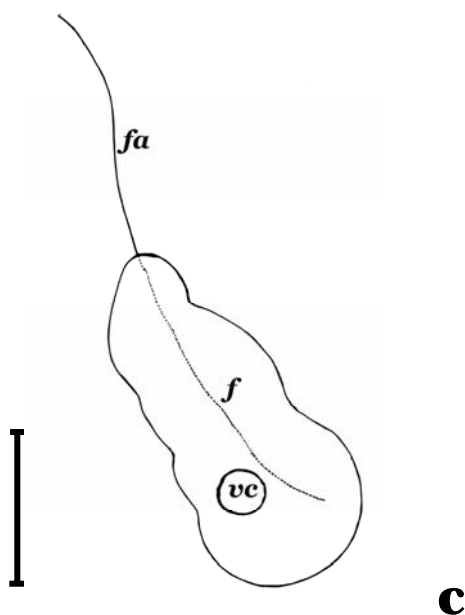
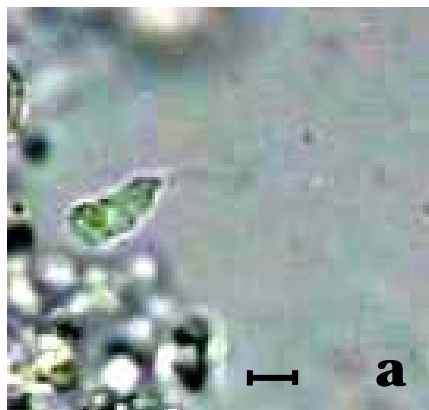


Figura 15. ***Peranema* sp.** **a**, Campo claro 40x, **b**, Contraste de fases 40x, **c**, esquema. *f*-flagelo, *fa*-flagelo anterior, *vc*-vacuola contráctil. Barra de referencia = 10 μm .

***Bodo* sp.**

Flagelado bodónido alargado. Midió entre 8.4 y 10 μm de longitud del cuerpo, cada flagelo midió alrededor de 14 μm . Tiene dos flagelos largos heterodinámicos, uno anterior (*fa*) y uno posterior (*fp*). Presenta una vacuola contráctil (*vc*) anterior y un cinetoplasto. Se presentó en todos los sustratos, encontrándose de manera abundante en cultivos de peptona, así como en algunos de chicharo, maíz y en las muestras originales de prácticamente todas las recolectas (Fig. 16).

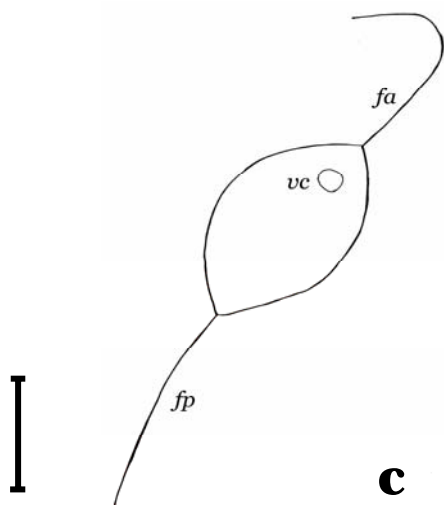


Figura 16. ***Bodo* sp.** a-b, DIC 40x, c, esquema. *fa*-flagelo anterior, *fp*-flagelo posterior, *vc*-vacuola contráctil. Barra de referencia =5 μm .

***Cercomonas* sp.**

Flagelado alargado con cuerpo muy flexible. Midió entre 16 y 17.6 μm de longitud (incluyendo la prolongación) por alrededor de 5.6 μm de anchura. Tiene dos flagelos de diferente longitud, el anterior (*fa*) es el más corto y sale de una prolongación del cuerpo (*pr*). El flagelo posterior (*fp*) es más largo y emerge de la región redondeada. Se presentó en las muestras de agua y guano, desarrollándose abundantemente en los cultivos de peptona (Fig. 17).

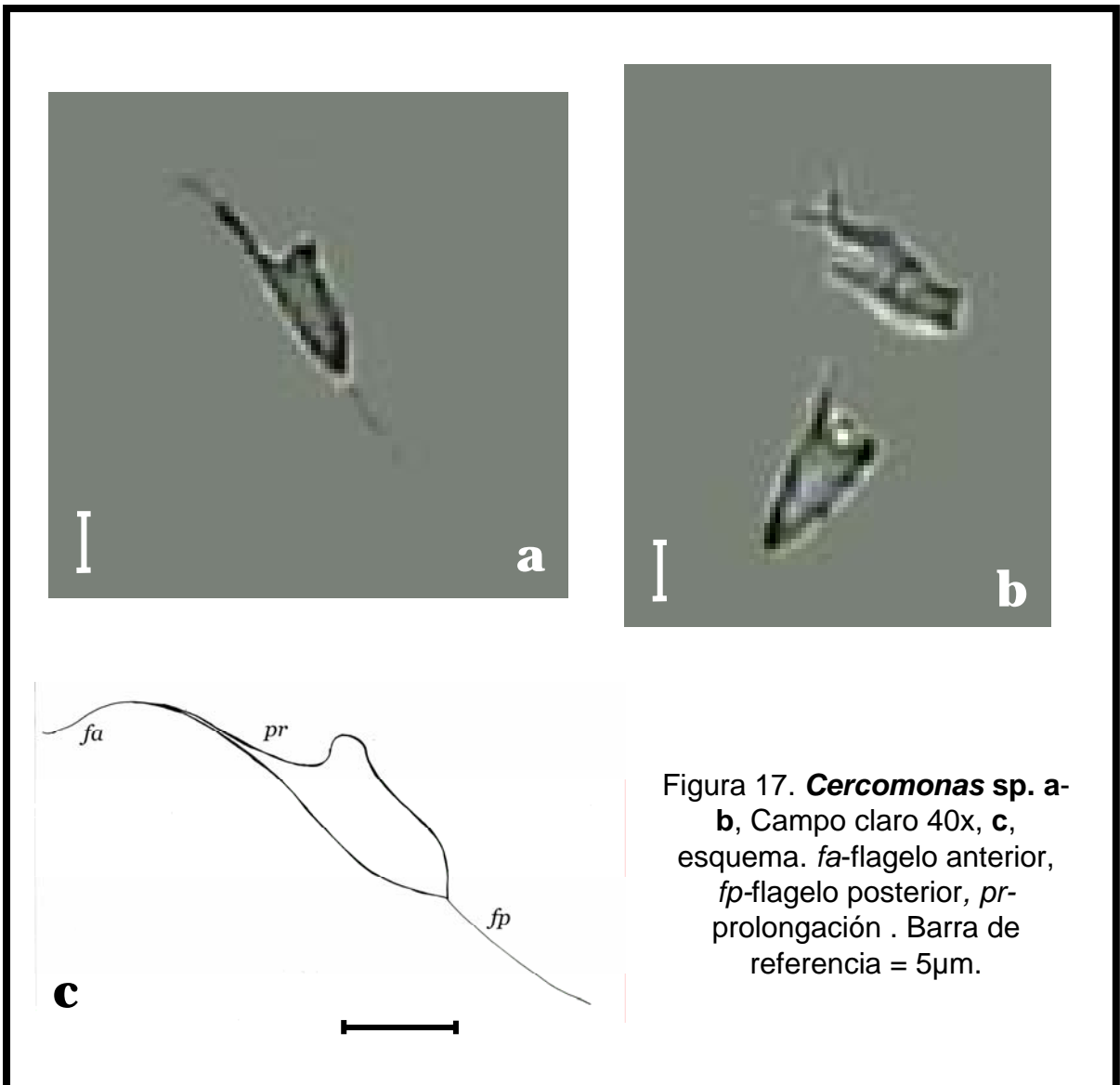
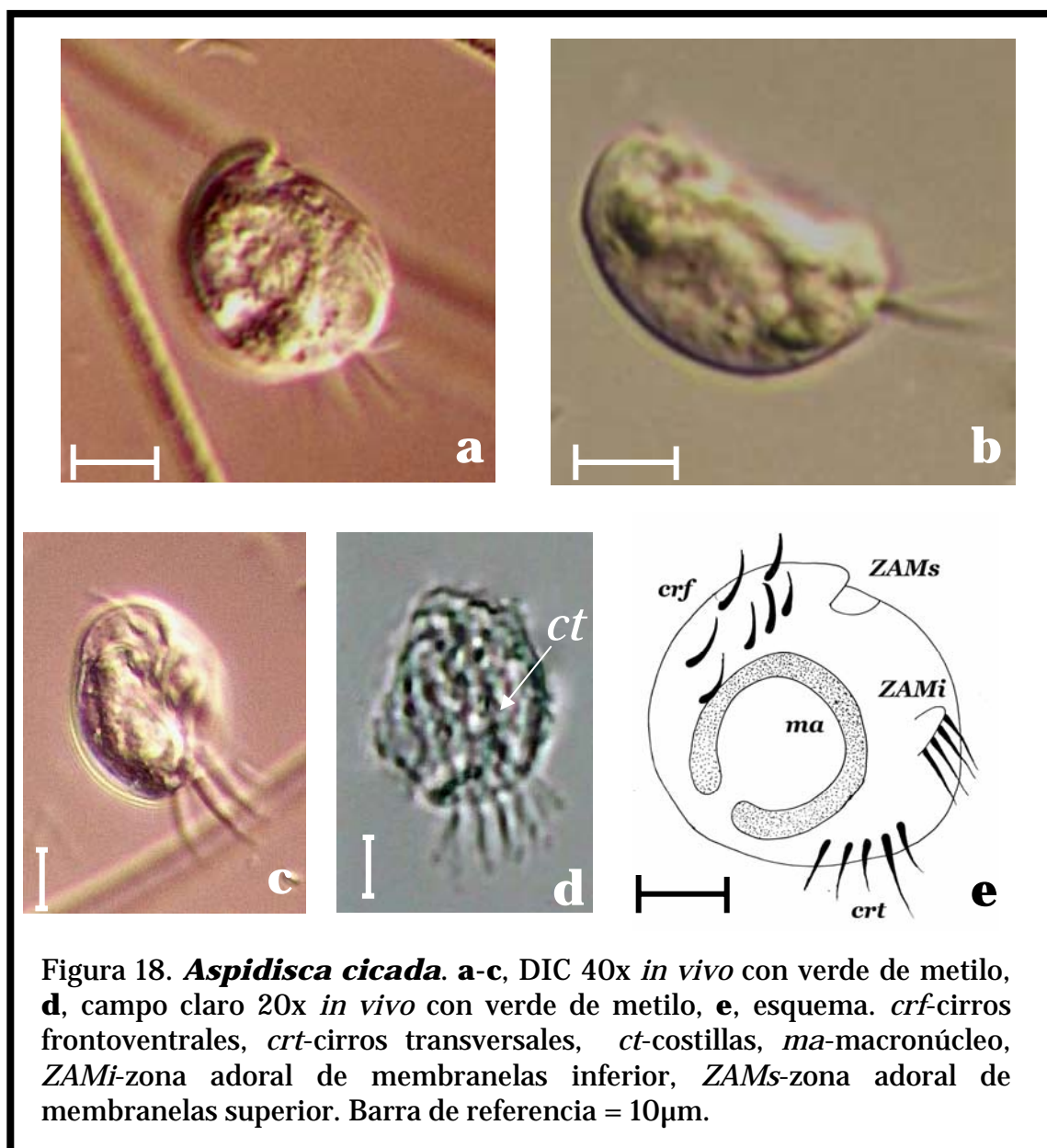


Figura 17. ***Cercomonas* sp.** a-
b, Campo claro 40x, c,
esquema. *fa*-flagelo anterior,
fp-flagelo posterior, *pr*-
prolongación . Barra de
referencia = 5 μm .

Aspidisca cicada

Ciliado hipotrico redondeado, midió entre 30 y 50 μm de longitud. Su zona adoral de membranelas está dividida en una parte superior (ZAMs) y una inferior (ZAMi). Presenta de 6 a 7 cirros frontoventrales (*crf*) en un arreglo tipo linceus y 5 cirros transversales (*crt*). No presenta espinas y tiene 5 costillas (*ct*), el macronúcleo (*ma*) tiene forma de "C" y es central. Sólo se observó en las muestras originales de musgo de las recolectas de abril de 2006 y marzo de 2007. Esta especie es un nuevo registro mundial en cuevas y también para México (Fig. 18).



***Euplotes* sp.**

Hipotrico de cuerpo ovoide, su superficie ventral es aplanada mientras que la dorsal es convexa. Midió entre 35.6 y 37 μm de longitud por 24.4 - 26 μm de anchura. Presenta una zona adoral de membranelas (ZAM) muy desarrollada que llega hasta tres cuartas partes del cuerpo. Tiene cirros frontoventrales, anales y caudales, cuyo patrón no se pudo distinguir y una vacuola contráctil posterior. El macronúcleo no fue observado. Sólo se registró en baja abundancia en la muestra original de suelo de la recolecta de junio de 2007 (Fig. 19).

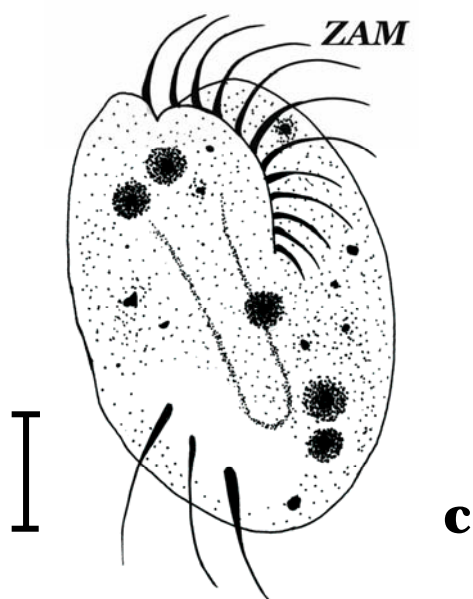


Figura 19. *Euplotes* sp. a-b. Campo claro **a**, 20x, **b**, 40x, **c**, esquema. ZAM-zona adoral de membranelas. Barra de referencia = 10 μm .

Oxytricha fallax

Hipotrico ovalado, midió entre 70 - 87 μm de longitud por 36.4 - 40.6 μm de anchura. La longitud de la ZAM abarcó entre 34.8 y 42 μm . La zona adoral de membranelas (ZAM) abarca casi hasta la mitad del cuerpo, presenta ocho cirros frontoventrales (*crf*) y cinco transversales (*crt*). Tiene algunos cirros aislados (*cr*) que recorren el cuerpo longitudinalmente por la mitad, formando una aparente hilera. Presenta dos hileras marginales de cirros (una izquierda (*hi*) y una derecha (*hd*)). Posee dos macronúcleos (*ma*) ovoides y laterales. Se le observaron numerosas vacuolas alimenticias (*va*) distribuidas en todo el cuerpo. Se presentó en las muestras de agua y musgo, creciendo bien en cultivos de agua adicionados con chícharo y peptona pero siendo más abundante en las muestras originales de musgo correspondiente a las recolectas de abril, junio y octubre de 2006 y marzo de 2007. Esta especie es un nuevo registro en cuevas a nivel mundial y para México (Fig. 20).



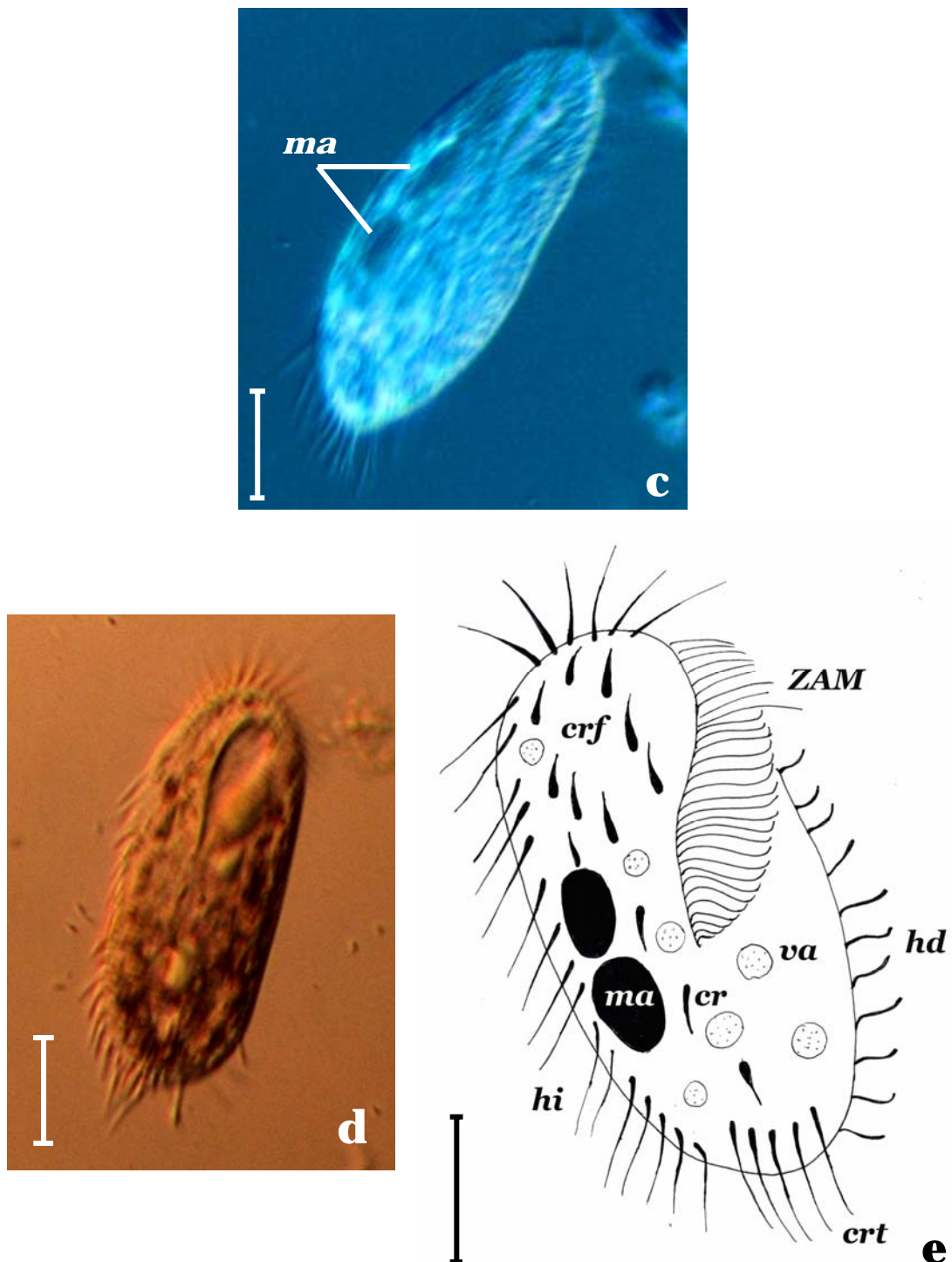


Figura 20. *Oxytricha fallax*. **a-b**, DIC 40x, **c**, DIC 20x, individuo en movimiento al cual se le observan los macronúcleos, **d**, DIC 20x, **e**, esquema. *cr*-cirros, *crf*-cirros frontoventrales, *crt*-cirros transversales, *hd*-hilera derecha de cirros, *hi*-hilera izquierda de cirros, *ma*-macronúcleos, *va*-vacuolas alimenticias, *ZAM*-zona adoral de membranelas. Barra de referencia = 20µm.

Pseudokeronopsis flavicans

Hipotrico ovalado, midió entre 61.2 y 84 μm de longitud por 21.6 - 28 μm de anchura. La longitud de la zona adoral de membranelas (ZAM) fue de alrededor de 25 μm y llega solo a un tercio del cuerpo. Tiene dos hileras de cirros marginales (una derecha (*hd*) y una izquierda (*hi*)), además de dos hileras medias (*hm*) que salen desde la ZAM y recorren el cuerpo en la zona media a todo lo largo y hasta la región posterior. Tiene cinco cirros transversales (*crt*) y no presenta cirros frontoventrales. Tiene una vacuola contráctil (*vc*) ubicada en la región media del cuerpo, cerca de la cual se encuentran sus dos macronúcleos (*ma*). Se presentó en las muestras de agua, suelo y musgo de las recolectas de abril, junio y octubre de 2006, siendo más abundante en cultivos de peptona, chícharo y en menor medida de paja. Es un registro nuevo en cuevas a nivel mundial y para México (Fig. 21).

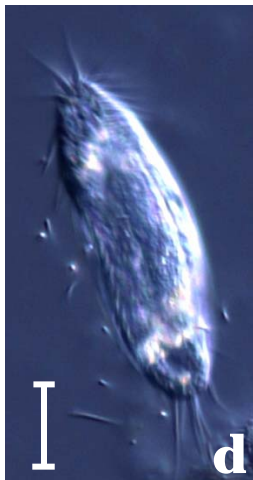
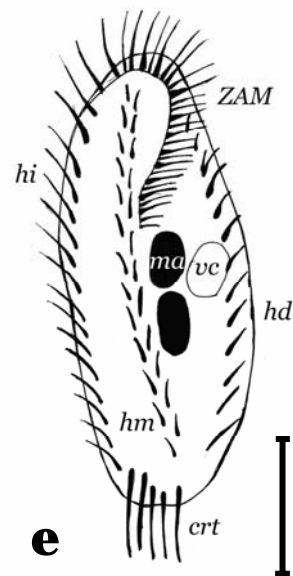
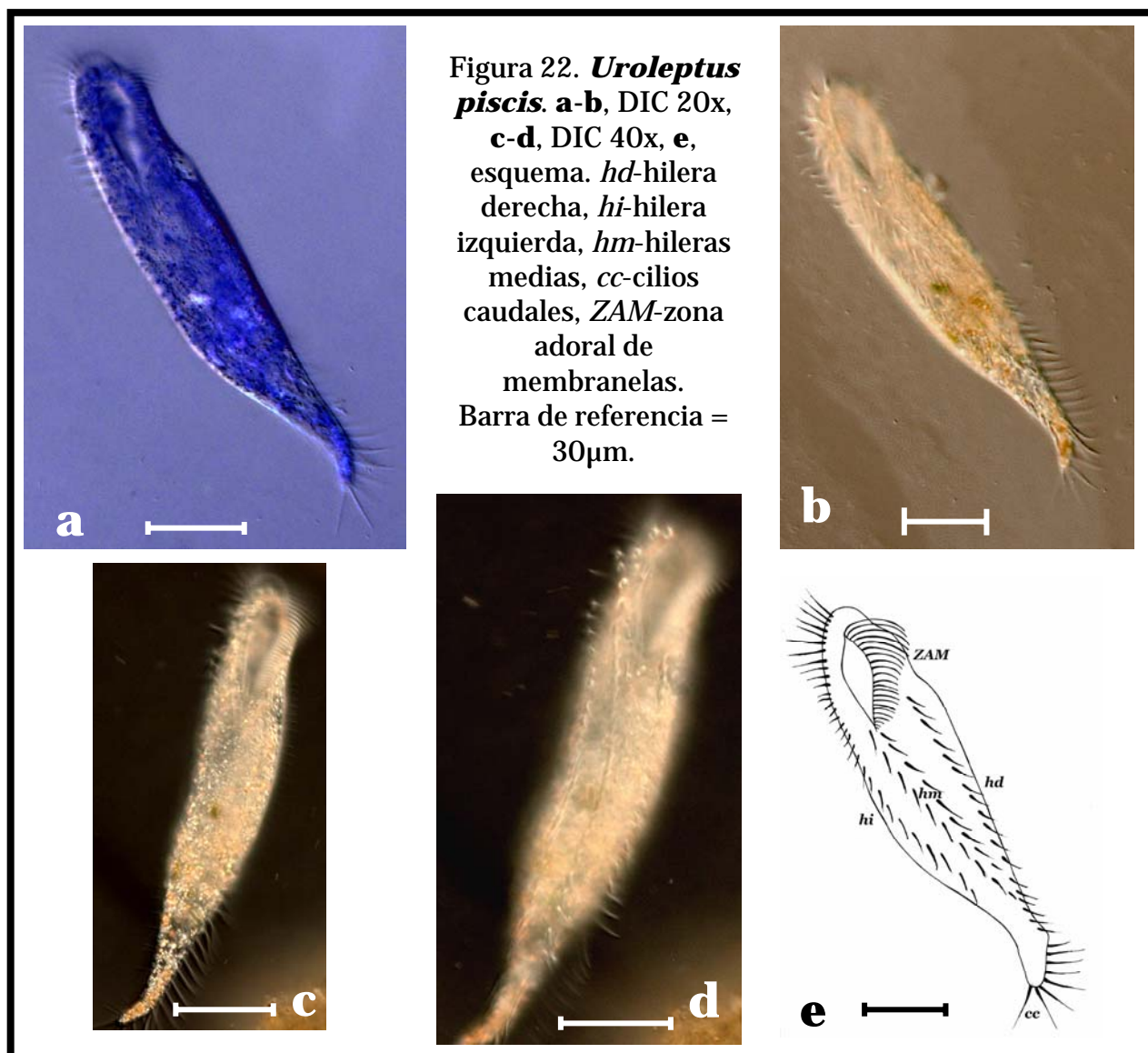


Figura 21. ***Pseudokeronopsis flavicans***. a-c, DIC 20x, d, DIC 40x, e, esquema. *crt*-cirros transversales, *hd*-hileras de cirros, *hi*-hileras de cirros, *hm*-hileras medias de cirros, *ma*-macronúcleos, *vc*-vacuola contráctil, ZAM-zona adoral de membranelas. Barra de referencia = 20 μm .



Uroleptus piscis

Este hipotrico es alargado, su anchura se reduce en la región posterior dando el aspecto de una cola, midió alrededor de 150 μm de longitud. En la región anterior presenta una zona adoral de membranelas (ZAM) que llega sólo hasta un tercio de la longitud del cuerpo. Presenta sus cirros acomodados formando dos hileras medias (*hm*) que cruzan de forma diagonal a todo lo largo del cuerpo, una hilera izquierda (*hi*) y una derecha (*hd*). Posee además dos cirros caudales (*cc*) muy característicos, un poco más largos que el resto. Se presentó tanto en las muestras de agua como de musgo, siendo en general poco abundante, registrándose en sólo un muestreo (el correspondiente a abril de 2006) y principalmente en la muestra original. Este es un registro nuevo para cuevas tanto a nivel mundial como para México (Fig. 22).



Litonotus fusidens

Este ciliado tiene su región anterior más angosta que la posterior, midió entre 70 y 98.6 μm de longitud por 33.6 - 34.8 μm en la región más ancha del cuerpo y alrededor de 8.4 μm de ancho en la región más adelgazada. La región bucal se ubica en la parte convexa, mismo lugar donde se encuentran los extrusomas (toxicistos). Presenta alrededor de 28 cinetias (*c*) paralelas, no oblicuas y se le observa una vacuola contráctil (*vc*) posterior. Tiene dos macronúcleos (*ma*) ubicados cerca de la región media del cuerpo. Se presentó en muestras de agua de la primer recolecta (noviembre 2005) en cultivos de chícharo y en la muestra original de musgo de la recolecta de marzo de 2007. Este registro es nuevo para cuevas a nivel mundial y para México (Fig. 23).

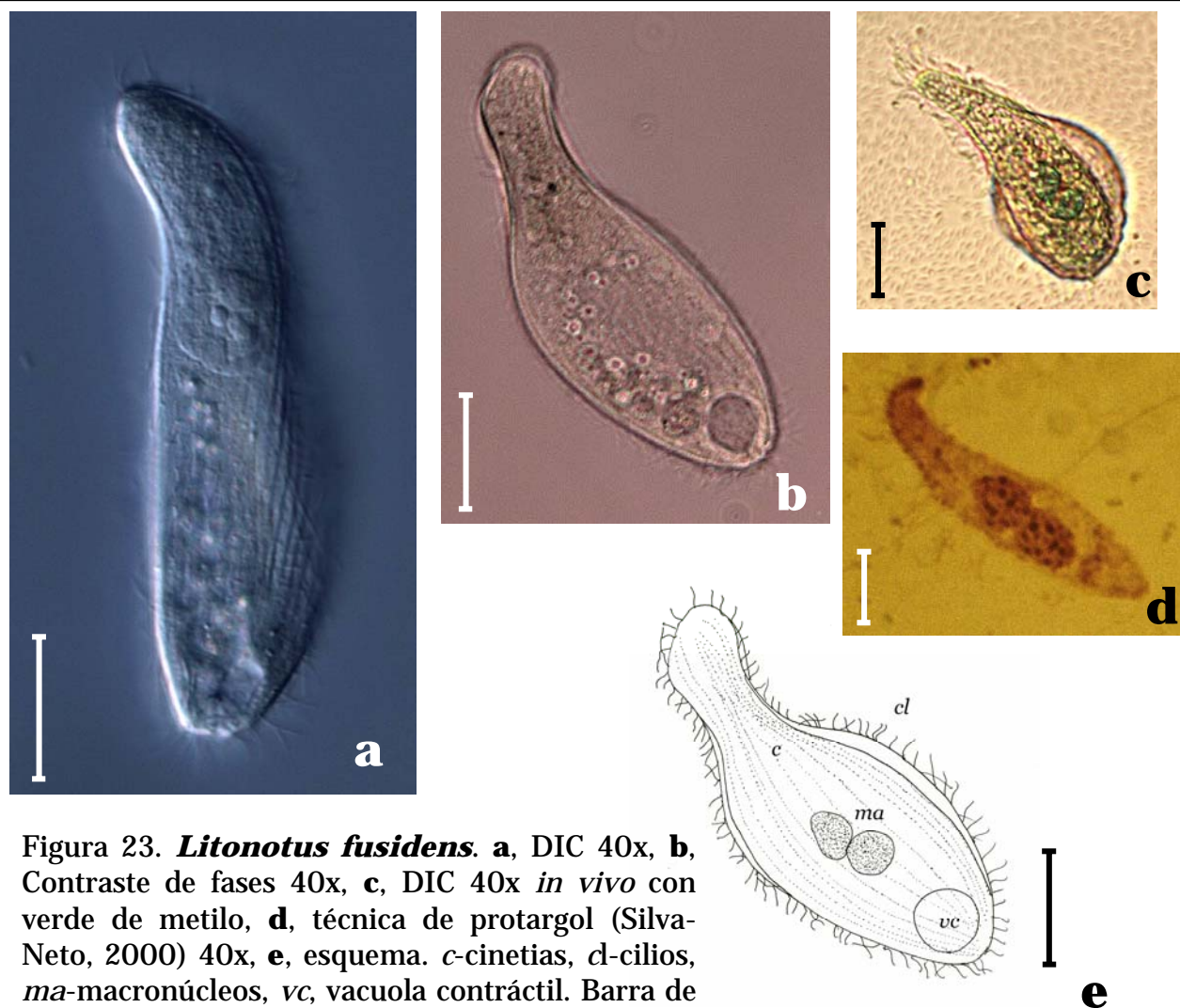


Figura 23. ***Litonotus fusidens***. **a**, DIC 40x, **b**, Contraste de fases 40x, **c**, DIC 40x *in vivo* con verde de metilo, **d**, técnica de protargol (Silva-Neto, 2000) 40x, **e**, esquema. *c*-cinetias, *cl*-cilios, *ma*-macronúcleos, *vc*, vacuola contráctil. Barra de referencia = 20 μm .

Spathidium lionotiforme

Ciliado alargado con la región anterior formando un cuello, midió entre 80 y 100 μm de longitud. El citostoma (*cs*) es ancho. Presenta en el cuello un borde ancho que contiene extrusomas. Posee una vacuola contráctil (*vc*) posterior y un macronúcleo (*ma*) alargado ubicado cerca de la región del cuello. Fue muy escaso en la muestra original de musgo de la recolecta de marzo de 2007, única en la que se registró. Este registro es nuevo para cuevas a nivel mundial y en México (Fig. 24).

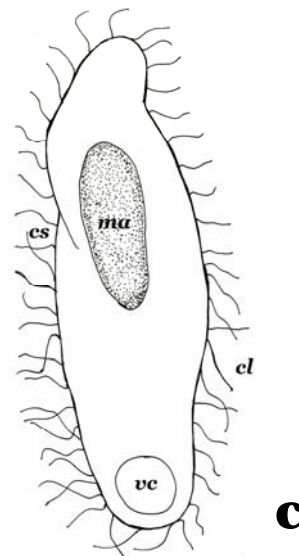
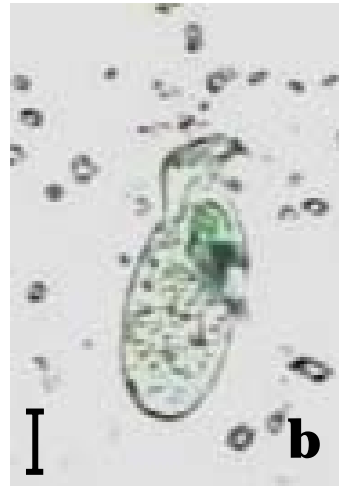
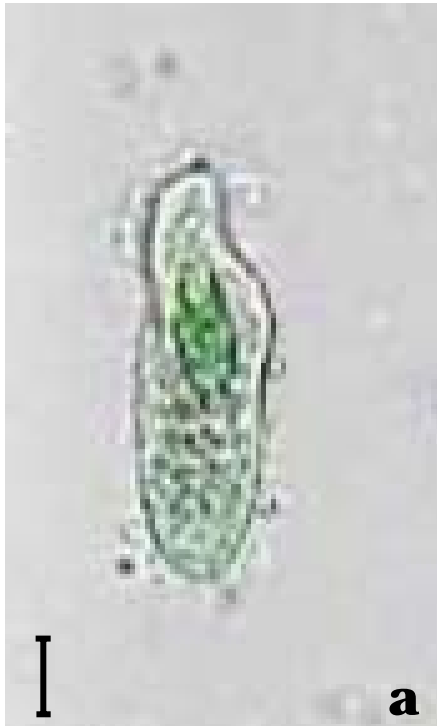


Figura 24. ***Spathidium lionotiforme***. a-
b, Campo claro 20x *in vivo* con verde de
metilo, c, esquema. *cl*-cilios, *cs*-citostoma,
ma-macronúcleo, *vc*-vacuola contráctil.
Barra de referencia = 20 μm .

Leptopharynx costatus

Este ciliado es alargado y presenta tres proyecciones (*py*) ventrales anteriores, midió alrededor de 30 μm de longitud. El citostoma (*cs*) se encuentra cerca de la región media, presenta una vacuola contráctil (*vc*) en el tercio posterior del cuerpo. No se le observó el macronúcleo. Se registró sólo en un cultivo de arroz correspondiente a una muestra de suelo de la recolecta de marzo de 2007. Esta especie es un nuevo registro para cuevas en el mundo y para México (Fig. 25).

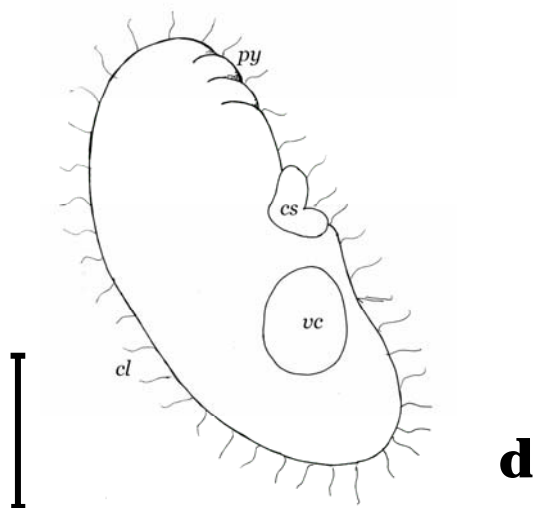


Figura 25. ***Leptopharynx costatus***. **a-c**, Campo claro 40x, **d**, esquema. *cl*-cilios, *py*-proyecciones, *cs*-citostoma, *vc*-vacuola contráctil. Barra de referencia= 10 μm .

Drepanomonas revoluta

Este ciliado es ovalado y midió entre 16.8 y 22.4 μm de largo por 11.2 μm de ancho. Presenta en la región anterior cuatro indentaciones (*in*) ventrales, ubicadas en la parte cóncava del cuerpo. Posee un canal (*ca*) que recorre el cuerpo a lo largo, desde la región anterior hasta tres cuartas partes del cuerpo. El citostoma (*cs*) se encuentra en la región media del cuerpo al lado del cual se pueden presentar una o dos vacuolas contráctiles (*vc*). El macronúcleo (*ma*) es ovoide y central. Se presentó en cultivos de chícharo correspondientes a muestras de agua de las recolectas de noviembre de 2005 y junio de 2006, así como en muestras originales de musgo de las recolectas de abril y junio de 2006. Es un nuevo registro para cuevas a nivel mundial y en México (Fig. 26).

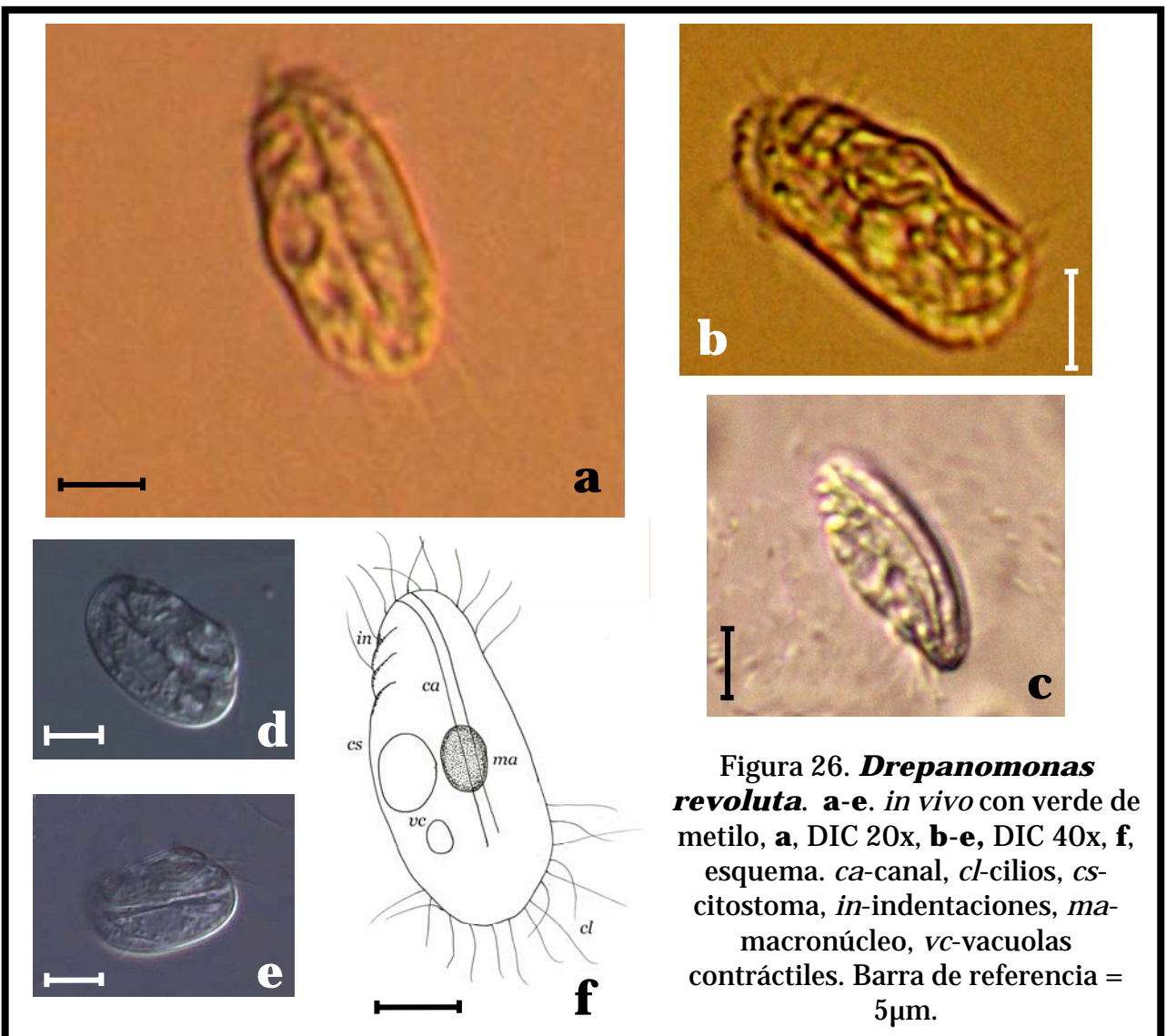


Figura 26. ***Drepanomonas revoluta***. **a-e**. *in vivo* con verde de metilo, **a**, DIC 20x, **b-e**, DIC 40x, **f**, esquema. *ca*-canal, *cl*-cilios, *cs*-citostoma, *in*-indentaciones, *ma*-macronúcleo, *vc*-vacuolas contráctiles. Barra de referencia = 5 μm .

Colpoda aspera

Ciliado reniforme, midió entre 20.9 y 32 μm de longitud por 10 - 19 μm de anchura. Presenta alrededor de 15 cinetias (*c*), la indentación (*in*), con cinco dientes, se encuentra en la región anterior y abarca cerca de un tercio del largo del cuerpo. Presenta una vacuola contráctil (*vc*) posterior y un macronúcleo (*ma*) ovoide cercano al citostoma (*cs*) que se encuentra en una invaginación lateral ubicada en la región media. Tiene vacuolas alimenticias (*va*) distribuidas en todo el cuerpo. Se encontró en todos los sustratos de todas las recolectas, desarrollándose mejor en los cultivos con infusiones de chícharo, medio RPMI 1640 y Chalkley. Es un registro nuevo en cuevas a nivel mundial y para México (Fig. 27).

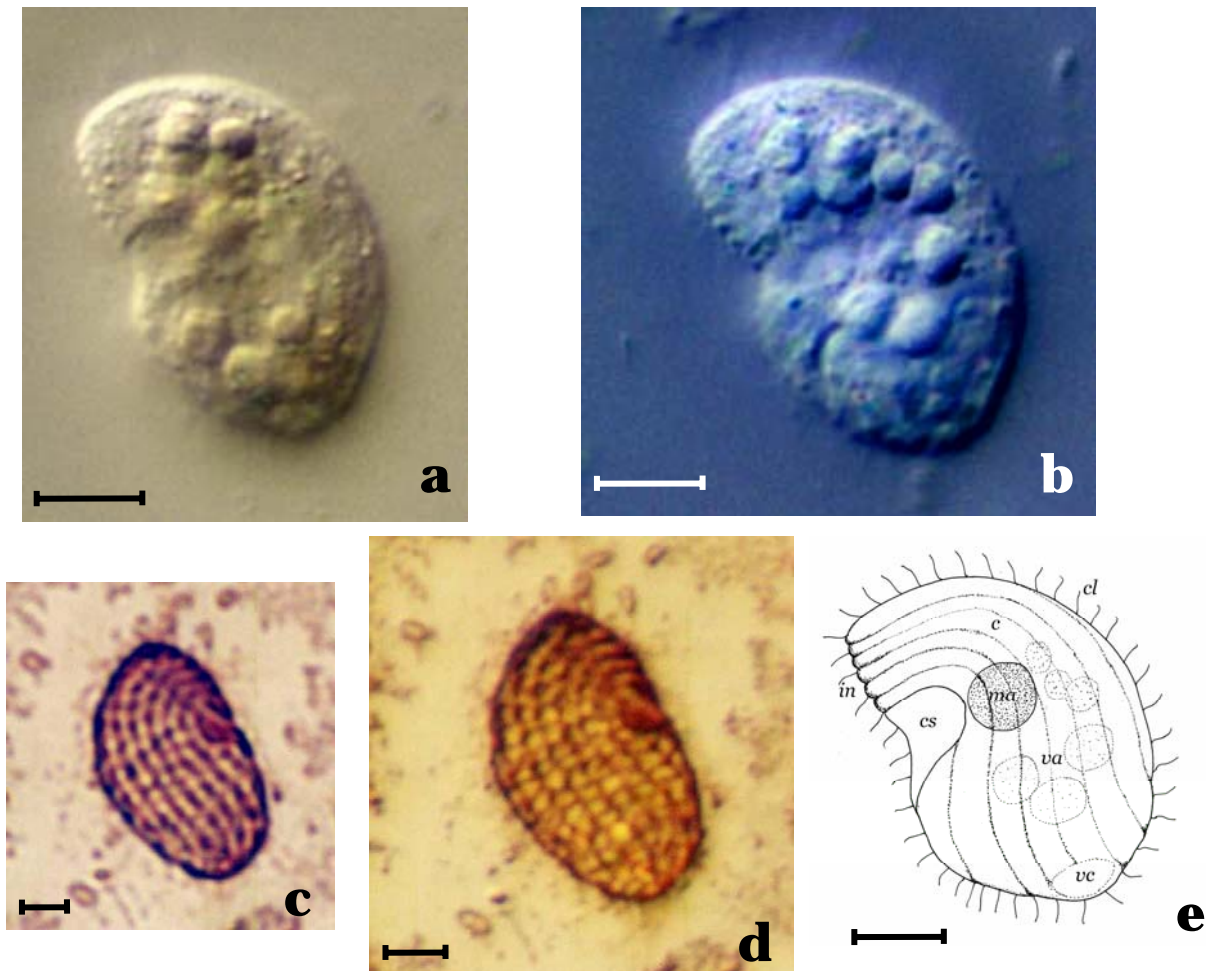
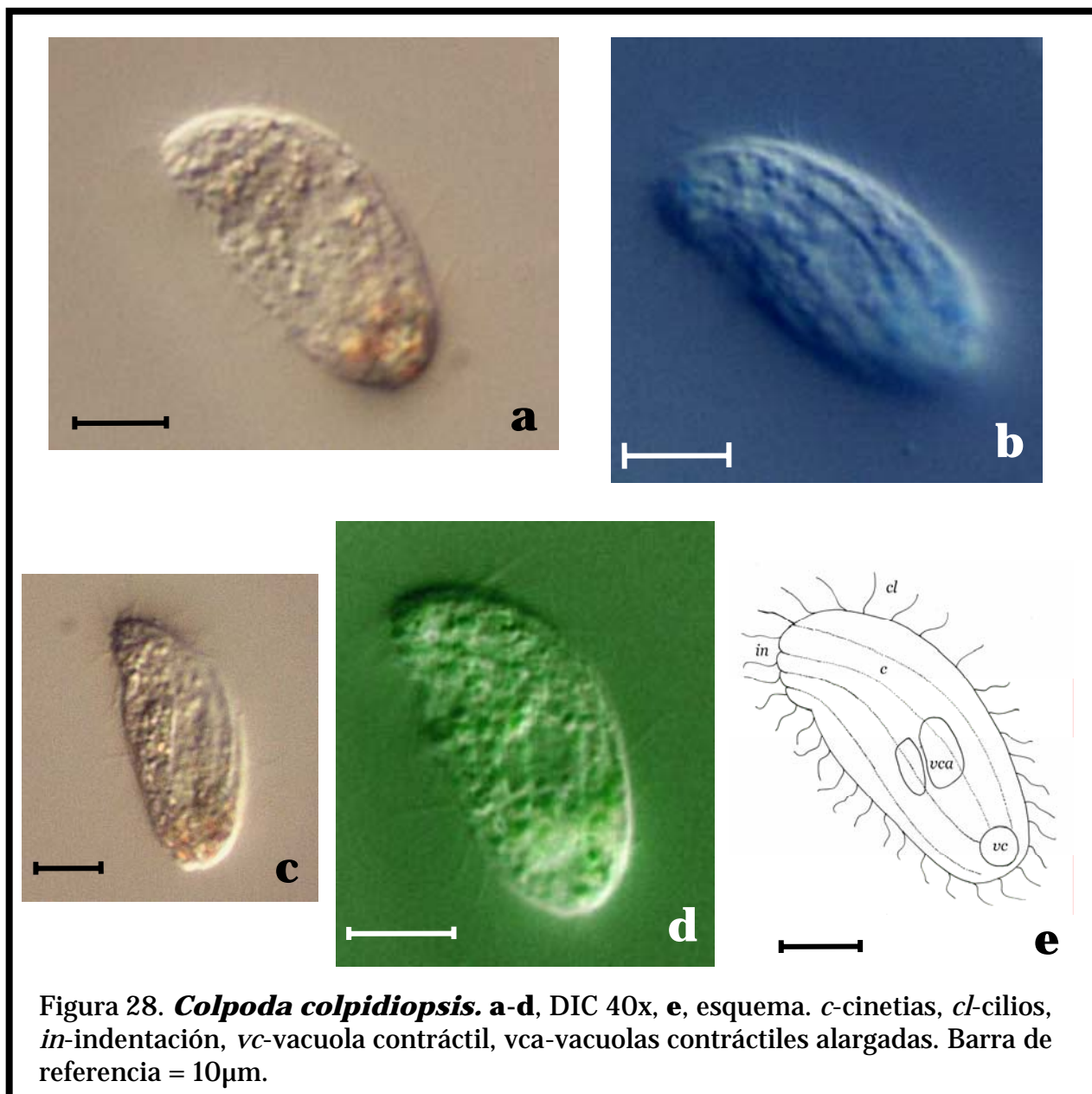


Figura 27. ***Colpoda aspera***. **a-b**, DIC 40x, **c**, Contraste de fases 40x técnica de protargol (Silva-Neto, 2000) destacando el número de cinetias, **d**, Campo claro 40x técnica de protargol (Silva-Neto, 2000) destacando el sistema argentófilo de infraciliatura, **e**, esquema. *c*-cinetias, *cl*-cilios, *cs*-citostoma, *ma*-macronúcleo, *in*-indentación, *va*-vacuolas alimenticias, *vc*-vacuola contráctil. Barra de referencia = 5 μm .

Colpoda colpidiopsis

Este ciliado es más alargado que *C. aspera*, midió alrededor de 36 μm de longitud por 21.6 μm de anchura, la longitud de la indentación (*in*) fue de 10.8 μm . Posee alrededor de 14 cinetias (*c*) con cilios (*cl*) largos. Su indentación abarca sólo una pequeña zona de la región anterior, con cinco dientes. Presenta una vacuola contráctil (*vc*) ovoide posterior y vacuolas contráctiles alargadas (*vca*) en el resto del cuerpo. Sólo se registró su presencia en un cultivo de paja de la muestra de suelo de la recolecta de marzo de 2007. Es un nuevo registro en cuevas a nivel mundial y para México (Fig. 28).



Colpoda eucaudata

Ciliado redondeado, de las cuatro especies de este género registradas fue la más pequeña, midió entre 14 y 15 μm de longitud por 10 - 12 μm de anchura. Tiene alrededor de 17 cinetias (*c*) con cilios (*cl*) largos. Presenta su citostoma (*cs*) en un vestíbulo relativamente largo pero poco profundo, casi a la mitad del cuerpo, de donde sale una membrana (*me*) formada por un conjunto de numerosos cilios. La indentación (*in*) ocupa casi la mitad del cuerpo y tiene alrededor de 6 dientes. Presenta un macronúcleo (*ma*) ovoide que ocupa un área de cerca de un cuarto con respecto al área total del cuerpo y se encuentra cerca del citostoma. Posee una vacuola contráctil (*vc*) posterior. Se presentó en cultivos de chícharo y paja de las muestras de agua de la primera recolecta y la de octubre de 2006 y en cultivos de paja y maíz de musgo de las recolectas de abril y junio de 2006. En general fue poco abundante. Es un registro nuevo en cuevas para México y para el mundo (Fig. 29).

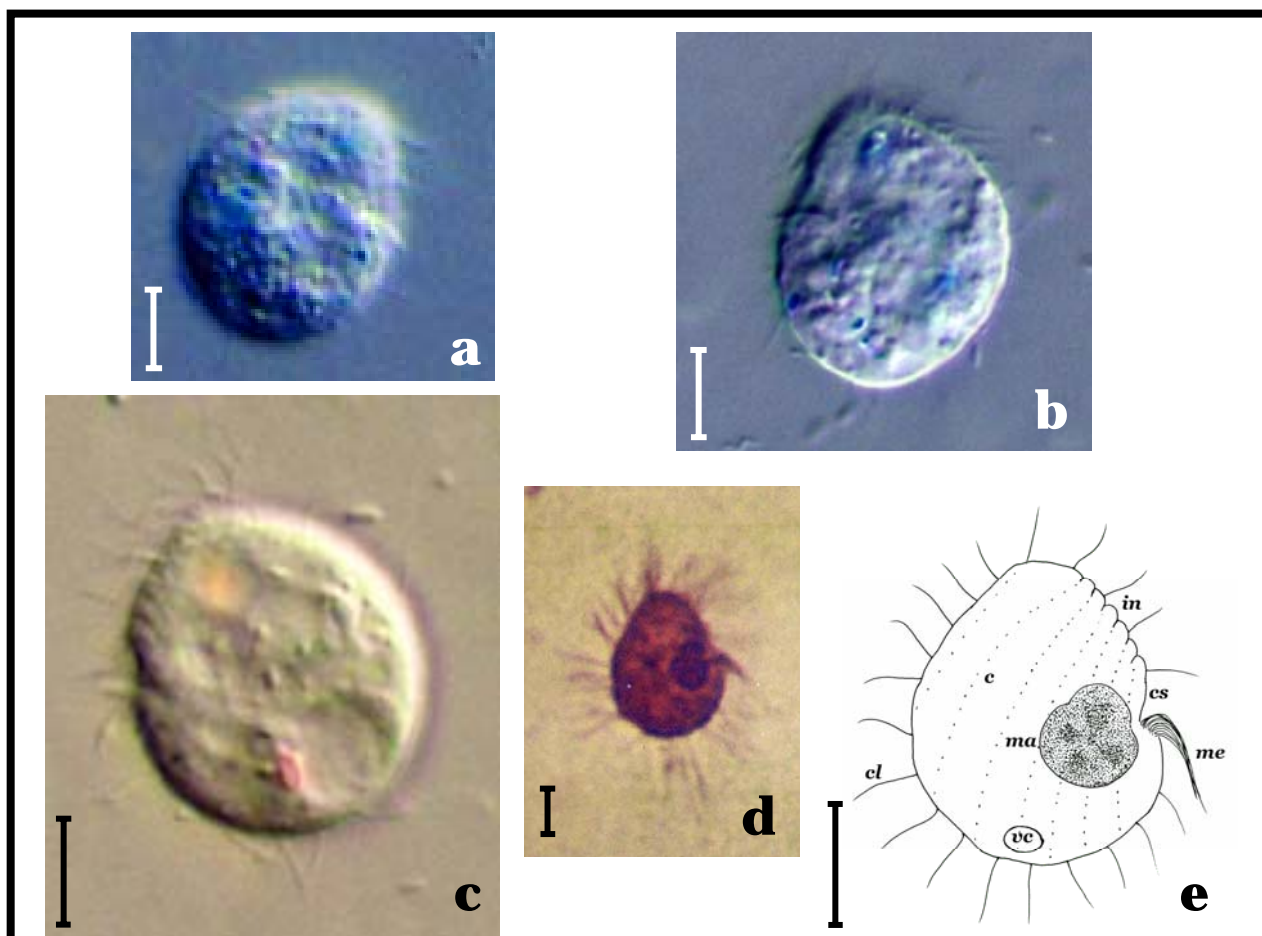


Figura 29. ***Colpoda eucaudata***. **a**, DIC 20x, **b-c**, DIC 40x **d**, técnica de protargol (Silva-Neto, 2000) destacando los cilios y el macronúcleo 40x, **e**, esquema. *c*-cinetias, *cl*-cilios, *cs*-citostoma, *in*-indentación, *ma*-macronúcleo, *me*-membrana, *vc*-vacuola contráctil. Barra de referencia = 5 μm .

Colpoda inflata

Ciliado reniforme, midió entre 33.6 y 42 μm de longitud por 28 - 33.6 μm de anchura. Presenta alrededor de 24 cinetias (*c*). El vestíbulo donde se encuentra el citostoma (*cs*) es ancho. Tiene ocho dientes y el área de la indentación (*in*) abarca casi la mitad del cuerpo. El macronúcleo (*ma*) es ovoide y se encuentra cerca de la región media del cuerpo. Presenta una vacuola contráctil (*vc*) posterior y vacuolas alimenticias (*va*) en todo el cuerpo. Se presentó en cultivos de chícharo de las muestras de agua de la primera recolecta de junio de 2007, en la muestra original de suelo de la recolecta de junio de 2007 y en mayor abundancia en los cultivos de maíz de musgo de las recolectas de abril y junio de 2007. Esta especie es un nuevo registro en cuevas a nivel mundial y para México (Fig. 30).

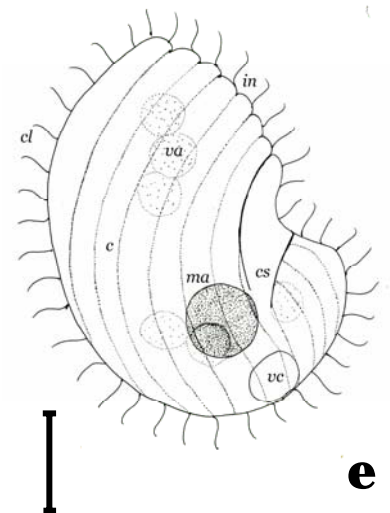


Figura 30. ***Colpoda inflata***. **a-c**, DIC 40x, **d**, técnica de nitrato de plata destacando el sistema argentófilo de infraciliatura 40x, **e**, esquema. *c*-cinetias, *cl*-cilios, *cs*-citostoma, *in*-indentación, *ma*-macronúcleo, *va*-vacuolas alimenticias, *vc*-vacuola contráctil. Barra de referencia = 10 μm .

Coleps hirtus

Este ciliado tiene forma de barril, midió entre 39 y 40 μm de longitud por 28 - 30 μm de anchura. El cuerpo presenta placas peliculares (*pp*) arregladas en dos grupos. En su borde anterior tiene pequeñas protuberancias, cilios (*cl*) y el citostoma (*cs*), mientras que en el borde posterior tiene cuatro espinas (*e*) y un cilio caudal (*cc*). Presenta cilios y proyecciones largas laterales (*pl*). En la región media del cuerpo presenta una vacuola contráctil (*vc*) subecuatorial y el macronúcleo (*ma*) ovoide que está supraecuatorial. Sólo se registró en la muestra original de musgo de la recolecta de abril de 2006 en baja abundancia. Esta especie ha sido registrada en México, en una muestra de agua de Cueva Chica, San Luis Potosí. En cuevas a nivel mundial no hay registros previos (Fig. 31).

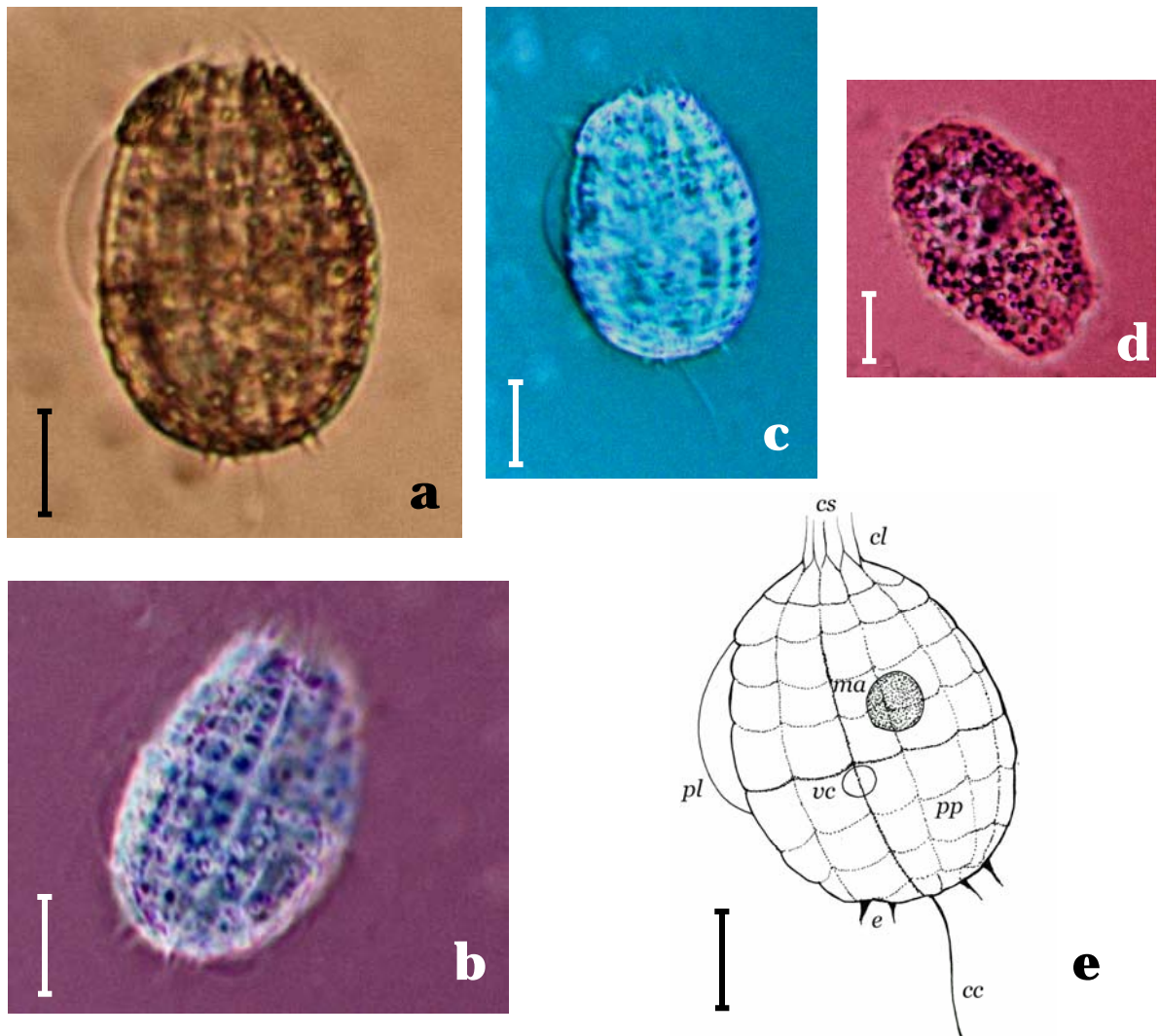
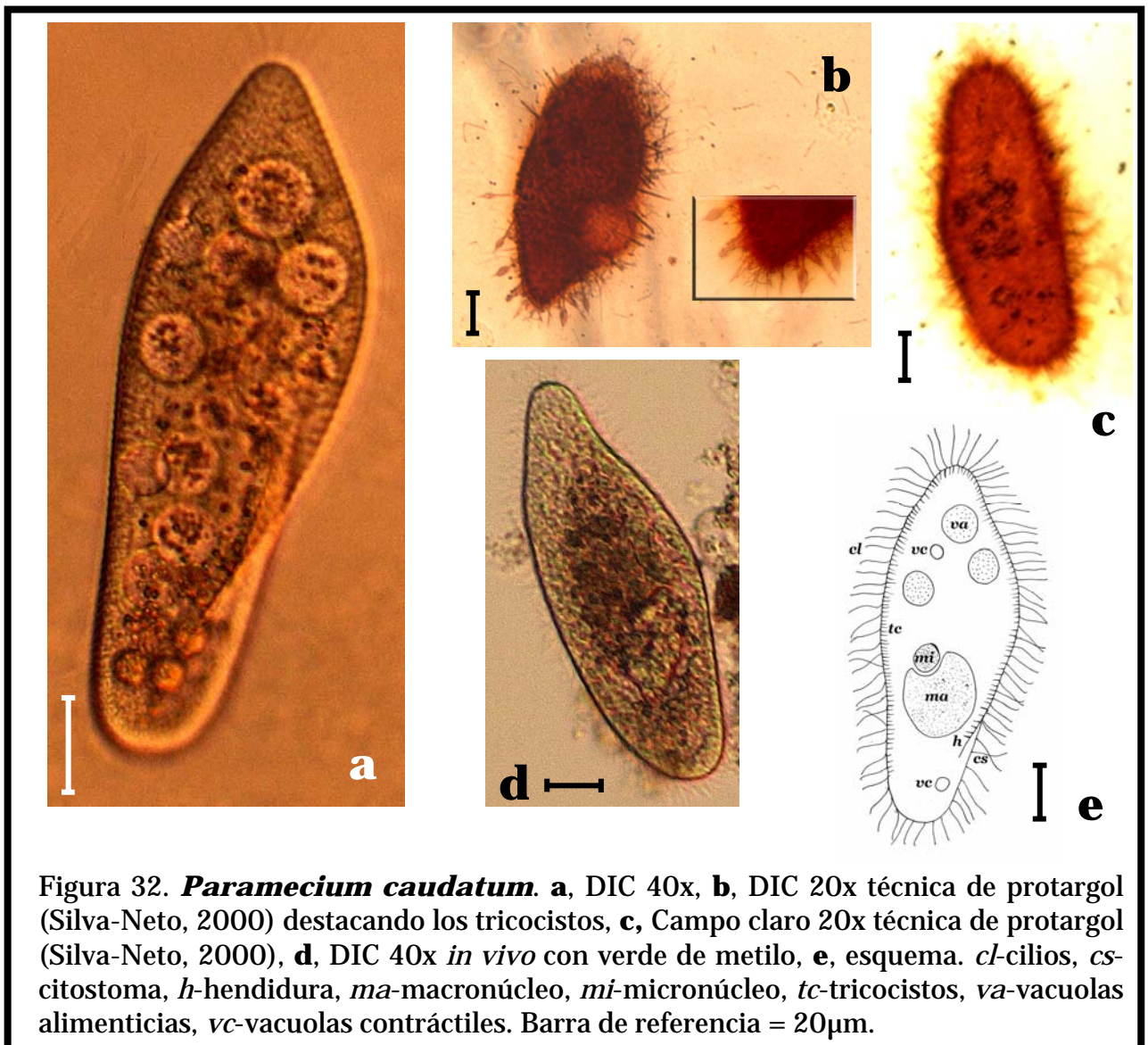


Figura 31. ***Coleps hirtus***. a-c, DIC 40x, d, DIC 40x *in vivo* con verde de metilo, e, esquema. cc-cilio caudal, cl-cilios, cs-citostoma, e-espinas, ma-macronúcleo, pl-proyección lateral, pp-placas peliculares, vc-vacuola contráctil. Barra de referencia = 10 μm .

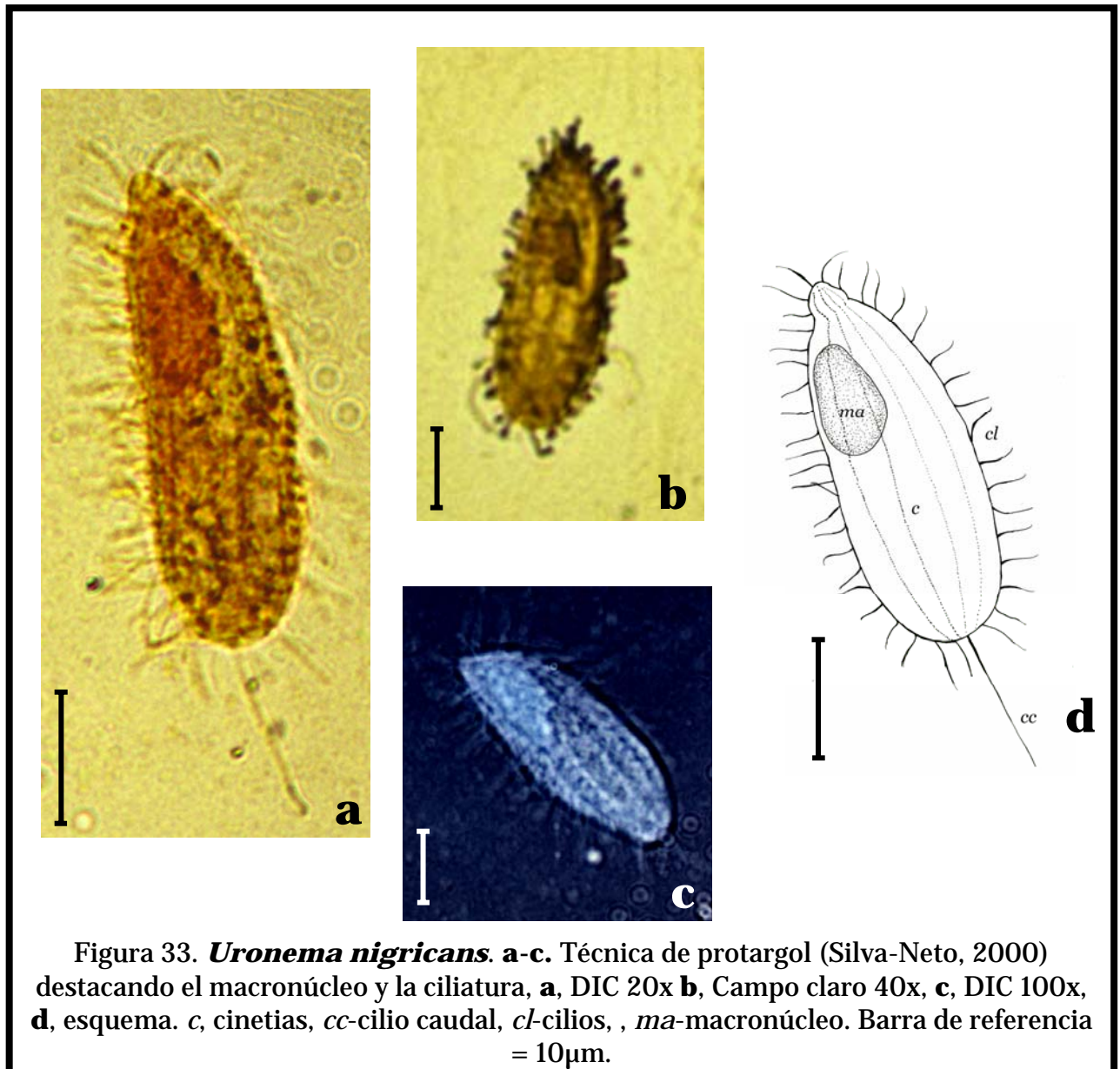
Paramecium caudatum

Ciliado alargado con forma de suela de zapato, midió entre 123.3 y 200.6 μm de longitud por 33.6 a 59 μm de anchura. Posee una hendidura (*h*) larga. Tiene ciliatura uniforme, el citostoma (*cs*) se encuentra en la región media. Presenta tricocistos (*tc*) alrededor de todo el cuerpo. Presenta dos vacuolas contráctiles (*vc*) y diversas vacuolas alimenticias (*va*) distribuidas en todo el cuerpo, tiene un macronúcleo (*ma*) redondo y grande casi englobando a un pequeño micronúcleo (*mi*). Sólo se registró en baja abundancia en la muestra original de musgo de la recolecta de marzo de 2007. Este es un nuevo registro para México, a nivel mundial ya ha sido registrada en cuevas (Fig. 32).



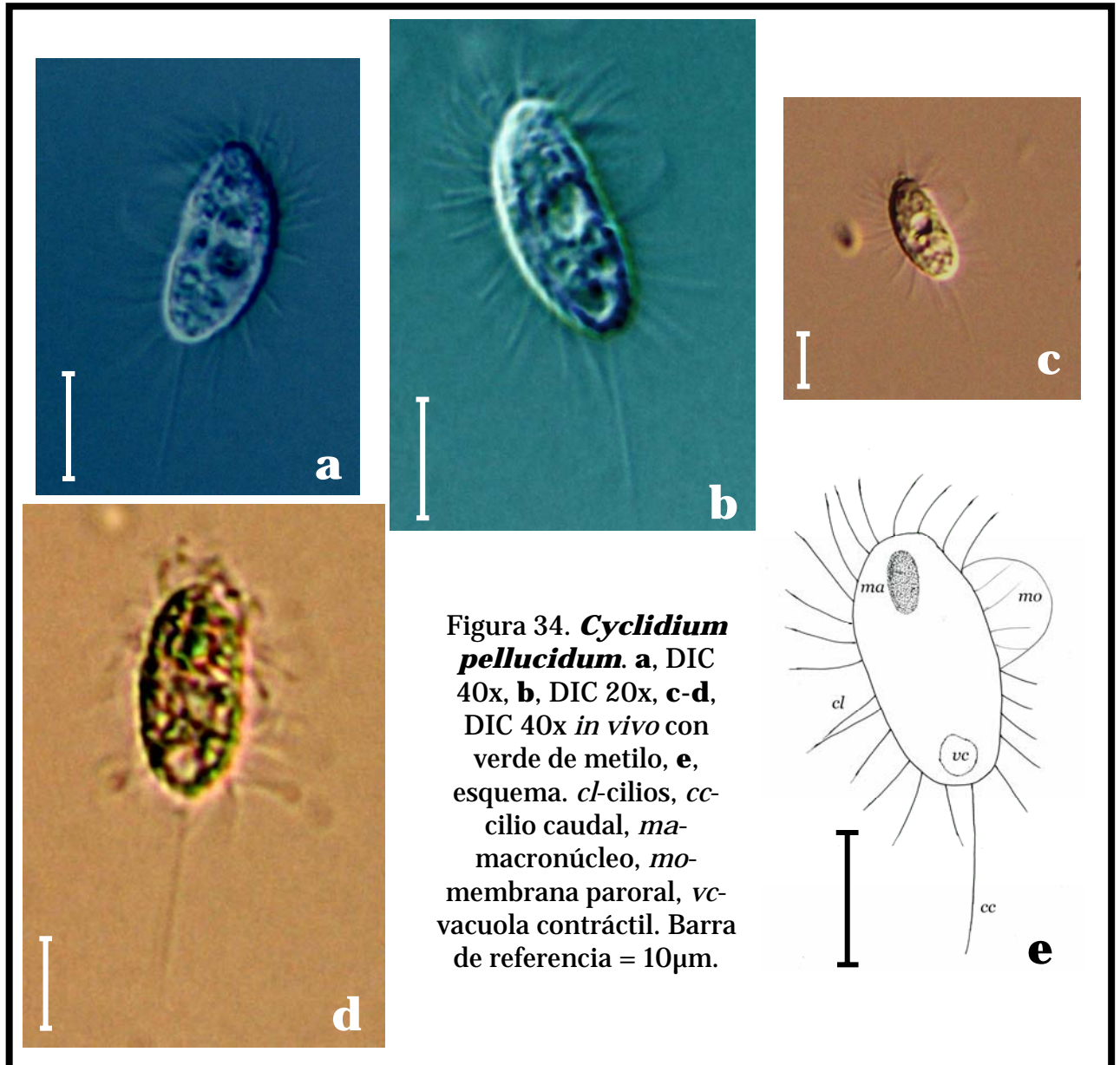
Uronema nigricans

Ciliado ovoide alargado, midió entre 30.8 y 42 μm de longitud y 11.2 - 14 μm de anchura, la longitud del cilio caudal fue de 14 μm . Tiene alrededor de 10 cinetias (*c*). Se encuentra truncado en la región anterior, formando un pequeño “chipote” desprovisto de cilios, en el resto del cuerpo presenta cilios (*cl*) largos uniformes y un cilio caudal (*cc*) en la región posterior. El macronúcleo (*ma*) es alargado y está ubicado en la región anterior del cuerpo. Posee una membrana ondulante que es difícil observar debido a su tamaño. Sólo se encontró en un cultivo de chícharo de la muestra de guano de la recolecta de marzo de 2007. Es un nuevo registro en cuevas a nivel mundial y para México (Fig. 33).



Cyclidium pellucidum

Ciliado ovoide con la región anterior truncada, midió entre 16.8 y 22.4 μm de longitud por 8.4 - 11.2 μm de anchura, la longitud del cilio caudal fue de 11 - 15.4 μm . Tiene alrededor de 11 cinetias con cilios (*cl*) largos repartidos uniformemente en todo el cuerpo a excepción de la región truncada. Presenta un cilio caudal (*cc*) muy largo. Posee una membrana paroral (*mo*) que abarca poco más de la mitad del cuerpo. El macronúcleo (*ma*) es ovoide y se encuentra en la región anterior. Tiene una vacuola contráctil (*vc*) posterior. Se presentó en la muestra original de agua de la recolecta de junio de 2007 y en las muestras originales de musgo de las recolectas de abril y junio de 2006 y marzo de 2007. Es un nuevo registro en cuevas a nivel mundial y en México (Fig. 34).



Tetrahymena pyriformis

Ciliado piriforme, midió entre 28 y 40 μm de longitud y 16.8 - 28 μm de anchura, la membrana paroral midió de 8.4 - 11.6 μm de longitud por 2.6 - 5.6 μm de anchura. Posee alrededor de 14 cinetias (*c*). El citostoma (*cs*) se encuentra en la región anterior, es pequeño y tiene una membrana paroral (*mo*) y tres membranelas (*mm*). El macronúcleo (*ma*) es ovoide y central. Presenta una o varias vacuolas contráctiles (*vc*) posteriores y vacuolas alimenticias (*va*) repartidas en el cuerpo. Se encontró en cultivos de chícharo y medio RPMI de agua de las recolectas de octubre de 2006 y junio de 2007, en cultivos de chícharo de guano de la recolecta de marzo de 2007 y en un cultivo de chícharo de musgo de junio de 2007. Es un registro nuevo en cuevas para México y el mundo (Fig. 35).

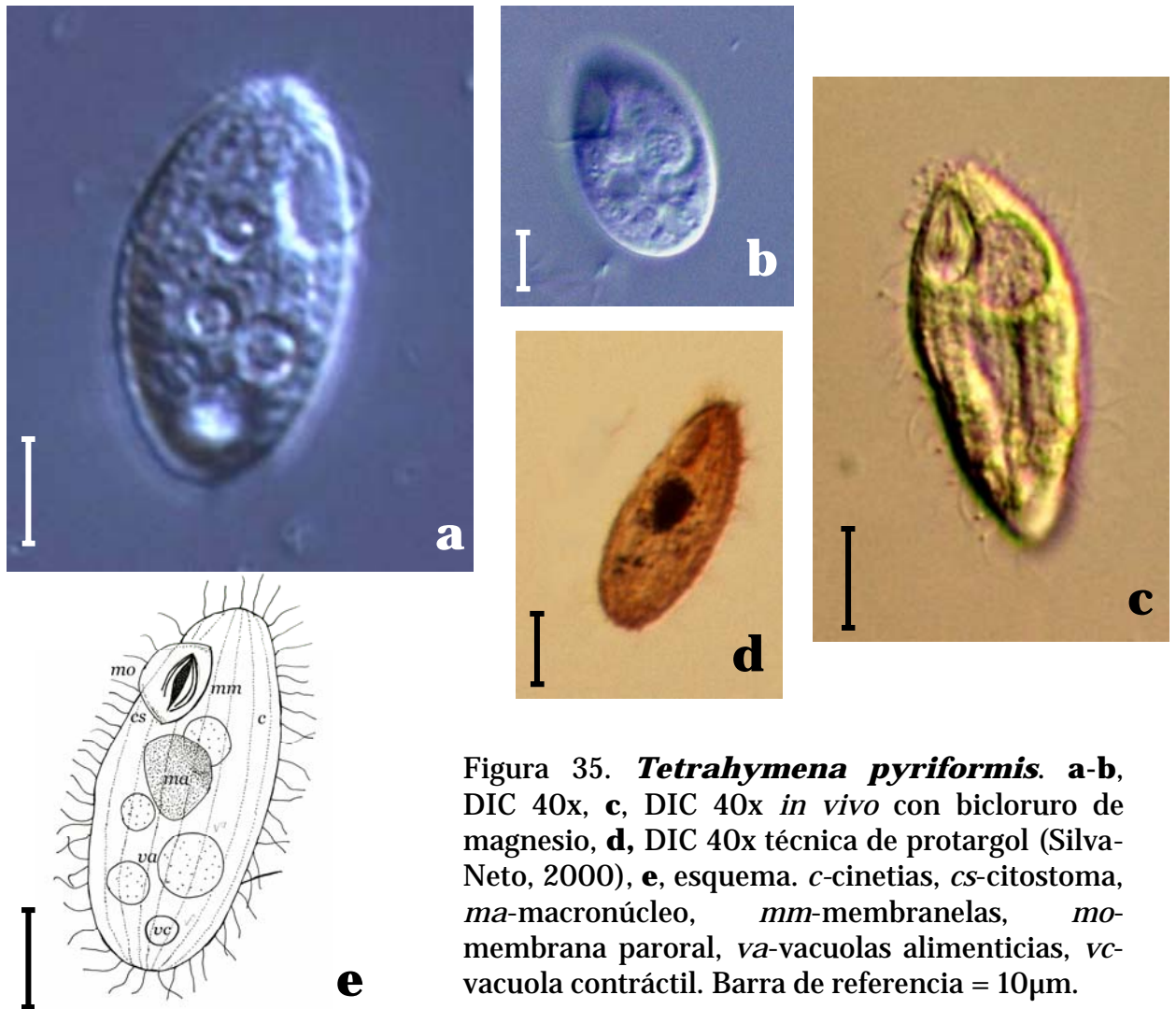
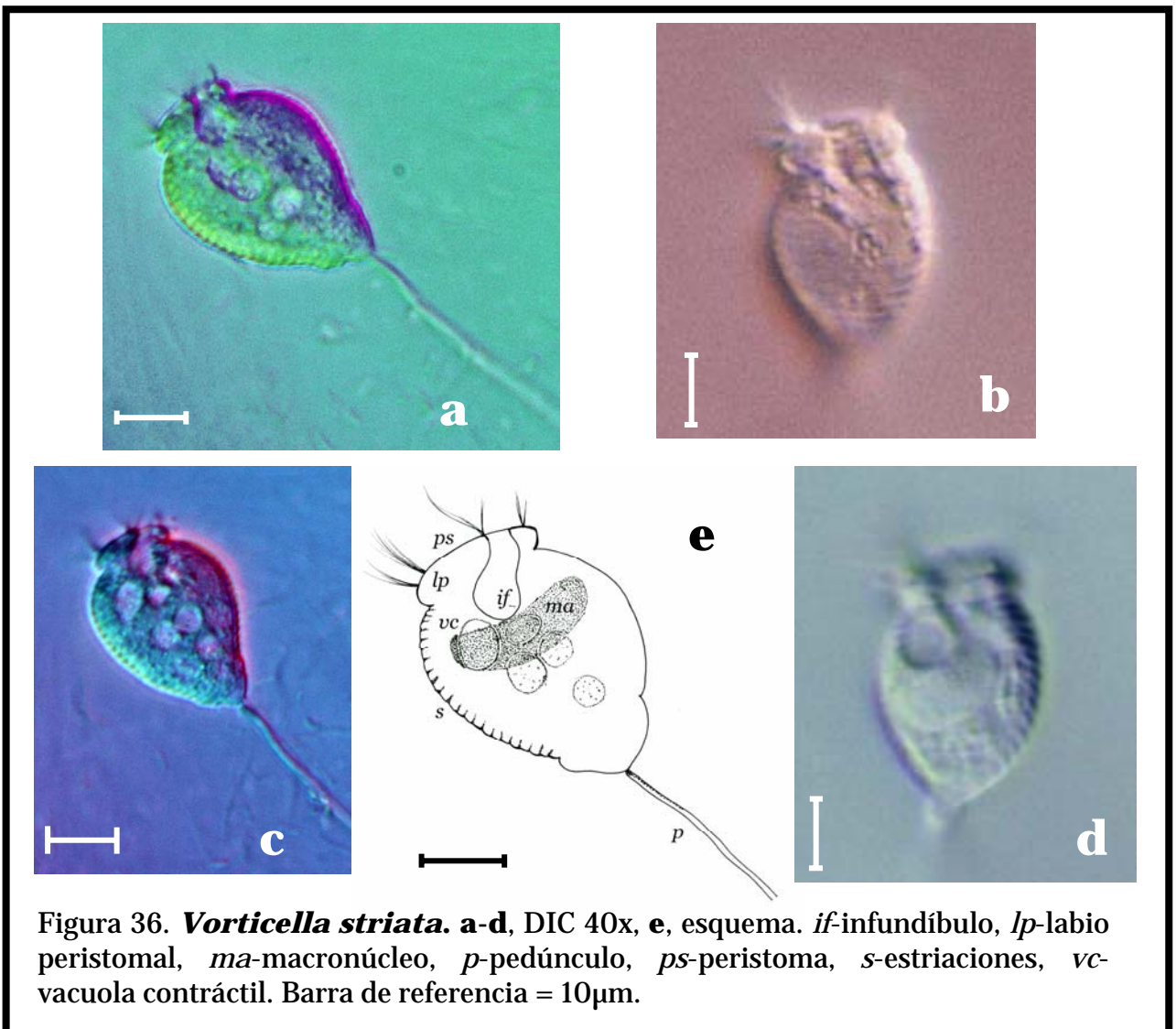


Figura 35. ***Tetrahymena pyriformis***. a-b, DIC 40x, c, DIC 40x *in vivo* con bicloruro de magnesio, d, DIC 40x técnica de protargol (Silva-Neto, 2000), e, esquema. *c*-cinetias, *cs*-citostoma, *ma*-macronúcleo, *mm*-membranelas, *mo*-membrana paroral, *va*-vacuolas alimenticias, *vc*-vacuola contráctil. Barra de referencia = 10 μm .

Vorticella striata

Este peritrico presenta un peristoma (*ps*) de menor diámetro que el cuerpo, midió de longitud entre 16.8 y 35 μm por 11.2 - 25.2 μm de diámetro máximo del cuerpo y de 8.4 - 10.5 μm de diámetro del peristoma. Tiene una película estriada (*s*). El labio peristomal (*lp*) no es muy grueso, no se alcanza a ver el disco peristomal. La unión del cuerpo con el pedúnculo (*p*) es redondeada. El macronúcleo (*ma*) es transversal en forma de herradura. La vacuola contráctil (*vc*) está ubicada debajo del peristoma y el infundíbulo (*if*) llega a un tercio del cuerpo quedando a un lado de la vacuola. Se presentó en cultivos de agua de la recolecta de junio de 2006 y en cultivos de chícharo de la muestra de guano de la recolecta de marzo de 2007. Es un nuevo registro en cuevas a nivel mundial y para México (Fig. 36).



Vorticella globosa

Este peritrico, al igual que la otra especie de este género, presenta un peristoma (*ps*) de menor diámetro que el cuerpo, midió de longitud entre 22.4 y 42 μm , el diámetro máximo del cuerpo estuvo entre 14 - 25.2 μm y el diámetro del peristoma entre 11.2 y 14 μm . Tiene una película estriada (*s*). Presenta un disco peristomal (*dp*) convexo y elevado. El labio peristomal es delgado (*lp*). La unión con el pedúnculo (*p*) es redondeada. El macronúcleo (*ma*) es ancho en forma de herradura y cruza transversalmente el cuerpo. Presenta una vacuola contráctil (*vc*) ubicada a un tercio del cuerpo por debajo del peristoma, el infundíbulo (*if*) llega hasta el centro del zooide. Se presentó en cultivos de chícharo de la muestra de agua de la primera recolecta y de la de octubre de 2006 y en cultivos de maíz, paja y en la muestra original de musgo de la recolecta de junio de 2006. Es un nuevo registro en cuevas a nivel mundial y para México (Fig. 37).

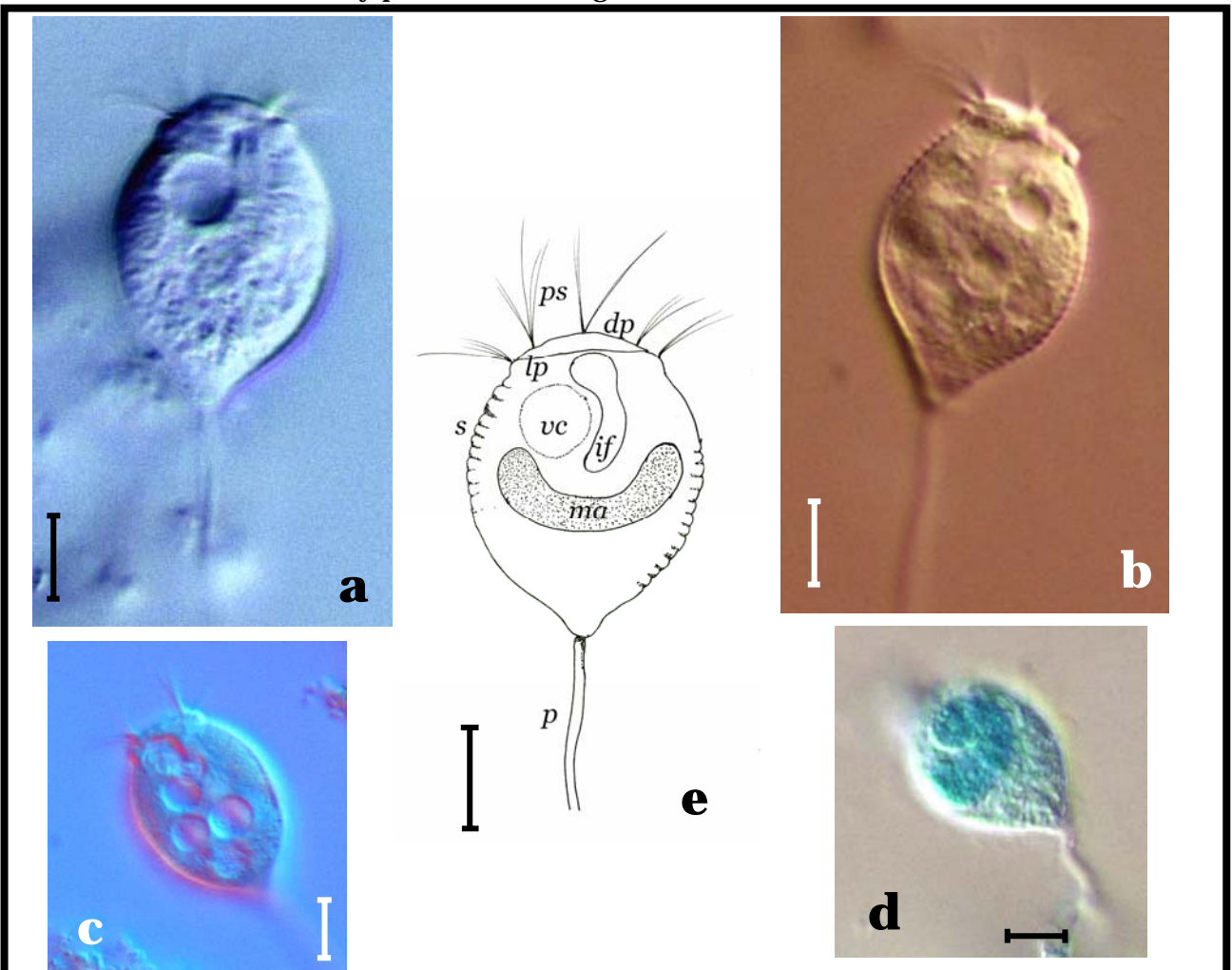


Figura 37. ***Vorticella globosa***. a-c, DIC 40x, d, DIC 40x *in vivo* con verde de metilo, e, esquema. *dp*-disco peristomal, *if*-infundíbulo, *lp*-labio peristomal, *ma*-macronúcleo, *p*-pedúnculo, *ps*-peristoma, *s*-estriaciones, *vc*-vacuola contráctil. Barra de referencia = 10 μm .

***Vahlkampfia* sp.**

Gimnamoeba monopodial. Midió de 25 – 35 μm de longitud por 10 – 15 μm de anchura. Presenta un uroide (*u*) pequeño y sencillo. El endoplasma (*ed*) ocupa la región posterior y el ectoplasma (*ec*) la mitad anterior. Es binucleada (*n*). Se encontró en la muestra de agua de la recolecta de octubre de 2006 y en las muestras de guano y musgo de la recolecta de junio de 2006, en cultivos con infusiones de chícharo, maíz y peptona (Fig. 38).

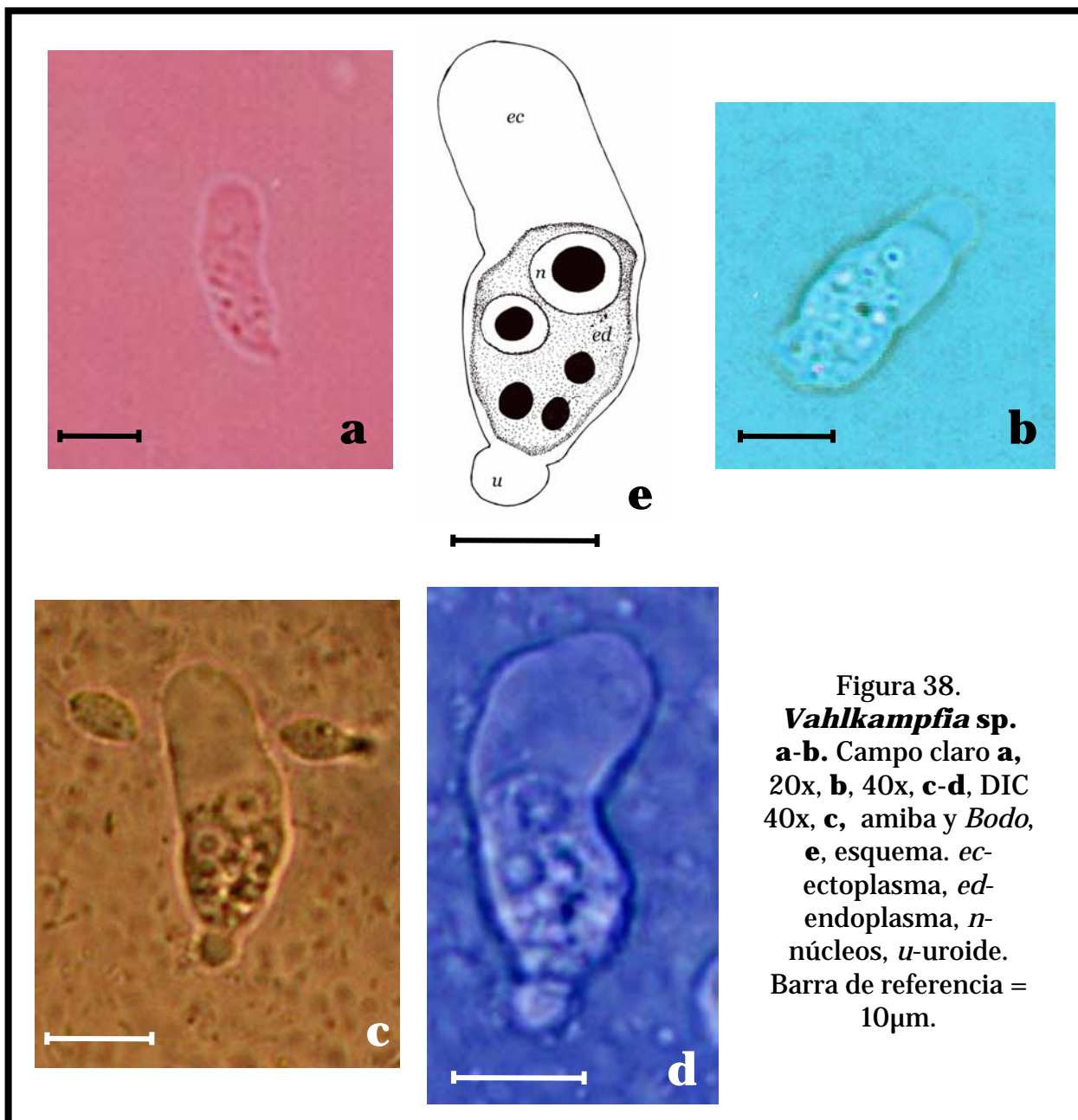
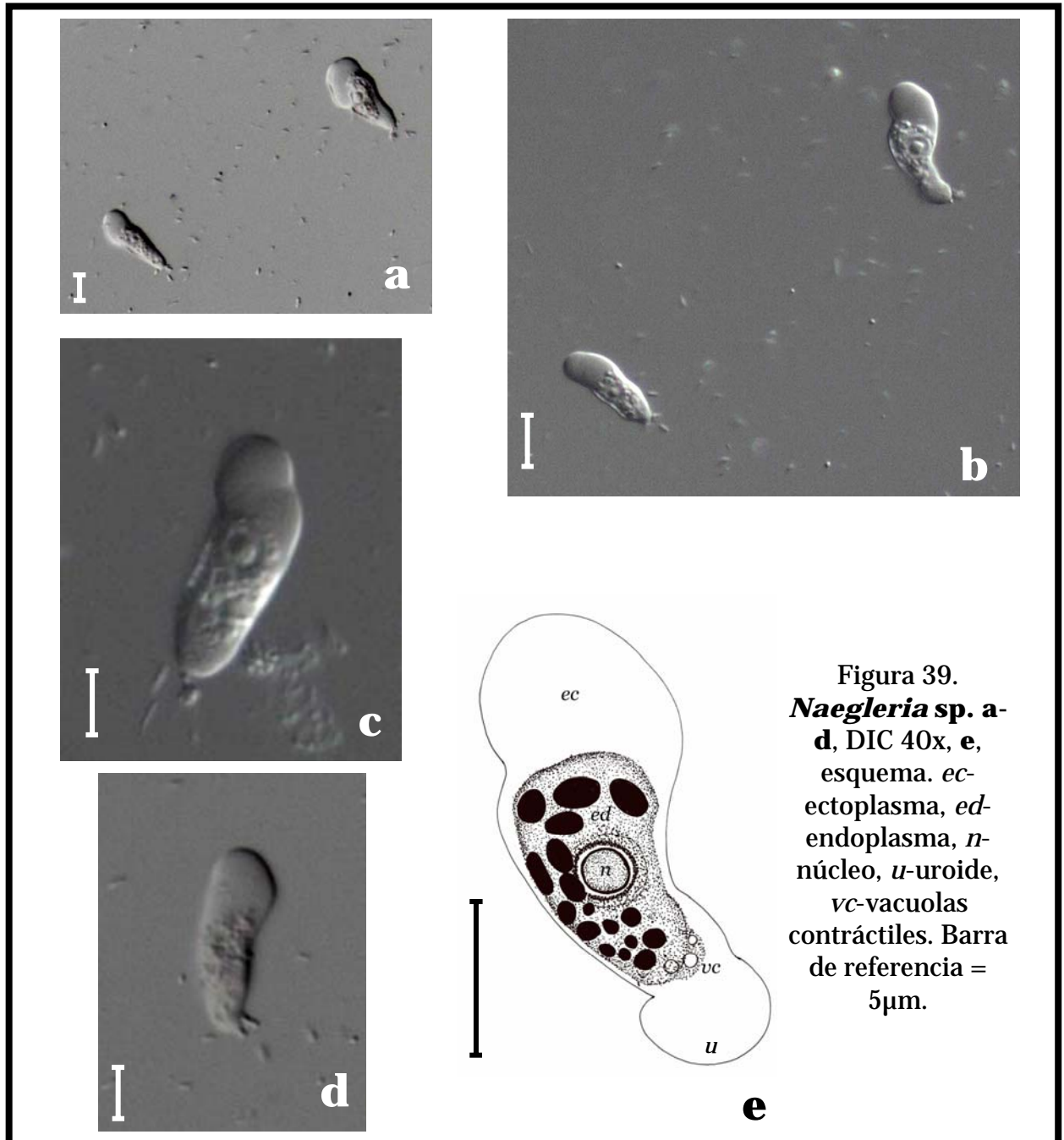


Figura 38.
***Vahlkampfia* sp.**
a-b. Campo claro **a**,
20x, **b**, 40x, **c-d**, DIC
40x, **c**, ameba y *Bodo*,
e, esquema. *ec*-
ectoplasma, *ed*-
endoplasma, *n*-
núcleos, *u*-uroide.
Barra de referencia =
10 μm .

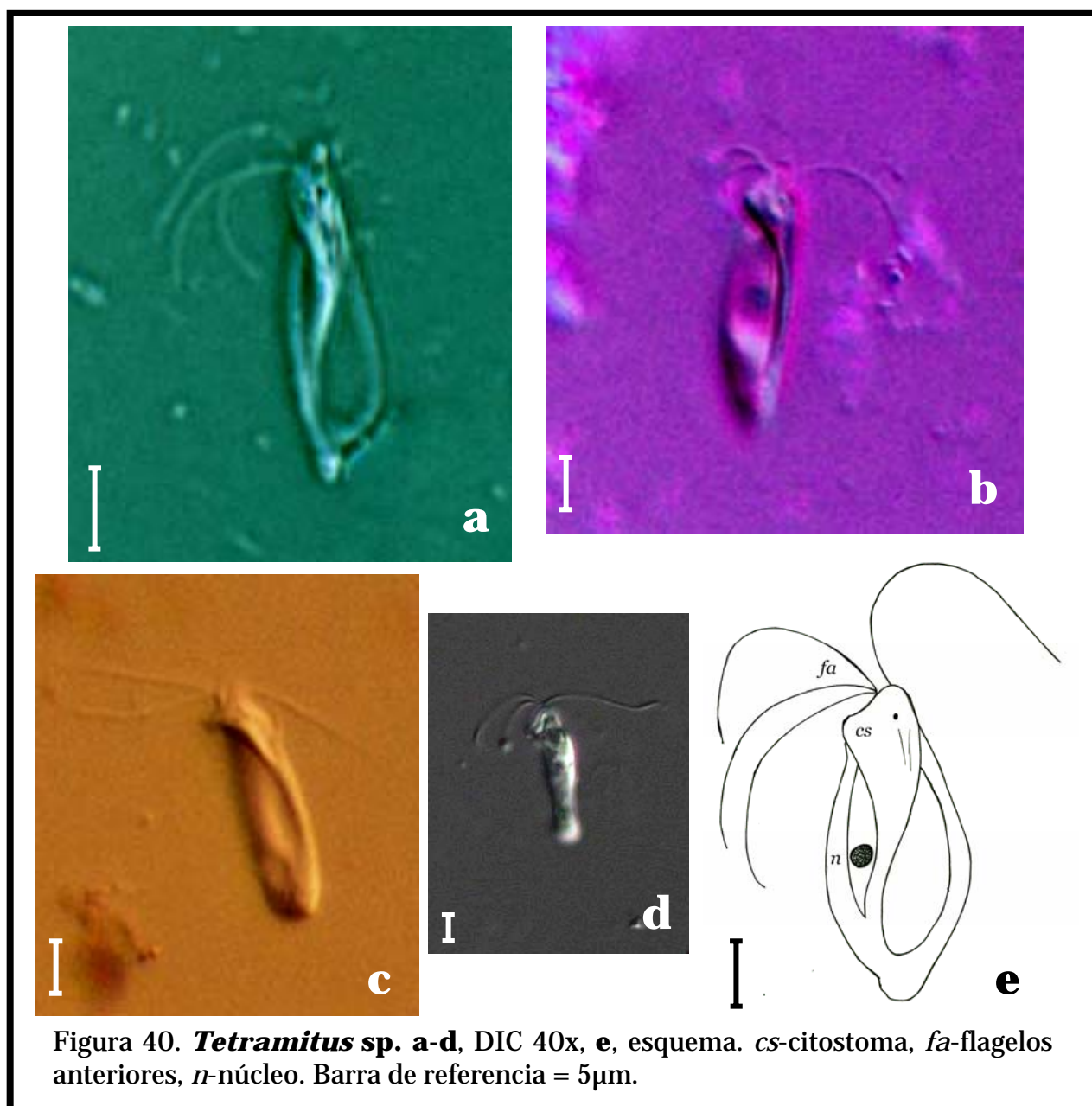
***Naegleria* sp.**

Gimnamoeba monopodial con forma limax, midió de 10 – 20 μm de longitud por 5 μm de anchura. Presenta un pequeño uroide (*u*). El endoplasma (*ed*) abarca sólo tres cuartas partes del cuerpo, el resto es el ectoplasma (*ec*). Presenta un núcleo (*n*) muy conspicuo y vacuolas contráctiles (*vc*) en la región posterior. Puede tener una fase flagelar. Se encontró principalmente en los cultivos con infusión de peptona de las muestras de agua y guano de la recolecta de noviembre de 2005 y de octubre de 2006 (Fig. 39).



***Tetramitus* sp.**

El ciclo de vida de esta especie involucra dos fases: la ameboide y la flagelar, de las cuales sólo se observó la segunda. Esta fase corresponde a un flagelado alargado elipsoide, midió entre 21 y 24.5 μm de longitud por 7 – 10.5 μm de anchura. Tiene cuatro flagelos anteriores (*fa*) de diferente tamaño, el citostoma (*cs*) tiene forma de surco y se encuentra en esta misma región. Presenta un núcleo (*n*) redondo y central. Fue abundante en los cultivos de peptona de muestras tanto de agua de la recolecta de octubre de 2006 como de guano de junio de 2007 (Fig. 40).



Hartmannella vermiformis

Gimnamoeba monopodial alargada y delgada, midió de 30 -40 μm de longitud por 3 – 10 μm de anchura. Sin un uroide (*u*) prominente. Una pequeña parte de la región anterior está formada por el ectoplasma (*ec*), el resto es el endoplasma (*ed*) que contiene al núcleo (*n*) en posición casi central y una o varias vacuolas contráctiles (*vc*). Se presentó en cultivos de chícharo, tanto de agua de la recolecta de noviembre de 2005 como de suelo de abril de 2006. Es un nuevo registro en cuevas para México y a nivel mundial (Fig. 41).

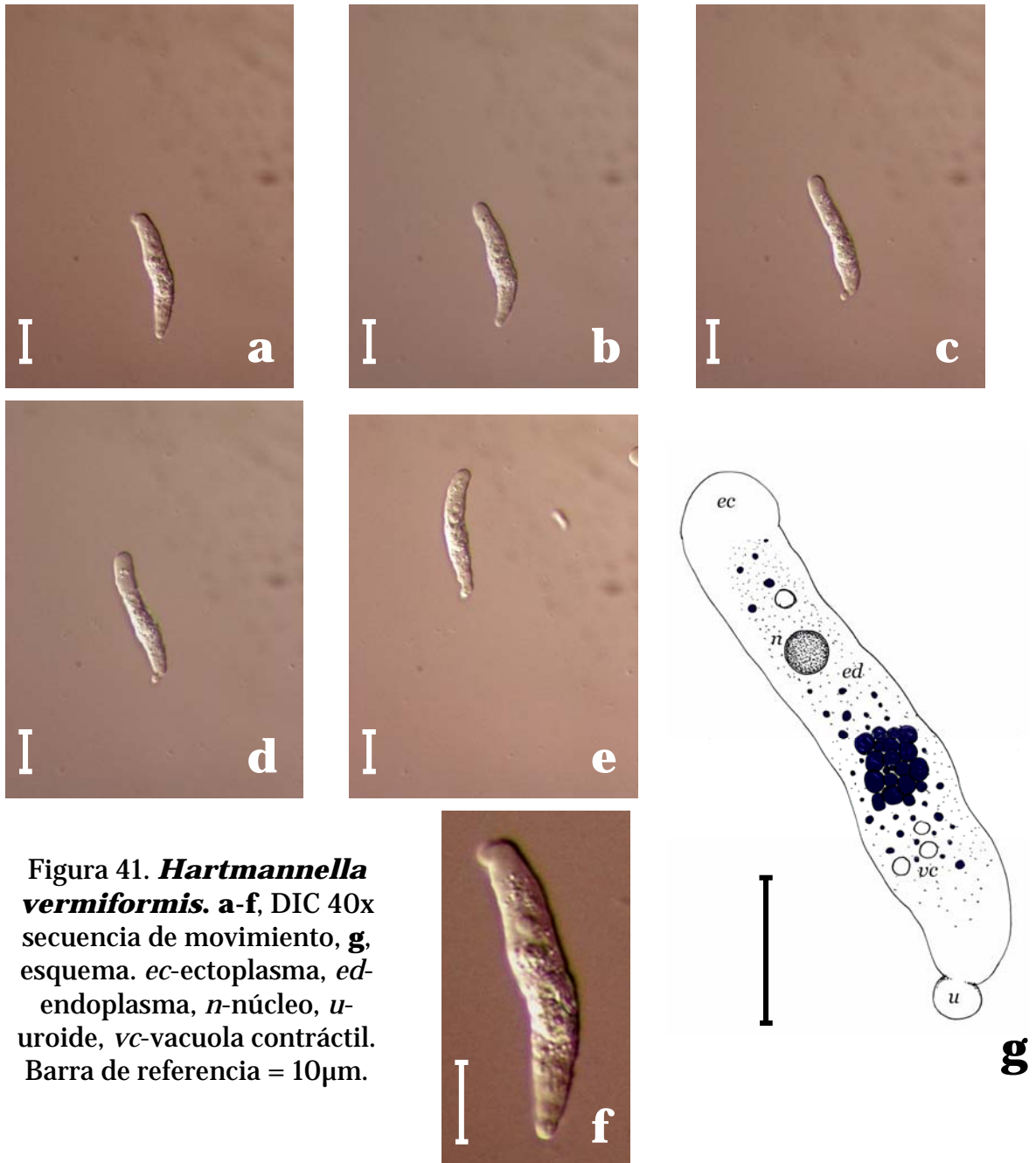


Figura 41. ***Hartmannella vermiformis***. a-f, DIC 40x secuencia de movimiento, g, esquema. *ec*-ectoplasma, *ed*-endoplasma, *n*-núcleo, *u*-uroide, *vc*-vacuola contráctil. Barra de referencia = 10 μm .

***Thecamoeba* sp.**

Gimnamoeba rugosa (morfotipo según Smirnov y Goodkov, 1999) oblonga, midió entre 30 y 45 μm de longitud por 20 – 30 μm de anchura. El endoplasma (*ed*) se encuentra hacia el centro de la célula dejando una pequeña franja alrededor donde se encuentra el ectoplasma (*ec*). Tiene un núcleo (*n*) central y una o dos vacuolas contráctiles (*vc*) posteriores muy conspicuas. Fue escasa, sólo se presentó en la muestra original de musgo de la recolecta de junio de 2007 (Fig. 42).

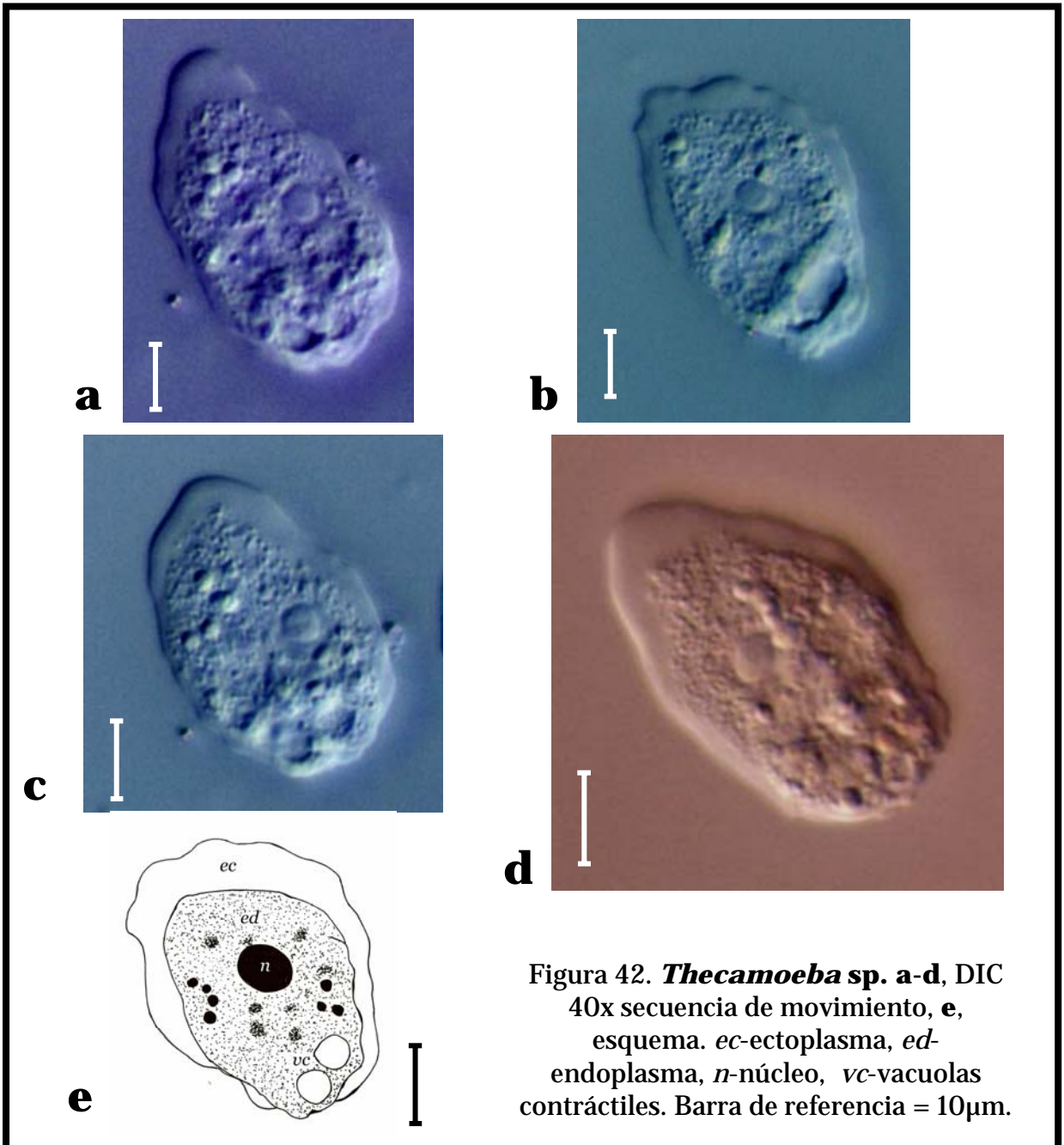
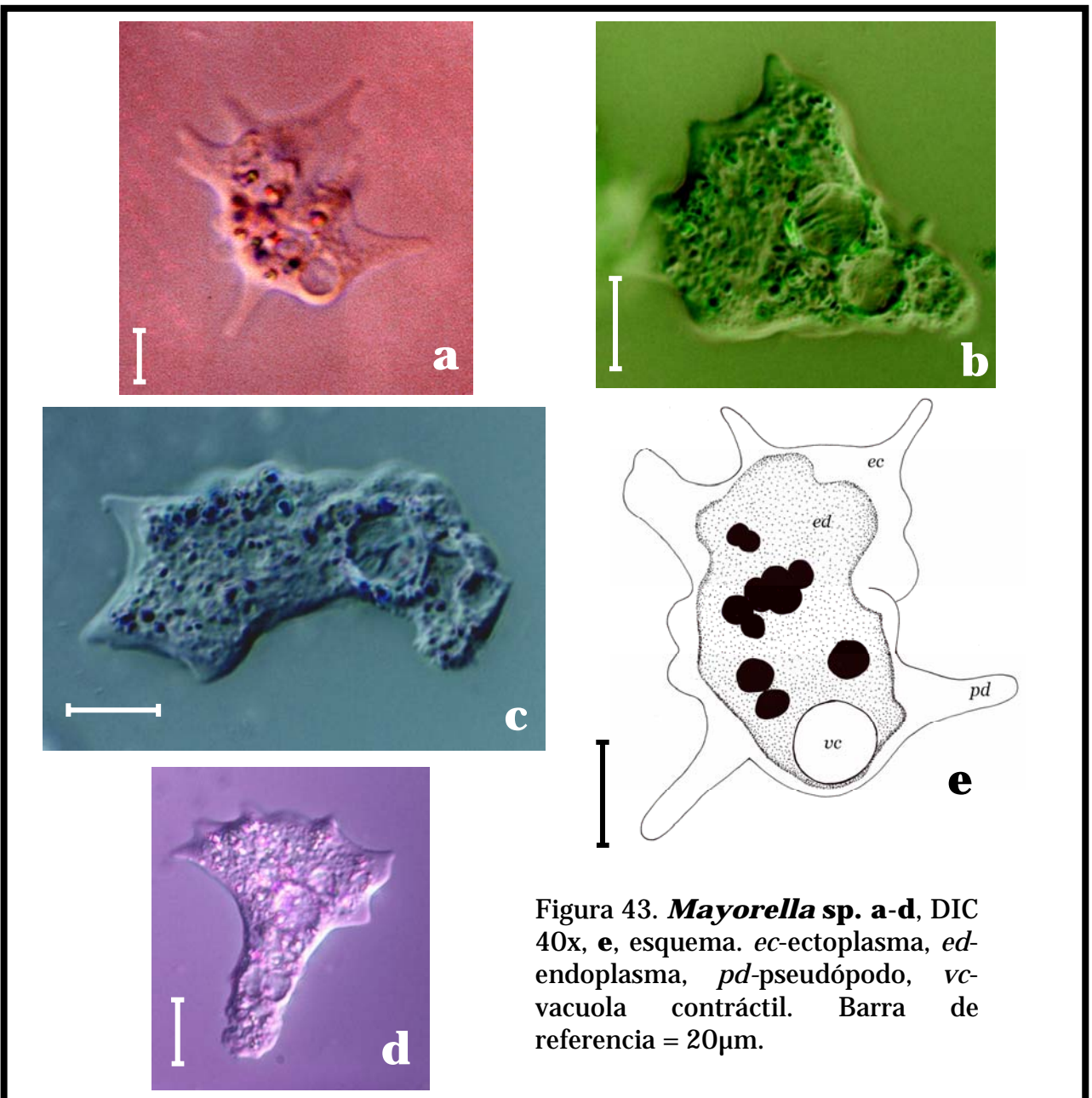


Figura 42. *Thecamoeba* sp. a-d, DIC 40x secuencia de movimiento, e, esquema. *ec*-ectoplasma, *ed*-endoplasma, *n*-núcleo, *vc*-vacuolas contráctiles. Barra de referencia = 10 μm .

***Mayorella* sp.**

Amiba mayorelida (morfotipo según Smirnov y Goodkov, 1999), midió entre 70 y 80 μm de longitud por 30 – 50 μm de anchura. El endoplasma (*ed*) ocupa prácticamente toda la célula, el ectoplasma (*ec*) se encuentra restringido principalmente a los pseudópodos (*pd*), que pueden ser de cuatro a nueve, tienen forma cónica y son casi del mismo tamaño. Presenta mucha materia orgánica en el endoplasma y puede tener un número variable de vacuolas contráctiles (*vc*), habiendo en algunos casos una posterior de mayor tamaño que el resto. No se observó el núcleo. Se presentó en cultivos de maíz y Chalkley así como en la muestra original del musgo de la recolecta de abril de 2006 (Fig. 43).



***Lingulamoeba* sp.**

Gimnamoeba lingulada (morfotipo según Smirnov y Goodkov, 1999). Es una amiba muy pequeña con respecto a las arriba descritas, midió entre 10 y 15 μm de longitud por 5 – 10 μm de anchura. El endoplasma (*ed*) se concentra en la región posterior y contiene mucha materia orgánica mientras que el ectoplasma (*ec*) se encuentra en la región anterior. No se observó el núcleo. Se encontró escasa en los cultivos de peptona de la muestra de agua y en la muestra original de musgo de la recolecta de marzo de 2007 (Fig. 44).

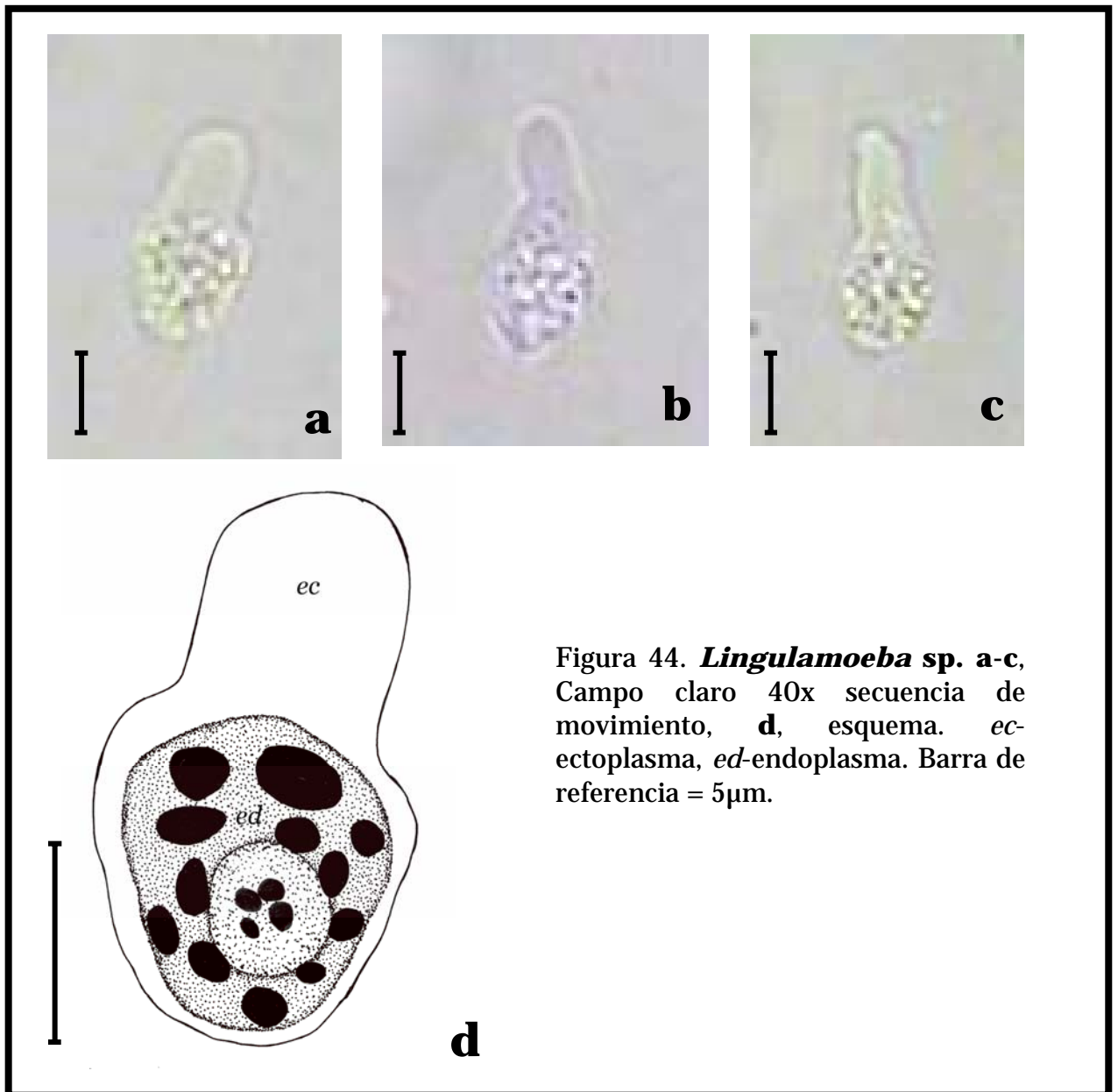


Figura 44. *Lingulamoeba* sp. a-c, Campo claro 40x secuencia de movimiento, d, esquema. *ec*-ectoplasma, *ed*-endoplasma. Barra de referencia = 5 μm .

***Acanthamoeba* sp.**

Gimnamoeba acantopodiana (morfortipo según Smirnov y Goodkov, 1999), midió de 30 a 40 μm de longitud por 15 – 25 μm de anchura. El endoplasma (*ed*) ocupa prácticamente toda la célula y contiene varias vacuolas contráctiles (*vc*) pudiendo haber una de mayor tamaño. Presenta numerosos acantópodos (*ac*) formados por el ectoplasma (*ec*). Se encontró en un cultivo de maíz y en la muestra original de musgo y en un cultivo de peptona de la muestra de guano de la recolecta de junio de 2006 (Fig. 45).

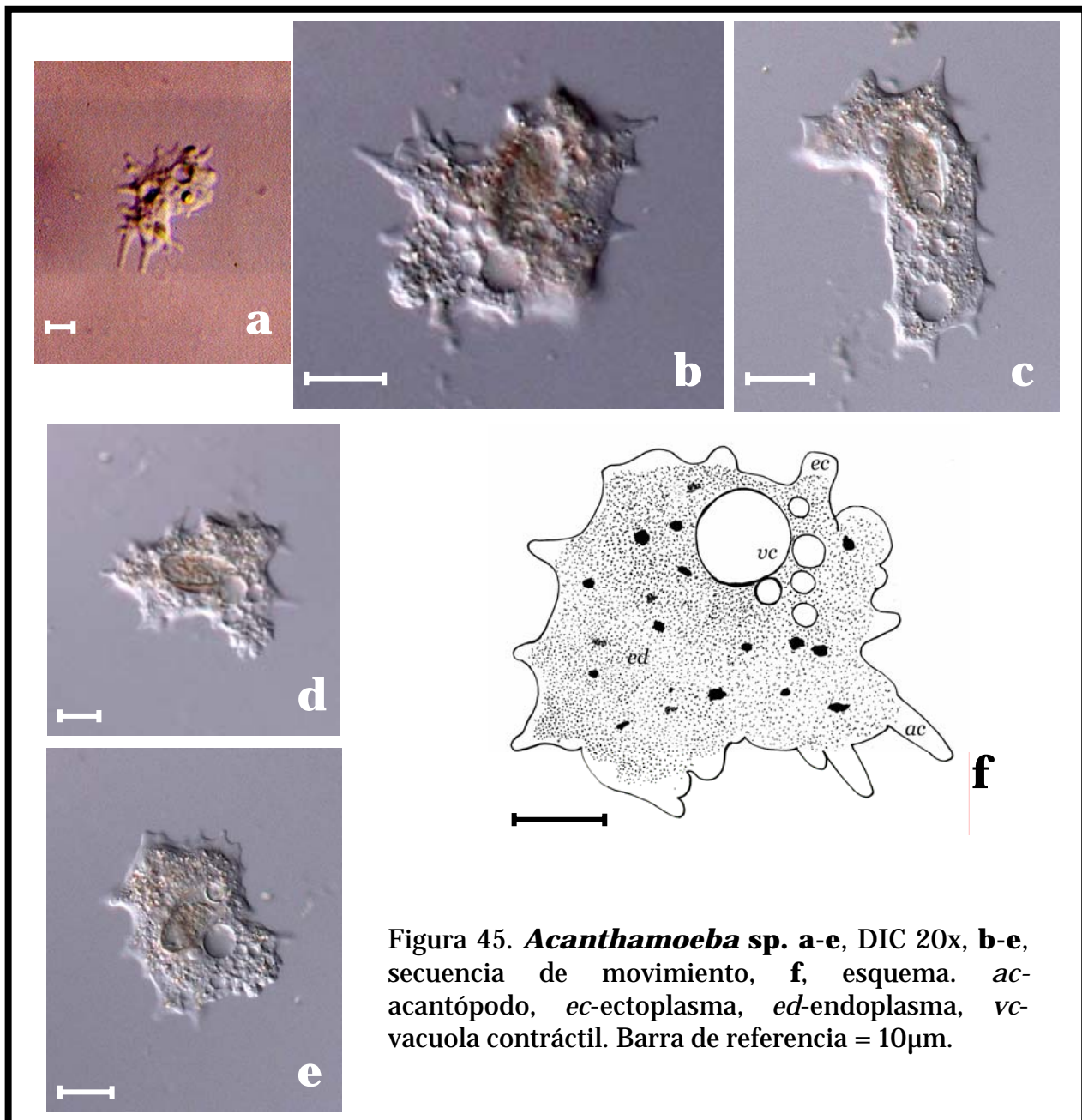


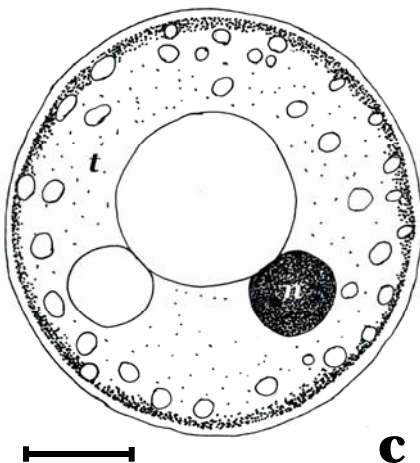
Figura 45. ***Acanthamoeba* sp.** a-e, DIC 20x, b-e, secuencia de movimiento, f, esquema. *ac*-acantópodo, *ec*-ectoplasma, *ed*-endoplasma, *vc*-vacuola contráctil. Barra de referencia = 10 μm .

***Arcella* sp.**

Amiba con testa (*t*) de tectina, esférica y transparente, midió entre 15 y 20 μm de diámetro. Tiene la apertura central de la cual salen algunos lobópodos elongados. Posee un núcleo (*n*) casi central. Se encontró en un cultivo de trigo de una muestra de musgo de la recolecta correspondiente a abril de 2006 (Fig. 46).

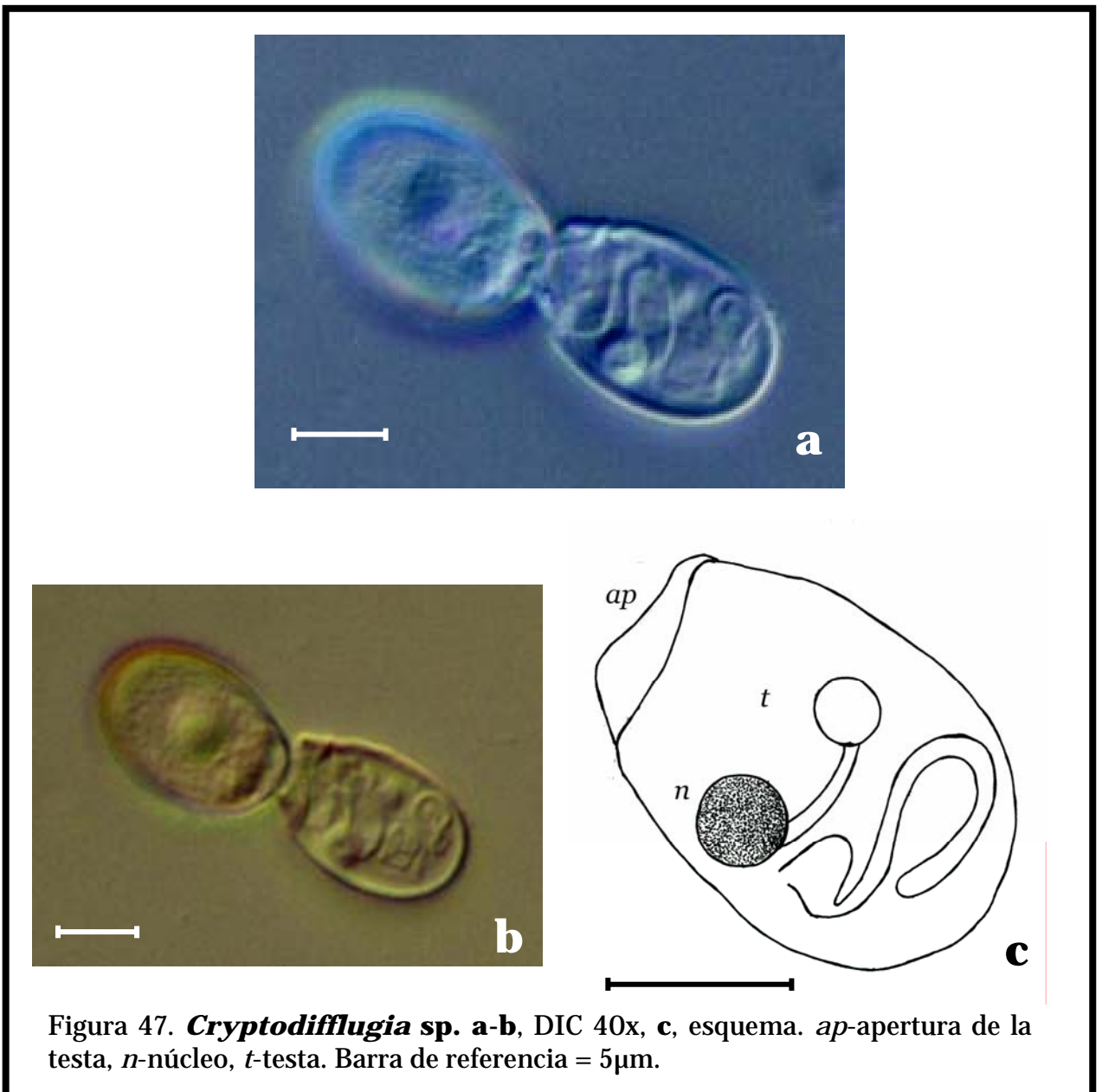


Figura 46. *Arcella* sp. **a-**
b, DIC 40x, **c**, esquema. *n*-
núcleo, *t*-testa. Barra de
referencia = 5 μm .



***Cryptodiffugia* sp.**

Amiba pequeña con testa (*t*) ovoide, delgada y lisa. Midió entre 10 y 15 μm de longitud por 5 – 10 μm de anchura. Tiene una apertura (*ap*) apical cuyo diámetro es un poco menor al ancho de la teca, de donde salen pocos pseudópodos largos y delgados. Sobre la testa se pueden observar algunas pequeñas partículas y granos refractantes. Presenta un núcleo (*n*). Se encontró en un cultivo de chícharo de la muestra de guano correspondiente a la recolecta de marzo de 2007 (Fig. 47).



***Diffflugia* sp.**

Amiba con una testa (*t*) ovoide constituida por materia agregada que le da un aspecto rugoso o granulado. Midió de 20 – 30 μm de diámetro desde una vista superior. Tiene una apertura (*ap*) terminal, de diámetro de la mitad del ancho de la testa, con dientes (*de*) de mediano tamaño. De esta apertura salen pocos lobópodos (*lb*). El citoplasma llena prácticamente toda la testa. Se presentó en baja abundancia en un cultivo de chícharo de una muestra de agua de la recolecta de noviembre de 2005 y en la muestra original de musgo de la recolecta de abril de 2006 (Fig. 48).

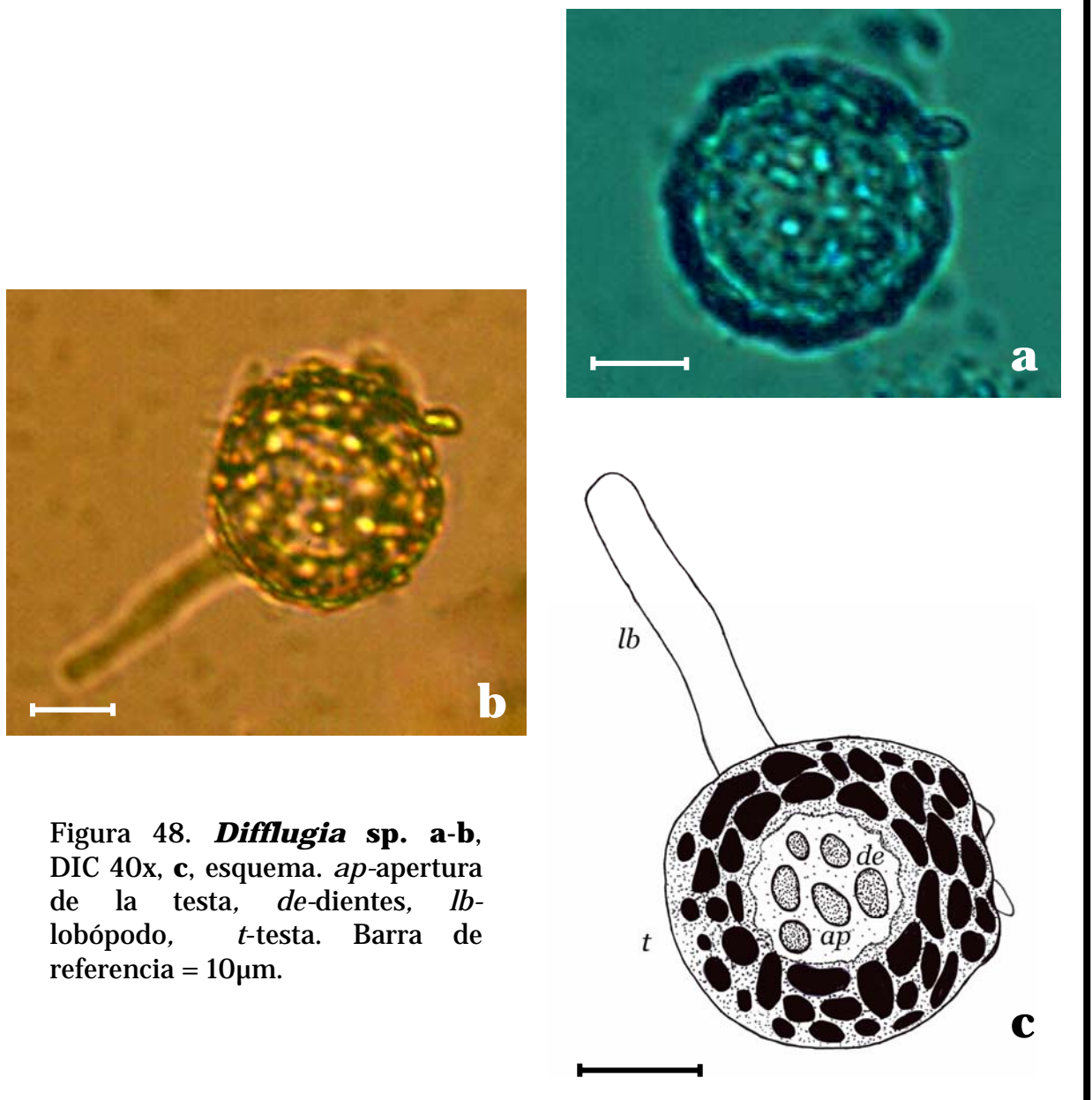


Figura 48. *Diffflugia* sp. a-b, DIC 40x, c, esquema. *ap*-apertura de la testa, *de*-dientes, *lb*-lobópodo, *t*-testa. Barra de referencia = 10 μm .

Cyclopyxis eurystoma* var. *parvula

Amiba con testa (*t*) esférica cuyo diámetro midió de 30 – 40 μm . La testa se constituye de finos granos de materia orgánica y presenta una apertura (*ap*) excéntrica, cuyo diámetro es casi igual al ancho de la testa, de donde salen pocos pseudópodos (*pd*) largos y delgados. Sólo se encontró en musgo, tanto en la muestra original como en cultivos de maíz con paja de la recolecta de marzo de 2007 y en cultivos de Chalkley de abril de 2006, siendo escasa en todos los casos. Este es un primer registro en cuevas para el mundo y para México (Fig. 49).

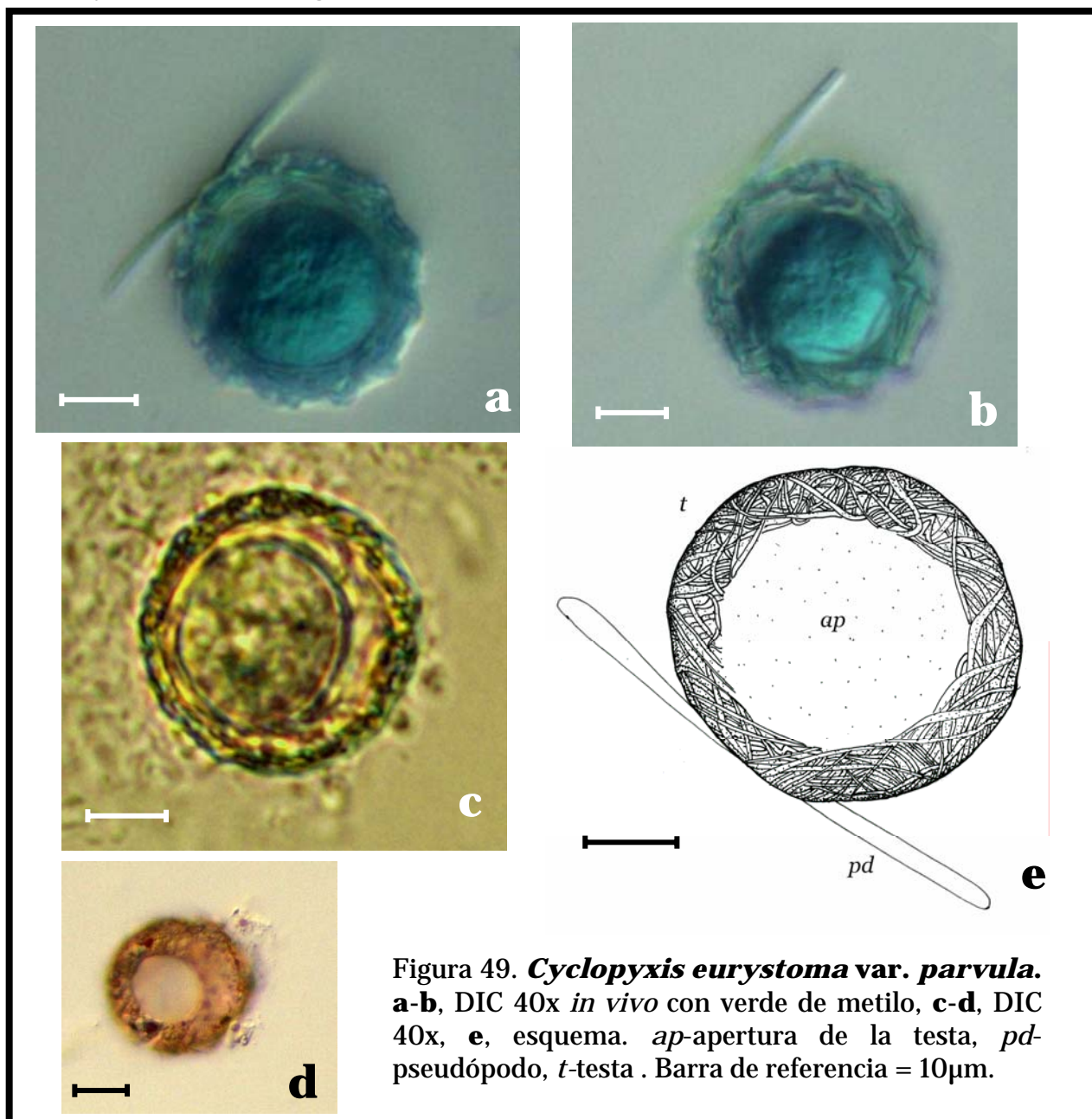


Figura 49. ***Cyclopyxis eurystoma* var. *parvula***. **a-b**, DIC 40x *in vivo* con verde de metilo, **c-d**, DIC 40x, **e**, esquema. *ap*-apertura de la testa, *pd*-pseudópodo, *t*-testa . Barra de referencia = 10 μm .

Tracheleuglypha dentata

Amiba con testa (*t*) ovoide clara y con placas silíceas (*pls*) redondeadas, midió de 40 - 50 μm de longitud por 20 - 30 μm de anchura. Presenta una apertura (*ap*) oral con proyecciones formando un collar dentado (*de*). Sólo se presentó en la muestra original de musgo de la recolecta de abril de 2006, en la cual fue abundante. Este es un nuevo registro en cuevas a nivel mundial y para México (Fig. 50).

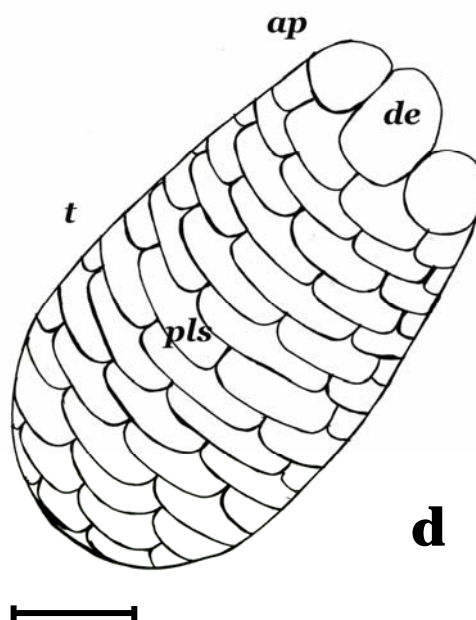
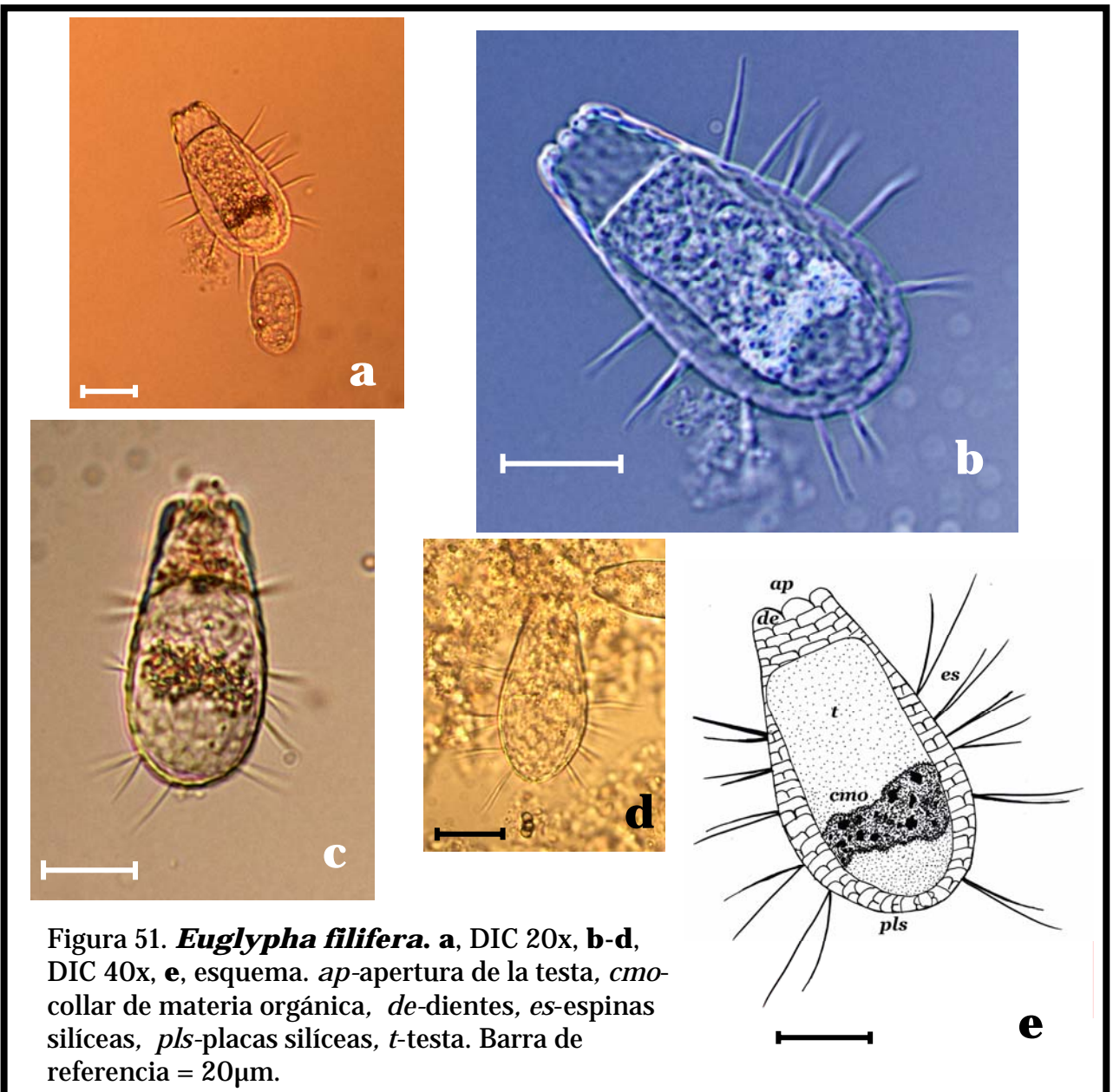


Figura 50. ***Tracheleuglypha dentata***. a-c, DIC 40x, d, esquema. *ap*-apertura de la testa, *de*-dientes, *pls*-placas silíceas, *t*-testa. Barra de referencia = 10 μm .

Euglypha filifera

Amiba con una testa (*t*) ovoide y con placas (*pls*) silíceas, midió de longitud entre 65 y 75 μm de longitud y de 30 – 40 μm de anchura, la longitud de las espinas fue de 15 - 20 μm . La apertura (*ap*) es apical y su margen es dentado (*de*). Puede observarse un collar de materia orgánica (*cmo*) en la región superior de la testa. Tiene espinas silíceas (*es*) largas que salen en grupos de dos y se distribuyen de manera uniforme alrededor de toda la testa, son alrededor de 11 pares. Se encontró en la muestra original de musgo y en cultivos de maíz y Chalkley de la recolecta de abril de 2006. Es un nuevo registro en cuevas a nivel mundial y en México (Fig. 51).



***Trinema* sp.**

Amiba con testa (*t*) ovoide y transparente con placas pequeñas, de longitud midió entre 30 y 40 μm por 20 – 25 μm de ancho. La apertura (*ap*) es circular y se encuentra cargada hacia un lado, su diámetro abarca casi tres cuartas partes del ancho de la testa. De esta apertura salen numerosos filópodos (*fl*). Se encontró poco abundante en un cultivo de peptona de suelo de la recolecta de octubre de 2006 y en la muestra original de musgo de abril de 2006 (Fig. 52).

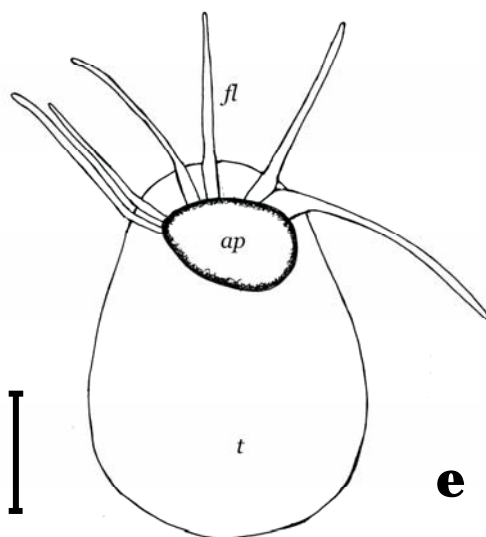
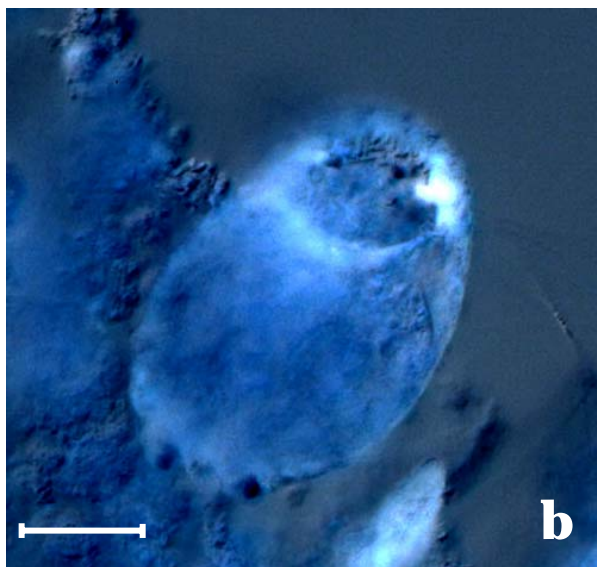
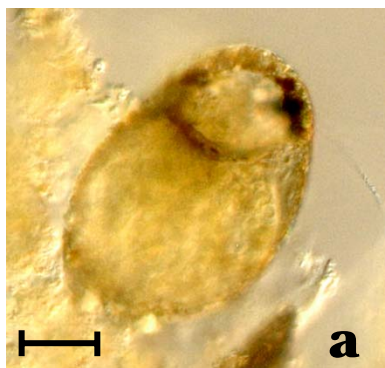


Figura 52. ***Trinema* sp.** a-c, DIC 40x, d, DIC 20x, e, esquema. *ap*-apertura de la testa, *fl*-filópodos, *t*-testa. Barra de referencia = 10 μm .

***Chlamydophrys* sp.**

Amiba con testa (*t*) ovoide y transparente, midió de 40 – 50 μm de longitud y de 20 – 30 μm de anchura. La apertura (*ap*) es pequeña y de ella salen numerosos filópodos (*fl*) largos (de aproximadamente la mitad del largo de la testa). Al interior de su testa se puede observar el citoplasma cargado de materia orgánica. Se encontró muy escasa en la muestra original de musgo correspondiente a la recolecta de marzo de 2007 (Fig. 53).

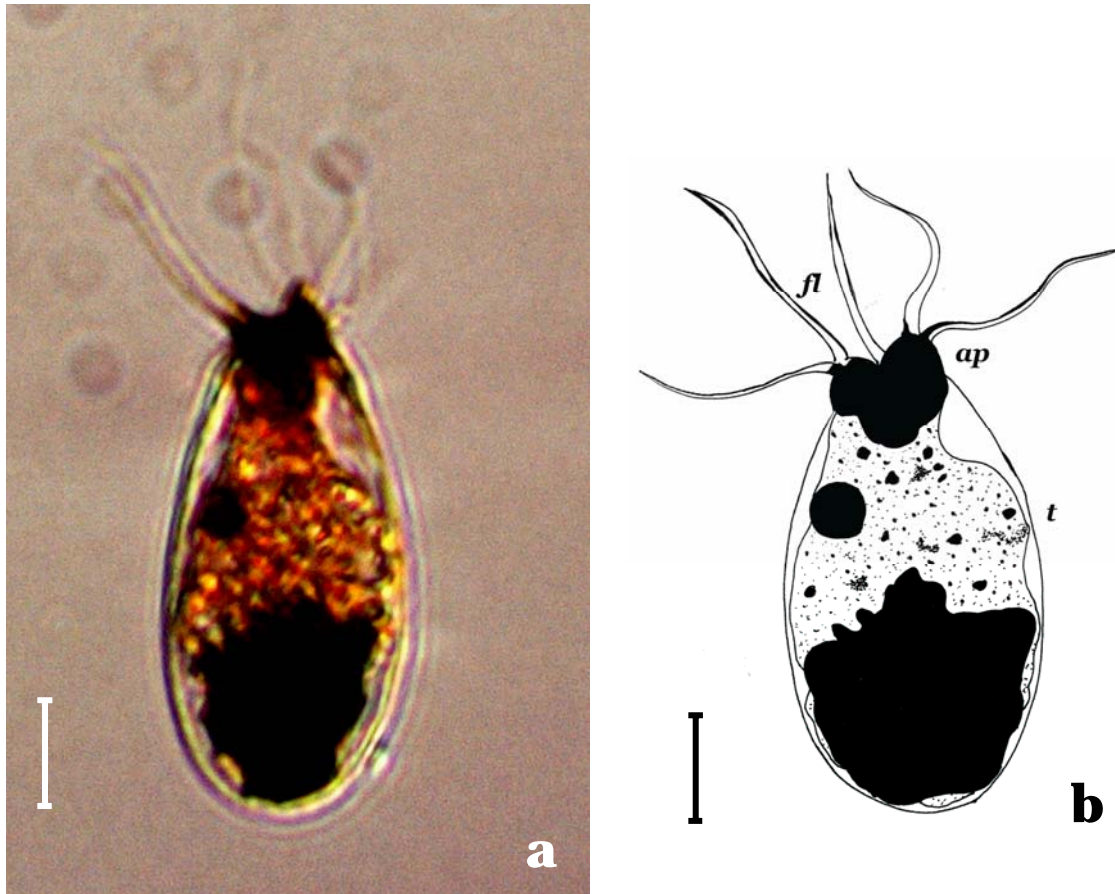


Figura 53. ***Chlamydophrys* sp.** **a**, DIC 40x, **b**, esquema. *ap*-apertura de la testa, *fl*-filópodos, *t*-testa. Barra de referencia = 10 μm .

Actinophrys sol

Heliozoo con numerosos axópodos (*ax*) de la misma longitud, midió de diámetro entre 14 y 33.6 μm , los axópodos midieron de 14 a 36.4 μm . El ectoplasma (*ec*) es altamente vacuolado (*vc*) y el endoplasma (*ed*) es granuloso. Se encontró escaso en cultivos de chícharo de la muestra de agua de la primera recolecta y en la muestra original de musgo de la recolecta de abril de 2006. Esta especie ya ha sido registrada en cuevas a nivel mundial mientras que para México es un nuevo registro (Fig. 54).

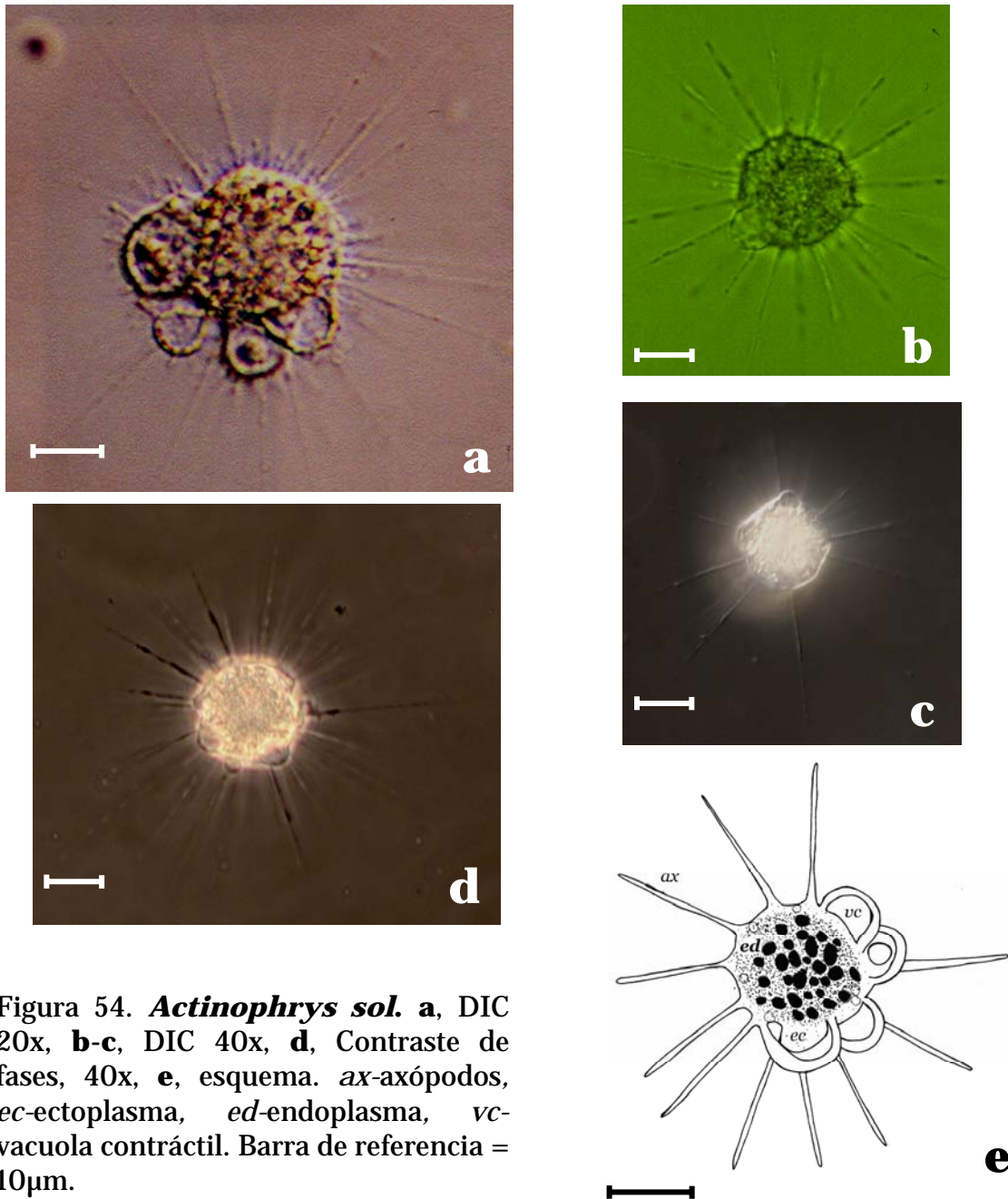


Figura 54. ***Actinophrys sol***. a, DIC 20x, b-c, DIC 40x, d, Contraste de fases, 40x, e, esquema. *ax*-axópodos, *ec*-ectoplasma, *ed*-endoplasma, *vc*-vacuola contráctil. Barra de referencia = 10 μm .

1.2 Posición taxonómica de las especies registradas.

Reino PROTOZOA Goldfuss, 1818

Phylum EUGLENOZOA Cavalier-Smith, 1981

Clase EUGLENOIDEA Bütschli, 1884

Orden EUGLENIDA Bütschli, 1884

Suborden EUGLENINA Bütschli, 1884

***Astasia* sp.** Dujardin, 1830

***Distigma* sp.** Ehrenberg, 1838

Suborden HETERONEMATINA Leedale, 1967

Familia ¿?

***Entosiphon* sp.** Stein, 1878

***Heteronema* sp.** Dujardin, 1841

***Peranema* sp.** Dujardin, 1841

Clase DIPLONEMEA Cavalier-Smith, 1993

Orden KINETOPLASTEA Honigberg, 1963

Suborden BODONINA Hollande, 1952

Familia BODONIDAE Bütschli, 1887

***Bodo* sp.** Ehrenberg, 1830

Phylum ¿?

***Cercomonas* sp.** Dujardin, 1841

Phylum CILIOPHORA Doflein, 1901

Subphylum INTRAMACRONUCLEATA Lynn, 1996

Clase SPIROTRICHEA Bütschli, 1889

Subclase HYPOTRICHIA Stein, 1859

Orden EUPLOTIDA Small y Lynn, 1985

Suborden EUPLOTINA Small y Lynn, 1985

Familia ASPIDISCIDAE Ehrenberg, 1838

Aspidisca cicada (Müller, 1786)

Familia EUPLOTIDAE Ehrenberg, 1838

***Euplotes* sp.** Ehrenberg, 1830

Subclase STICHOTRICHIA Small y Lynn, 1985

Orden SPORADOTRICHIDA Fauré-Fremiet, 1961

Familia OXYTRICHIDAE Ehrenberg, 1838

Oxytricha fallax Stein, 1859

Orden UROSTYLIDA Jankowski, 1979

Familia PSEUDOKERONOPSIDAE Borror y Wicklow, 1983

Subfamilia PSEUDOKERONOPSINAE Borror y Wicklow, 1983

Pseudokeronopsis flavicans (Kahl, 1932)

Familia UROSTYLIDAE Bütschli, 1889

Uroleptus piscis (Müller, 1786)

Clase LITOSTOMATEA Small y Lynn, 1981

Subclase HAPTORIA Corliss, 1974

Orden PLEUROSTOMATIDA Schewiakoff, 1896

Familia LITONOTIDAE Kent, 1882

Litonotus fusidens Kahl, 1926

Orden HAPTORIDA Corliss, 1974

Familia SPATHIDIIDAE Kahl en Doflein y Reichenow, 1929

Spathidium lionotiforme Kahl, 1930

Clase NASSOPHOREA Small y Lynn, 1981

Orden MICROTHORACIDA Jankowsky, 1967

Familia MICROTHORACIDAE Wrzesniowski, 1870

Leptopharynx costatus Mermoud, 1914

Drepanomonas revoluta Penard, 1922

Clase COLPODEA Small y Lynn, 1981

Orden COLPODIDA de Puytorac *et al.*, 1974

Familia COLPODIDAE Bory de St. Vincent, 1826

Colpoda aspera (Kahl, 1926)

Colpoda colpidiopsis (Kahl, 1931)

Colpoda eucaudata (Liebmann, 1936)

Colpoda inflata (Stokes, 1884)

Clase PROSTOMATEA Schewiakoff, 1896

Orden PRORODONTIDA Corliss, 1974

Familia COLEPIDAE Ehrenberg, 1838

Coleps hirtus (Müller, 1786)

Clase OLIGOHYMENOPHOREA de Puytorac *et al.*, 1974

Subclase PENICULIA Fauré-Fremiet en Corliss, 1956

Orden PENICULIDA Fauré-Fremiet en Corliss, 1956

Suborden PARAMECIINA Jankowski en Small y Lynn, 1985

Familia PARAMECIIDAE Dujardin, 1840

Paramecium caudatum Ehrenberg, 1838

Subclase SCUTICOCILIATIA Small, 1967

Orden PHILASTERIDA Small, 1967

Familia URONEMATIDAE Thompson, 1964

Uronema nigricans (Müller, 1786)

Orden PLEURONEMATIDA Fauré-Fremiet en Corliss, 1956

Familia CYCLIDIIDAE Ehrenberg, 1838

Cyclidium pellucidum Kahl, 1931

Subclase HYMENOSTOMATIA Delage y Hérouard, 1896

Orden HYMENOSTOMATIDA Delage y Hérouard, 1896

Suborden TETRAHYMENINA Fauré-Fremiet en Corliss, 1956

Familia TETRAHYMENIDAE Corliss, 1952

Tetrahymena pyriformis (Ehrenberg, 1931)

Subclase PERITRICHIA Stein, 1859

Orden SESSILIDA Kahl, 1933

Familia VORTICELLIDAE Ehrenberg, 1838

Vorticella striata Dujardin, 1841

Vorticella globosa Ghosh, 1922

Phylum ¿?

Clase HETEROLOBOSEA Page y Blanton, 1985

Orden SCHIZOPYRENIDA Singh, 1952

Familia VAHLKAMPFIIDAE Jollos, 1917

Vahlkampfia sp. Chatton y Lalung-Bonnaire, 1912

Naegleria sp. Alexeieff, 1912

Tetramitus sp. Perty, 1852

Phylum ¿?

Orden EUAMOEBIDA Lepš, 1960

Familia HARTMANNELLIDAE Volkonsky, 1931

Hartmannella vermiformis Page, 1967

Familia THECAMOEBIDAE Schaeffer, 1926

***Thecamoeba* sp.** Fromentel, 1874

Familia PARAMOEBIDAE Poche, 1913

***Mayorella* sp.** Schaeffer, 1926

Familia VANNELLIDAE (Bovee, 1970)

***Lingulamoeba* sp.** Sawyer, 1975

Orden CENTRAMOEBIDA

Familia ACANTHAMOEBIDAE Sawyer y Griffin, 1975

***Acanthamoeba* sp.** Sawyer y Griffin, 1975

Phylum ¿?

Orden ARCELLINIDA Kent, 1880

Suborden ARCELLINA Haeckel, 1884

Familia ARCELIIDAE Ehrenberg, 1843

***Arcella* sp.** Ehrenberg, 1832

Suborden PHRYGANELLINA Bovee, 1985

Familia CRYPTODIFFLUGIDAE Jung, 1942

***Cryptodiffugia* sp.** Penard, 1890

Suborden DIFFLUGINA Meisterfeld en Lee, 2000

Familia DIFFLUGIIDAE Walich, 1864

***Diffugia* sp.** Leclerc, 1815

Familia TRIGONOPYXIDAE Loeblich y Tappan, 1964

Cyclopyxis eurystoma* var. *parvula Bonnet y Thomas, 1960

Phylum ¿?

Orden EUGLYPHIDA Copeland, 1956

Familia EUGLYPHIDAE Wallich, 1864

Euglypha filifera Penard, 1902

Tracheleuglypha dentata (Penard, 1890)

Familia TRINEMATIDAE Hoogenraad y De Groot, 1940

***Trinema* sp.** Dujardin, 1841

Phylum ¿?

Familia CHLAMYDOPHRYIDAE de Saedeleer, 1934

***Chlamydophrys* sp.** Cienkowski, 1876

Phylum HELIOZOA Haeckel, 1866

Orden CENTROHELIDA Kühn, 1926

Familia ACTINOPHRYIDAE Claus, 1874

Actinophrys sol Ehrenberg, 1830

1.3 Comparación de la diversidad de protozoos entre los biotopos.

La riqueza específica de protozoos para cada biotopo se observa en la tabla 2 y en la figura 55. La mayor riqueza específica correspondió al musgo con 30 especies y la menor riqueza se presentó en el suelo con 10 especies (Fig. 56a).

La distribución de las especies por biotopo se muestra en la tabla 3, donde se observa que algunas especies fueron registradas sólo en un biotopo, en el caso del agua hubo dos flagelados (*Distigma* sp. y *Peranema* sp.), mientras que para el suelo hubo tres ciliados que sólo se encontraron en este sustrato (*Euplotes* sp., *Leptopharynx costatus* y *Colpoda colpidiopsis*). En lo que respecta al guano, sólo hubo un ciliado (*Uronema nigricans*) y una amiba testada viviendo exclusivamente sobre él (*Cryptodiffugia* sp.). En el musgo fue donde se encontró el mayor número de especies exclusivas de este sustrato, una de las cuales fue un flagelado (*Entosiphon* sp.), cuatro fueron ciliados (*Aspidisca cicada*, *Spathidium lionotiforme*, *Coleps hirtus* y *Paramecium caudatum*), dos correspondieron a amibas desnudas (*Thecamoeba* sp. y *Mayorella* sp.) y cinco a amibas testadas (*Arcella* sp., *Cyclopyxis eurystoma* var. *Parvula*, *Tracheleuglypha dentata*, *Euglypha filifera* y *Chlamydophrys* sp.) (Fig. 56b).

Sólo dos especies se encontraron viviendo sobre todos los sustratos y fueron *Bodo* sp., que es un flagelado y el ciliado *Colpoda aspera*.

Tabla 2. Riqueza específica de protozoos de vida libre encontrados en cada biotopo de la Cueva de Los Riscos en las seis recolectas (noviembre 2005-junio 2007).

	AGUA	SUELO	GUANO	MUSGO
Flagelados	6	2	4	2
Ciliados	12	6	4	15
Amibas desnudas	5	1	4	5
Amibas testadas	1	1	1	7
Heliozoos	1	0	0	1
TOTAL	25	10	13	30

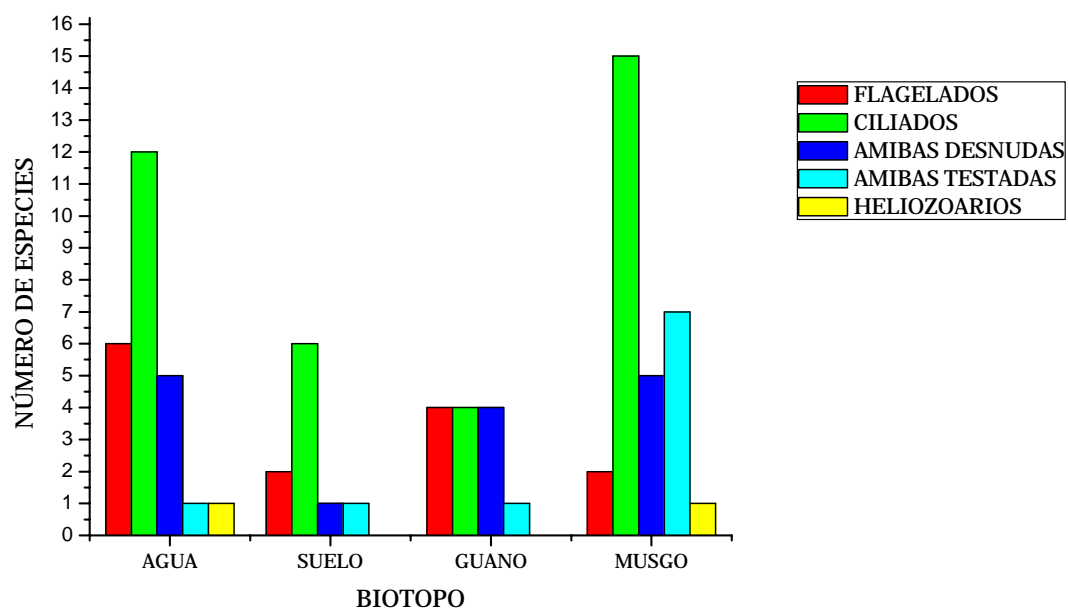


Figura 55. Riqueza específica de protozoos de vida libre en cada biotopo de la cueva de Los Riscos.

Tabla 3. Cuadro comparativo de protozoos de vida libre encontrados en los distintos sustratos estudiados en la Cueva de Los Riscos, Qro., México.

Género-Especie/Biotopo	Agua	Suelo	Guano	Musgo
FLAGELADOS				
<i>Astasia</i> sp.	X		X	
<i>Distigma</i> sp.	X			
<i>Entosiphon</i> sp.				X
<i>Heteronema</i> sp.	X	X	X	
<i>Peranema</i> sp.	X			
<i>Bodo</i> sp.	X	X	X	X
<i>Cercomonas</i> sp.	X		X	
CILIADOS				
<i>Aspidisca cicada</i> ³				X
<i>Euplotes</i> sp.		X		
<i>Oxytricha fallax</i> ³	X			X
<i>Pseudokeronopsis flavicans</i> ³	X	X		X
<i>Uroleptus piscis</i> ³	X			X
<i>Litonotus fusidens</i> ³	X			X
<i>Spathidium lionotiforme</i> ³				X
<i>Leptopharynx costatus</i> ³		X		
<i>Drepanomonas revoluta</i> ³	X			X
<i>Colpoda aspera</i> ³	X	X	X	X
<i>Colpoda colpidiopsis</i> ³		X		
<i>Colpoda eucaudata</i> ³	X			X
<i>Colpoda inflata</i> ³	X	X		X
<i>Coleps hirtus</i> ¹				X
<i>Paramecium caudatum</i> ²				X
<i>Uronema nigricans</i> ³			X	
<i>Cyclidium pellucidum</i> ³	X			X
<i>Tetrahymena pyriformis</i> ³	X		X	X
<i>Vorticella striata</i> ³	X		X	
<i>Vorticella globosa</i> ³	X			X

Género-Especie/Biotopo	Agua	Suelo	Guano	Musgo
AMIBAS DESNUDAS				
<i>Vahlkampfia</i> sp.	X		X	X
<i>Naegleria</i> sp.	X		X	
<i>Tetramitus</i> sp.	X		X	
<i>Hartmannella vermiformis</i> ³	X	X		
<i>Thecamoeba</i> sp.				X
<i>Mayorella</i> sp.				X
<i>Lingulamoeba</i> sp.	X			X
<i>Acanthamoeba</i> sp.			X	X
AMIBAS TESTADAS				
<i>Arcella</i> sp.				X
<i>Cryptodiffugia</i> sp.			X	
<i>Diffugia</i> sp.	X			X
<i>Cyclopyxis eurystoma</i> var. <i>parvula</i> ³				X
<i>Tracheleuglypha dentata</i> ³				X
<i>Euglypha filifera</i> ³				X
<i>Trinema</i> sp.		X		X
<i>Chlamydophrys</i> sp.				X
HELIOZOOS				
<i>Actinophrys sol</i> ²	X			X

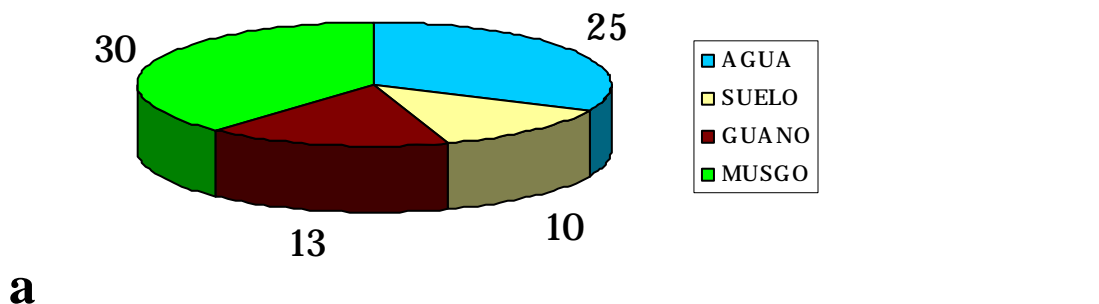
X – Biotopo donde se encontró el género o la especie

1. Nuevo registro mundial en cuevas

2. Nuevo registro en cuevas para México

3. Nuevo registro en cuevas mundial y para México

Total de especies encontradas en cada biotopo



Número de especies exclusivas de un biotopo

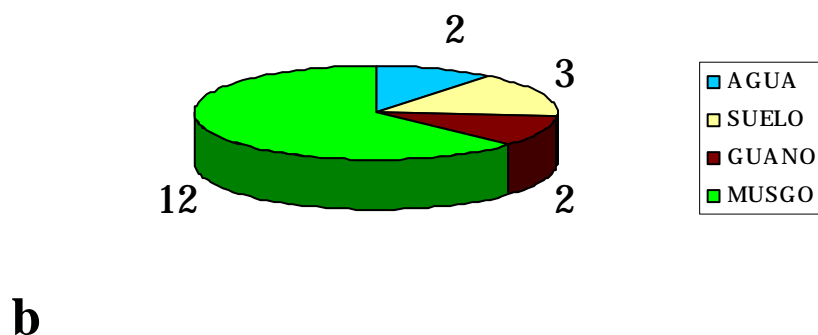


Figura 56. *a*, Total de especies encontradas en cada biotopo, *b*, número de especies exclusivas de un biotopo.

2. PROTOZOOS ENDOPARÁSITOS DE MURCIÉLAGOS

En total se recolectaron 29 murciélagos hematófagos, de los cuales 23 corresponden a la especie *Dyphilla eucaudata* y cinco a la especie *Desmodus rotundus*; un murciélago no fue identificado (Tabla 4). Se realizó el frotis de la sangre obtenida de 25 murciélagos y a 23 se les hizo la prueba de hemoaglutinación. Se realizó el corte histológico de siete corazones, de los cuales se obtuvieron 121 preparaciones teñidas (Tabla 5).

Tabla 4. Datos de las recolectas para protozoos endoparásitos de murciélagos

BIOTOPO	2006		2007		
	Junio	Octubre	Marzo	Junio	Octubre
Murciélago	Número de Individuos				
<i>Diphylla eucaudata</i>	2	NC	19	1	1
<i>Desmodus rotundus</i>	NC	1	4	NC	NC
¿?	NC	NC	NC	NC	1

NC – No recolectado

Tabla 5. Pruebas realizadas para diagnóstico de parásito

NR- Prueba no realizada

ESPECIE	FECHA	TOTAL DE INDIVIDUOS RECOLECTADOS	SEXO		No. de murciélagos a los que se les aplicó la prueba de:		
			MACHOS	HEMBRAS	FROTIS	HEMO_ AGLUTINACIÓN	CORTE HISTOLÓGICO
<i>Diphylla eucaudata</i>	2006 Junio	2	2	0	2	NR	2
	2007 Marzo	19	3	1?	15	18	2
	Junio	1	0	1	NR	NR	1
	Octubre	1	1	0	NR	NR	1
<i>Desmodus rotundus</i>	2006 Octubre	1	0	1	1	1	NR
	2007 Marzo	4	3	1	4	4	NR
Sp???	2007 Octubre	1	0	1	NR	NR	1

En ninguno de los frotis realizados se encontraron parásitos, mientras que en los papeles filtro procesados con la técnica de hemoaglutinación indirecta cuantitativa se encontraron sólo tres muestras correspondientes a los murciélagos *D. eucaudata*, recolectados en junio de 2006 y *D. rotundus*, recolectado en octubre de ese mismo año, que apenas superaron el límite de reactividad (un individuo de *D. eucaudata* tuvo 1:32 y el otro 1:64, al igual que el individuo de *D. rotundus*) pudiéndose considerar como positivos; en el resto de las muestras estuvo por debajo de esto, dando resultados negativos. En cuanto a los cortes histológicos de corazón revisados al microscopio, también se obtuvieron resultados negativos al no encontrarse ninguna fase del ciclo de vida del parásito tripanosomátido. En la última recolecta se encontró una tercera especie de murciélago, que no estaba registrada para la cueva ni había sido capturada en las recolectas anteriores, de la cual se sacrificó a un individuo al que se le extrajo el corazón para realizar los cortes histológicos, en ninguno de los cuales se encontró evidencia de la presencia del parásito.

VII. DISCUSIÓN

A la fecha, el número de cuevas exploradas en México para realizar el registro de protozoos es escaso y no existen trabajos orientados a la comparación de la riqueza específica en diferentes biotopos. Para el caso de la cueva de los Riscos, en el presente trabajo se identificaron 24 especies y 20 géneros de protozoos de vida libre distribuidos en los distintos sustratos. Como se puede observar en la tabla 2 y figura 55, el biotopo donde se presentó la mayor diversidad de ciliados y amibas testadas fue el musgo, mientras que el número de especies de amibas desnudas fue igual en el musgo y el agua; en el caso de los flagelados, fueron más abundantes en la muestra de agua. El biotopo con el menor número de especies fue el suelo, en donde el grupo de protozoos con el mayor registro de especies estuvo representado por los ciliados (Fig. 56a).

En realidad el sustrato “universal” es el agua, ya sea que esté sobre el suelo o musgo, pues en sí donde viven los protozoos es en esa delgada película de agua que se forma sobre estos sustratos, la diferencia está en quien aporta los nutrientes.

En general las especies de protozoos se distribuyeron en dos o más sustratos, sin embargo como se puede observar en la figura 56b, existen pocas especies que viven exclusivamente sobre el agua, suelo o guano y su distribución fue muy notoria: dos especies de flagelados se presentaron sólo en el agua, mientras que en el suelo las especies observadas exclusivamente en ese sustrato correspondieron a ciliados; en el guano las especies exclusivas que se presentaron fueron un ciliado y una amiba testada. El caso del musgo destaca por el gran número de especies que lo habitaron y que incluye a representantes de todos los grupos: flagelados, ciliados, amibas desnudas, testadas y heliozoos (Tabla 3). Esto se puede explicar debido a que el musgo aporta una gran cantidad de nutrientes comparado con los demás biotopos, que le permiten sostener comunidades más grandes, por ejemplo de ciliados, que no podrían mantenerse con el pequeño aporte energético de otro biotopo.

Se registraron dos especies distribuidas en todos los sustratos, que corresponden a un flagelado y a un ciliado (*Bodo* sp. y *Colpoda aspera*), que

toleran amplios intervalos de condiciones y por tanto se adaptan fácilmente a cualquier sustrato que les proporcione lo mínimo para vivir.

Es fácilmente entendible que el biotopo más diverso (y abundante para algunos grupos) sea el musgo, debido a que es el único biotopo que provee a los protozoos de una cantidad constante de nutrientes proporcionados por medio de la planta en sí y sus reacciones de fotosíntesis, sin embargo sólo se encontró en la boca y cerca de las entradas de la cueva, debido a su dependencia de la luz solar para sobrevivir.

Ya que las plantas superiores no pueden vivir en la obscuridad total y permanente, la cual impera en las profundidades de las cuevas, entonces la fauna debe de encontrar otra fuente de alimento, mismo que es escaso con frecuencia. Las hojas, ramas y suelo que lleva el viento a las cuevas o son arrastradas por corrientes de agua, constituyen una de las fuentes alimenticias más importantes. La otra fuente de igual provecho la proveen los murciélagos en forma de guano. Los hábitos alimenticios de los murciélagos pueden ser frugívoros, insectívoros, polinívoros, nectarípagos, hematófagos, carnívoros e incluso piscívoros, siendo por ello, que entre los demás habitantes cavernícolas sean los que aporten mayor cantidad de material orgánico a las cuevas (Hoffmann *et al.*, 1986). Aún así en este estudio el guano presentó muy baja diversidad en general, aunque esto podría ser entendible al considerar que las dos especies de murciélagos que habitan esta cueva (*Desmodus rotundus* y *Dyphilla eucaudata*) son de hábitos hematófagos, por lo que, las características del guano podrían resultar un tanto más hostiles para el establecimiento de los distintos grupos de protozoos.

Aunque se considera que en un cuerpo de agua que se encuentra al interior de una cueva hay condiciones muy limitantes debido a que la ausencia de luz no permite la existencia de organismos fotosintetizadores (Morales-Malacara y Vázquez, 1983) para todos los grupos de protozoos encontrados en las muestras de agua de los Riscos, su diversidad superó a la encontrada en suelo y guano. Para este estudio se tomaron muestras de agua tanto de charcos como del gour de agua permanente y al menos en el caso del gour la alta diversidad se puede explicar por la presencia de grupos de vertebrados como peces, quienes junto con algunos otros metazoos formaban una biocenosis que permitía el flujo y reciclaje constante de los escasos nutrientes. Esto se pudo

comprobar al muestrear en distintas ocasiones el gour, ya que en la primera ocasión se encontró una población mediana de peces (de alrededor de 10 individuos) y en los cultivos se registró una gran abundancia de ciliados, mientras que en los subsecuentes muestreos, ésta población de peces fue disminuyendo hasta desaparecer, lo que a su vez se tradujo en los cultivos como una disminución en la diversidad y abundancia de protozoos encontrados. Cabe recordar que este cuerpo de agua se encontraba en una zona de total obscuridad, que por tanto no tenía aporte energético de organismos fotosintetizadores.

Por otra parte los microhábitats pueden ser vistos como islas miniatura que son rápidamente colonizados por protozoos, donde el número total de especies sigue una curva de crecimiento con forma de S durante el tiempo. El número de especies colonizadoras decrece con el tiempo debido a que los nichos ecológicos disponibles son rápidamente ocupados (Bamforth, 1985). Este puede ser el caso de los pequeños charcos de agua que se formaban en las distintas zonas de la cueva donde el determinante puede ser que se agota el alimento, además de que el agua tiende a evaporarse y a la larga el charco disminuirá su tamaño hasta secarse y desaparecer, con posibilidad de la formación de quistes que colonizarán otros hábitats cuando haya condiciones favorables.

Si se observa lo que ocurre en otras cuevas donde se han estudiado las poblaciones de protozoos, como es el caso de las grutas de Aguacachil en Taxco, Guerrero, se puede notar que un fenómeno que afecta en gran medida a los organismos acuáticos es la estacionalidad de la abundancia de agua. Durante el período de lluvias la gruta de Aguacachil se ve materialmente inundada por una fuerte corriente de agua, misma que arrastra al interior una gran cantidad de organismos vivos, así como quistes de protozoos y de micrometazoos, durante una época son pocas las acumulaciones de agua, de manera que la reducida disponibilidad del sustrato favorable impide el desarrollo de comunidades de especies, tales como amibas, habitantes del detritus. Al cesar las lluvias, la corriente exterior deja de fluir y la entrada de nuevos organismos se reduce, por lo que el agua tiende a acumularse en pequeñas pozas que se pueden considerar como cuerpos de agua estancada; es entonces que las poblaciones alcanzan su mayor desarrollo, observándose además mayor diversidad (Morales-Malacara y Vázquez, 1982a). Algo que se pudo observar en los cultivos del estudio de los

Riscos es que en algunas recolectas los cultivos de agua de charcos fueron incluso más diversos que los cultivos de agua del gour y aunque esta cueva no se inunda con la llegada de la estación de lluvias, si aumenta el flujo de agua por medio de escurrimientos. La cantidad de agua también influirá en que tan diluido se encuentre el alimento.

Sin embargo, en Aguacachil estas comunidades no disponen de mucho tiempo para prosperar, la nueva época de lluvias provoca otra vez la fuerte corriente que arrastra a las comunidades en formación. Cabe suponer entonces que cada año las poblaciones de protozoos difieren de la de otros años (Morales-Malacara y Vázquez, 1982a). Este fenómeno de rotación de especies a lo largo del año también fue observado en los Riscos y aunque algunas especies persistieron a lo largo de las distintas recolectas, otras tantas, sobre todo de ciliados, aparecieron sólo en alguno de los muestreos.

En cuanto a las especies de ciliados que se observaron, las distintas especies del género *Colpoda* fueron las que estuvieron más constantes a lo largo del año y en los diversos biotopos, en particular *C. aspera*, lo cual se podría explicar dado que en experimentos en laboratorio los quistes de este género de ciliado pueden persistir a muy bajas temperaturas (Hausmann y Hülsmann, 1996), que es lo que prevalece en la cueva, dado que no hay gran cantidad de murciélagos cuya presencia genere mucho calor, por lo que en general el promedio de temperatura dentro de la cueva es bajo.

Un aspecto importante es que no se encontró en el suelo una gran diversidad de amibas testadas, biotopo donde normalmente son encontradas incluso en abundancia. Esto puede responder a que el suelo es prácticamente toda la cueva está muy compacto, dejando así poco o nada de espacio para que cualquier organismo viva entre sus partículas, de forma que en el suelo se encontró una baja diversidad de amibas testadas e inclusive de amibas desnudas, las cuales sólo requieren, alrededor de 5 μm como la mínima altura de la película de agua en la cual pueden sobrevivir (Hausmann y Hülsmann, 1996). De manera contrastante el único grupo que logró establecerse presentando mayor número de especies fueron los ciliados.

En hábitats que contienen materia orgánica en descomposición frecuentemente ocurre la siguiente sucesión: flagelados sin pigmentos y *Colpoda*, ciliados no sésiles y peritricos. Una sucesión de varias especies de

organismos ameboides acompañan esta sucesión (Bamforth, 1985). En la mayoría de los cultivos se observó esta sucesión, lo que nos reitera que dentro de una cueva, para el caso de los protozoos, los procesos de colonización ocurren de manera constante.

Los protozoos heterótrofos de vida libre se alimentan de casi cualquier tipo de materia orgánica, para ellos, el factor limitante más importante para la captura del alimento es la arquitectura del aparato bucal. Incluso diferentes especies del mismo género de ciliados son capaces de filtrar intervalos específicos del tamaño de partículas de alimento, permitiendo por tanto su coexistencia en el mismo hábitat (Hausmann y Hülsmann, 1996). En este estudio se encontró una gran diversidad de especies con diferentes hábitos tróficos, en particular algunas pertenecían a un mismo género (como el caso del género *Colpoda*) y se encontraron distribuidas en todos los biotopos, pudiendo coexistir al menos dos especies dentro del mismo biotopo.

En relación a la morfometría de las especies, fue notable que las tallas en la mayoría de las especies estuvieron por debajo o en el límite del intervalo que se indicaba en las descripciones originales respectivas. Este hecho no es posible explicarlo pero podría corresponder a una adaptación a diversas condiciones adversas que presenta una cueva, como pueden ser la escasez de nutrientes o inclusive al ambiente oscuro y un tanto anaerobio que predomina en la cueva.

De las especies identificadas, como se observa en la tabla 3, sólo dos cuentan con un registro previo en cuevas del mundo (*Paramecium caudatum* y *Actinophrys sol*) (Golemansky y Bonnet, 1994) y una con un registro en México, de cueva Chica en San Luis Potosí (*Coleps hirtus*) (Osorio-Tafall, 1943). De las especies de ciliados identificadas, 17 son un registro nuevo en cuevas tanto para el mundo como para México, al igual que una amiba desnuda (*Hartmannella vermiformis*) y tres amibas testadas (*Tracheleuglypha dentata*, *Euglypha filifera* y *Cyclopyxis eurystoma* var. *parvula*), mientras que el heliozoo identificado es un nuevo registro para cuevas de México (Golemansky y Bonnet, 1994; Hoffmann *et al.*, 1986 y Osorio-Tafall, 1943). Este número, al menos en lo que respecta a los ciliados, representa un alto porcentaje de las especies identificadas. En cuanto a la cueva en específico, se cuenta con un registro previo de cuatro especies de ciliados realizado por Morales-Malacara y Vázquez (1986), las cuales corresponden a *Cyclidium glaucoma*, *Chilodonella* sp.,

Tetrahymena sp., *Cinetochilum* sp. y un flagelado no confirmado, probablemente del género *Bodo*. Como se observa, en los registros previos (Morales-Malacara y Vázquez, 1986) y el del presente trabajo, se registraron especies de los géneros *Cyclidium* y *Tetrahymena*.

Las biocenosis de protozoos son inestables y pueden cambiar muy rápida y dramáticamente inclusive dentro de un día. Los protozoos con tiempos de reproducción de algunas horas utilizan rápidamente los recursos, por lo que sus poblaciones, sean amibas, flagelados o ciliados, tienden a colapsar tan rápido como se desarrollan. Además otros factores pueden afectar la densidad de las poblaciones de varias especies, como la aparición de metazoos depredadores (Hausmann y Hülsmann, 1996). Esta dinámica ocurre en cada biotopo y en especial en los pequeños charcos de agua y a pesar de que durante el presente estudio se cubrió más de un año de recolectas, para monitorear las especies presentes tanto en época de lluvias como de secas, lo que resulta de ésta dinámica de constante cambio en las poblaciones de protozoos es que, conforme continúa avanzando el tiempo, las poblaciones variarán de forma tal que sería complicado aseverar que los protozoos obtenidos son todas las especies que pueden vivir dentro de la cueva. De esta forma cuando se emprende el estudio de identificación de protozoos en una cueva, a pesar de la constancia de las condiciones ambientales, se debe considerar un lapso de tiempo de recolectas amplio, ya que en la mayoría de los registros anteriores en cuevas en México el estudio se realizaba con base en una o dos recolectas. Esto podría explicar la baja diversidad registrada comparado con el presente estudio, en el cual, los cultivos se mantuvieron desde el día de la recolecta hasta la conclusión del escrito lo que, en el caso de las primeras recolectas, representa poco más de dos años de cultivo, manteniéndolos a pesar de presentar ya poca abundancia y diversidad de especies. Para lograr el mantenimiento de las especies originales se realizaron una serie de resiembras en diferentes medios, utilizando en algunos casos incluso la concentración por centrifugación.

Cabe resaltar que la recolecta en la cual se registró mayor diversidad de especies fue la que se realizó en marzo de 2007, lo cual puede corresponder a que es justo el momento del cambio de estación de invierno a primavera, cuando en general las condiciones ambientales externas a la cueva son mejores, ya que hay buen clima y suficiente agua. A pesar de que este cambio estacional

no genera grandes cambios al interior de la cueva, es importante recordar que en su mayoría las especies de protozoos encontrados en los distintos biotopos de una cueva provienen del exterior y son transportados por corrientes de agua.

Para los protozoos endoparásitos se puede observar que prácticamente todos los resultados de las distintas pruebas fueron negativos. El examen de películas húmedas o secas de sangre provee sólo una somera guía de la verdadera prevalencia de una infección de *Trypanosoma*. Para validar los estudios se deben utilizar técnicas más sensibles, inmunológicas o moleculares-biológicas, para detectar antígenos y anticuerpos (Molyneux, 1991). En las pruebas realizadas en el presente estudio se intentó cubrir con esta inquietud acerca de cual es el mejor método para detectar la presencia de los parásitos teniendo tres distintos tipos de pruebas, incluyendo una de inmunoreacción que a pesar de ser indirecta es bastante confiable, ya que en las otras dos pruebas (que son directas porque dejan ver al parásito) es fácil que por el tratamiento que se les da, los individuos que pudieran estar presentes en las muestras de sangre se pierdan en el proceso. Otras técnicas hasta el momento utilizadas para la detección del parásito por medio de antígenos parasitarios y/o anticuerpos son: centrifugación de hematocrito, cromatografía con Dae-celulosa, inoculación de ratones de laboratorio, ELISA, y PCR con ADN tripanosomal. También existe el cultivo, el cual se realiza inoculando sangre en medio mínimo esencial (MEM) con sales de Earle y suplementado con suero equino por un período mínimo de seis semanas (Rojas, 2005). Por dificultades logísticas no se pudo implementar esta última técnica de cultivo para la detección de *Trypanosoma* en los murciélagos de la cueva.

Aún con todo esto el tamaño de muestra de los murciélagos analizados fue significativo si consideramos que la población que ahí se encuentra es pequeña, por lo que hay bastante seguridad al afirmar que los individuos de la población de murciélagos hematófagos que habitan la cueva de los Riscos no se encuentran parasitados por protozoos de la familia Trypanosomatidae y que esas tres muestras que reaccionaron a la dilución límite para que sean consideradas como positivo, tuvieron una reacción cruzada con algún otro parásito.

VIII. CONCLUSIONES

La biodiversidad de protozoos habitantes de cuevas es poco estudiada en el mundo y en particular en México, a pesar del gran número de cuevas existentes y de fácil acceso.

Por medio de este trabajo se identificaron 44 protozoos de vida libre que habitan la cueva de los Riscos y que pueden desarrollarse en diferentes biotopos como el agua, suelo, guano y musgo, mostrando que el ambiente cavernícola puede ser muy favorable para su desarrollo.

Este es el registro más amplio, comparado con otras cuevas en donde se obtuvieron pocas especies, probablemente debido al escaso número de recolectas y al poco tiempo que se mantenían los cultivos.

A pesar de la gran diversidad encontrada, todas las especies registradas habitan normalmente en distintos hábitats epígeos (lo que significa que no existe ninguna troglobia) sino que penetran a la cueva por diversas situaciones, donde a pesar de ser en general un ambiente bajo en nutrientes logran establecerse y desarrollarse, lo cual será beneficioso para el resto de los habitantes de la cueva, ya que constituyen uno de los niveles más básicos de la red trófica haciendo disponibles los nutrientes del suelo y bacterias a organismos metazoos de mayor tamaño.

Por otro lado el estudio de las infecciones en murciélagos causadas por protozoos, en especial del género *Trypanosoma*, es un tema de suma importancia en salud pública si consideramos la frecuencia con la que una cueva es visitada por motivos ya sea científicos, religiosos o simplemente de recreación y a eso le añadimos que los murciélagos suelen salir a buscar su alimento que puede consistir en sangre de diversos vertebrados, como es el caso de las especies encontradas en esta cueva, impactando muchas veces económicamente a los pobladores cercanos a la cueva al causar infecciones al ganado. Es por esto que también resulta importante continuar con el estudio de estos protozoos en las diferentes especies de murciélagos habitantes de cuevas.

El presente trabajo contribuye con nuevas especies que no se encontraban registradas ni a nivel mundial ni en México y sobre todo considera distintos biotopos dentro de una cueva a los cuales casi no se les había prestado atención, haciendo además una comparación entre ellos.

RECOMENDACIONES

Es importante realizar más estudios de este tipo, para conocer mejor la diversidad de protozoos que pueden habitar las cuevas, incrementando así los escasos registros existentes en México y permitiendo a futuro sacar conclusiones más generales que nos permitan utilizarlos, por ejemplo, como bioindicadores del estado de conservación de una cueva o inclusive como fuente de información acerca de la diversidad exterior.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aladro-Lubel, M. A. 2006. *Principales clasificaciones de los Protozoos*. Las prensas de ciencias, México. 90 pp.
- Aladro-Lubel, M. A., R. Mayén-Estrada y M. Reyes-Santos. 2006. *Listados faunísticos de México. XI. Registro actualizado de ciliados (Agosto, 2004)*. Instituto de Biología, UNAM, México. 97 pp.
- Bamforth, S. S. 1985. *Ecology of Protozoa*. En: Lee, J. J. , E. C. Bovee y S. H. Hutner (eds.). An illustrated guide to the Protozoa. Allen Press, Lawrence, Kansas. pp. 8-15.
- Borror, A. C. 1969. Application of the stain-fixative Nigrosin-HgCl₂-Formalin to fragile or contractile ciliates. *Transactions of the American Microscopy Society*, 88 (3): 454-458.
- Borror, A. C. y B. J. Wicklow. 1983. The suborder Urostylina Jankowski (Ciliophora, Hypotrichida): morphology, systematics and identification of species. *Acta Protozoologica*, 22 (2): 97-126.
- Cavalier-Smith, T. 1993. Kingdom Protozoa and its 18 Phyla. *Microbiological Reviews*, 57 (4): 953-994.
- Constantine, D.G. 1970. *Bats in relation to the health, welfare, and economy of man*. En: Wimsatt, W.A. (ed.). Biology of Bats. Vol II. Academic Press, New York. pp. 337-342.
- Corliss, J. O. 1979. *The ciliated Protozoa. Characterization, classification and guide to the literature*. Pergamon Press, Oxford. 455 pp.
- Corliss, J. O. 1994. An interim utilitarian hierarchical classification and characterization of the Protists. *Acta Protozoologica*, 33: 1-51.
- Corliss, J.O. 2002a. A salute to Antony van Leeuwenhoek of Delft, most versatile 17th century founding father of Protistology. *Protist*, 153: 177-190.
- Corliss, J.O. 2002b. Biodiversity and biocomplexity of the Protists and an overview of their significant roles in maintenance of our biosphere. *Acta Protozoologica*, 41: 199-219.
- Estrada, F. E., Z. L. Peralta y M. P. Rivas. 1982. *Manual de técnicas histológicas*.

- AGT Editor, México. 140 pp.
- Finlay, B.J., G.F. Esteban y T. Fenchel. 1998. Protozoan diversity: Converging estimates of global number of free-living ciliate species. *Protist*, 149: 29-37.
- Foissner, W. 1993. *Colpodea (Ciliophora)*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 798 pp.
- Foissner, W., H. Blatterer, H. Berger y F. Kohmann. 1991. *Taxonomische und ökologische revision der Ciliaten des saprobiensystems. Band I. Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichida, Colpodea*. Informationsberichte des Bayer, Landesamtes für Wasserwirtschaft. Heft 1/91. 478 pp.
- Foissner, W., H. Berger y F. Kohmann. 1992. *Taxonomische und ökologische revision der Ciliaten des saprobiensystems. Band II. Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida*. Informationsberichte des Bayer, Landesamtes für Wasserwirtschaft. Heft 5/92. 502 pp.
- Foissner, W., H. Berger y F. Kohmann. 1994. *Taxonomische und ökologische revision der Ciliaten des saprobiensystems. Band III. Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida*. Informationsberichte des Bayer, Landesamtes für Wasserwirtschaft. Heft I/94. 548 pp.
- Foissner, W., H. Berger y F. Kohmann. 1995. *Taxonomische und ökologische revision der Ciliaten des saprobiensystems. Band IV. Gymnostomatea, Loxodes, Suctoria*. Informationsberichte des Bayer, Landesamtes für Wasserwirtschaft. Heft I/95. 540 pp.
- Foissner, W. y H. Berger. 1996. A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology*, 35: 375-482.
- Gaviño, T.G., L.C. Juárez y T.H.H. Figueroa. 1977. *Técnicas biológicas selectas de laboratorio y de campo*. Limusa, México. 251 pp.
- Golemansky, V. y L. Bonnet. 1994. *Protozoa*. En: Juberthie, C. y V. Decu (eds.). *Encyclopaedia Bioespeologica*. Société de Biospéologie, Francia. pp. 23 -33.
- Hausmann, K. y N. Hülsmann. 1996. *Protozoology*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 338 pp.
- Hill, J.E. y J.D. Smith. 1992. *Bats, a natural history*. University of Texas Press,

- Austin, Texas. 169 pp.
- Hoffmann, A., V. J. G. Palacios y J. B. Morales-Malacara. 1986. *Manual de Bioespeleología*. UNAM, México. 274. pp.
- Honigberg, B.M., W. Balamuth, E.C. Bovee, J.O. Corliss, M. Gojdics, R.P. Hall, R.R. Kudo, N.D. Levine, A.R. Loeblich Jr., J. Weiser y D.H. Wenrich. 1964. A revised classification of the phylum Protozoa. *Journal of Protozoology*, 11: 7-20.
- Kahl, A. 1930-1935. *Urtiere oder Protozoa. I. Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria) eine Bearbeitung der freilebenden und ectocommensalen Infusorien der Erde, unter Ausschluss der marinen Tintinnidae*. En: Dahl, F. (Ed.). Die Tierwelt Deutschlands, G. Fischer, Jena. Teil 18, 21, 25, 30.
- Kudo, R. R. 1971. *Protozoology*. Charles C. Thomas Pub., Springfield, Illinois. 1174 pp.
- Lazcano, S.C. 1986. *Las Cavernas de la Sierra Gorda*. Universidad Autónoma de Querétaro, México. 250 pp.
- Lee, J.J., S. H. Hutner y E. C. Bovee. 1985. *An illustrated guide to the Protozoa*. Allen Press, Lawrence, Kansas. 629 pp.
- Lee, J. J., G. F. Leedale y P. Bradbury. 2000. *An illustrated guide to the Protozoa*. Vol. 1 y 2. Allen Press, Lawrence, Kansas. 1432 pp.
- Leedale, G. F. 1967. *Euglenoid Flagellates*. Prentice Hall, New Jersey. 242 pp.
- Leedale, G.F. y K. Vickerman. 2000. *Phylum Euglenozoa*. En: Lee, J. L., G. F. Leedale y P. Bradbury (eds.). *An illustrated guide to the Protozoa*. Vol. 1 y 2. Allen Press, Lawrence, Kansas. pp. 1135-1185.
- Levine, N.D., J.O. Corliss, F.E.G. Cox, G. Deroux, J. Grain, B.M. Honigberg, G.F. Leedale, A. R. Loeblich, J. Lom, D. Lynn, E. G. Merinfeld, E. C. Page, G. Poljansky, V. Sprague, J. Vavra, y F. G. Wallace. 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology*, 27 (1):37-58.
- Lynn, D.H. y E.B. Small. 2000. *Phylum Ciliophora*. En: Lee, J. L., G. F. Leedale y P. Bradbury (eds.). *An illustrated guide to the Protozoa*. Vol. 1 y 2. Allen Press, Lawrence, Kansas. pp. 371-656.
- López-Ochoterena, E. 1965. Ciliados mesosapróbicos de Chapultepec. (Sistemática, Morfología, Ecología). *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 26: 115-247.

- Madrazo-Garibay, M., E. López-Ochoterena, G. Rico-Ferrat, y G. Serrano-Limón. 1986. Especies del Phylum Sarcomastigophora asociadas a animales y plantas silvestres, estudiadas en México. I. Relación taxonómica y bibliográfica. *Anales del Instituto de Biología, Serie Zoología*, 58 (2): 843-852.
- Meisterfeld, R. 2000a. *Order Arcellinida*. En: Lee, J. L., G. F. Leedale y P. Bradbury (eds.). An illustrated guide to the Protozoa. Vol. 1 y 2. Allen Press, Lawrence, Kansas. pp. 827-860.
- Meisterfeld, R. 2000b. *Testate amoebae with filopodia*. En: Lee, J. L., G. F. Leedale y P. Bradbury (eds.). An illustrated guide to the Protozoa. Vol. 1 y 2. Allen Press, Lawrence, Kansas. pp. 1054-1084.
- Mikrjukov, K.A., F.J. Siemensma y D.J. Patterson. 2000. *Phylum Heliozoa*. En: Lee, J. L., G. F. Leedale y P. Bradbury (eds.). An illustrated guide to the Protozoa. Vol. 1 y 2. Allen Press, Lawrence, Kansas. pp. 860-871.
- Molyneux, D.H. 1991. *Trypanosomes of Bats*. En: Kreier, J.P. y J.R. Baker. (eds.). Parasitic Protozoa. Vol. 1. Academic Press, San Diego, 2ª edición. 195-pp. 223.
- Morales-Malacara, J.B. y S.A. Losoya. 1989-1990. *Bioespeleología de la Región de Orizaba, Veracruz*. Zoología, Biología de campo, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 134 pp.
- Morales-Malacara, J.B. y R.I.M. Vázquez. 1982a. *Bioespeleología de la Gruta de Aguacachil, Taxco, Guerrero*. Zoología No. 14, Biología de campo, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 77 pp.
- Morales-Malacara, J.B. y R.I.M. Vázquez. 1982b. *Bioespeleología de la Gruta de Aguacachil, Taxco, Guerrero*. Zoología No. 111, Biología de campo, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 84 pp.
- Morales-Malacara, J.B. y R.I.M. Vázquez. 1983. *Bioespeleología de la gruta de Juxtlahuaca, Guerrero*. Zoología No.13, Biología de campo, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 92 pp.
- Morales-Malacara, J.B. y R.I.M. Vázquez. 1983-1984. *Bioespeleología de la gruta "La Joya", Taxco, Guerrero*. Zoología No. 110, Biología de campo, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 110 pp.
- Morales-Malacara, J.B. y R.I.M. Vázquez. 1985. *Bioespeleología de la gruta de*

- la Mariposa, Tetipac, Guerrero*. Zoología No. 116, Biología de campo, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 71 pp.
- Morales-Malacara, J.B. y R.I.M. Vázquez. 1986. *Bioespeleología de algunas cuevas del estado de Querétaro*. Zoología No. 127, Biología de campo, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 145 pp.
- Osorio-Tafall, B. F. 1943. Observaciones sobre la fauna acuática de las cuevas de la región de Valles, San Luis Potosí (México). *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 4 (1-2): 43-71.
- Page, F.C. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*. Freshwater Biological Association, Ambleside. 122 pp.
- Page, F.C. y F.J. Siemensma. 1991. *Nackte Rhizopoda und Heliozoa*. Fischer Verlag, Stuttgart. 297 pp.
- Pätsch, B. 1974. Die Aufwuchsciliaten des naturlehrparks haus wildenrath. Monographische Bearbeitung der Morphologie und Ökologie. *Arbeiten aus dem Institut für Landwirtschaftliche Zoologie und Bienenkunde*, 1: 1-82.
- Patterson, D.J. 2000. *Changing views of protistan systematics: the taxonomy of Protozoa-an overview*. En: Lee, J. L., G. F. Leedale y P. Bradbury (eds.). *An Illustrated guide to the Protozoa*. Vol. 1 y 2. Allen Press, Lawrence, Kansas. pp. 2-9.
- Patterson, D. J. y J. Larsen (Eds.). 1991. *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. Clarendon Press, Oxford. 505 pp.
- Patterson, D.J. y S. Hedley. 1992. *Free-living freshwater Protozoa. A colour guide*. Wolfe Pub, Londres. 223 pp.
- Patterson, D.J., A. Rogerson y N. Vørs. 2000a. *Class Heterolobosea*. En: Lee, J. L., G. F. Leedale y P. Bradbury (eds.). *An illustrated guide to the Protozoa*. Vol. 1 y 2. Allen Press, Lawrence, Kansas. pp. 1104-1111.
- Patterson, D.J., N. Vørs, A.G.B. Simpson y C. O'Kelly. 2000b. *Residual free-living and predatory heterotrophic flagellates*. En: Lee, J. L., G. F. Leedale y P. Bradbury (eds.). *An illustrated guide to the Protozoa*. Vol. 1 y 2. Allen Press, Lawrence, Kansas. pp. 1302-1328.
- Reddell, J. R. 1981. A review of the cavernicole fauna of Mexico, Guatemala and Belize. *Bulletin of the Texas Memorial Museum*, 27: 69-70.

- Rogerson, A. y D. J. Patterson. 2000. *The naked ramicristate amoebae (Gymnamoebae)*. En: Lee, J. L., G. F. Leedale y P. Bradbury (eds.). An illustrated guide to the Protozoa. Vol. 1 y 2. Allen Press, Lawrence, Kansas. pp. 1023-1053.
- Rojas, A. 2005. *Desmodus rotundus* (Chiroptera:Phillostomidae) como vector y reservorio de *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma equiperdum* en América Latina. *Revista de la Asociación de Veterinarios de Vida Silvestre*, 1 (1): 10-13.
- Scamardella, J.M. 1999. Not plants or animals: a brief history of the origin of Kingdoms Protozoa, Protista and Protoctista. *International Microbiology*, 2: 207-216.
- Silva-Neto, I. D. 2000. Improvement of silver impregnation technique (Protargol) to obtain morphological features of protists ciliates, flagellates and opalinales. *Revista Brasileira de Biologia*, 60 (3): 451-459.
- Smirnov, A. V. y S. Brown. 2004. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistology*, 3 (3): 148-190.
- Smirnov, A.V. y A.V. Goodkov. 1999. An illustrated list of basic morphotypes of Gymnamoebia (Rhizopoda, Lobosea). *Protistology*, 1: 20-29.
- Warren, A. 1986. A revision of the genus *Vorticella* (Ciliophora: Peritrichida). *Bulletin of the British Museum of Natural History. (Zoology)*, 50 (1): 1-57.
- Wu, I. C .H. y C. R. Curds. 1979. A guide to the species of the genus *Aspidisca*. *Bulletin of the British Museum of Natural History. (Zoology)*, 36 (1): 1-34.

X. ANEXOS

ANEXO 1. Protozoos de cuevas en el mundo.

Géneros y especies de protozoos más comúnmente encontrados en cavernas (Golemansky & Bonnet, 1994).

PHYLUM EUGLENOZOA

Bodo

B. ovatus

B. saltans

B. edax

Chilomonas paramecium

Monas guttula

Oicomonas

O. termo

O. mutabilis

Cercobodo agilis

Mastigamoeba limax

Spiromonas angusta

Tetramitus rostratus

Peranema trichophorum

Syctomonas pussila

C. arcelloides

Diffugia

D. oblonga

D. lucida

D. globulosa

D. baradlana

D. oviformis

Trinema

T. lineare

T. enchelys

Euglypha

E. acanthophora

E. cristata

E. tuberculata

Trigonopyxis arcula

Heleopera petricola

Clase Granuloreticulosea

Borovina zernovi

PHYLUM RHIZOPODA

Clase Lobosea

Pelomyxa palustris

Amoeba

A. cavicola

A. radiosa

A. albida

A. guttula

A. vespertilio

Vahlkampfia

V. limax

V. magna

V. tachipodia

Astramoeba sp.

Centropyxis

C. aculeata

C. aerophila

C. cassis

C. discoides

C. laevigata

Cyclopyxis

C. eurystoma

PHYLUM HELIOZOA

Actinophryx

A. sol

A. vesiculata

Actinosphaerium eichhornii

Raphidiophrys sp.

PHYLUM CILIOPHORA

Chilodonella cucullulus

Paramecium caudatum

Cyclidium glaucoma

Colpoda steinii

Glaucoma scintillans

Halteria grandinella

Stylonichya mytilus

Vorticella sp.

Euplotes sp.

Spirostomum ambiguum

Oxytricha sp.

ANEXO 2. Protozoos de cuevas en México.

Registros publicados de protozoos en cuevas de México.

ESTADO CUEVA GÉNERO/ ESPECIE	San Luis Potosí	San Luis Potosí	Guerrero	Guerrero
	Cueva Chica	Los Sabinos	Aguacachil	Gruta de Juxtlahuaca
FLAGELADOS				
<i>Euglena</i> sp.			X	
<i>Astasia</i> sp.			X	
<i>Heteronema</i> sp.			X	
<i>Peranema</i> sp.			X	
<i>Gonyostomum</i> sp.			X	
<i>Chilomonas</i> sp.			X	
<i>Chlamydomonas</i> sp.			X	
<i>Volvox</i> sp.			X	
AMIBAS DESNUDAS				
<i>Amoeba</i> sp.	X			
<i>Vahlkampfia</i> sp.			X	
<i>Mayorella</i> sp.			X	
AMIBAS TESTADAS				
<i>Arcella</i> sp.			X	
<i>Arcella vulgaris</i>		X		
<i>Centropyxis aculeatus</i>	X	X		
<i>Euglypha</i> sp.			X	
CILIADOS				
<i>Coleps</i> sp.			X	
<i>Coleps</i> sp. cf. <i>hirtus</i>	X			
<i>Tetrahymena</i> sp.			X	X
<i>Colpidium</i> sp.			X	X
<i>Glaucoma</i> sp.			X	
<i>Paramecium aurelia</i>			X	X
<i>Cyclidium</i> sp.			X	X
<i>Vorticella</i> sp.			X	
<i>Vorticella</i> sp. cf. <i>microstoma</i>	X			
<i>Blepharisma</i> sp.			X	
<i>Metopus</i> sp.			X	
<i>Halteria</i> sp.			X	
<i>Uroleptus</i> sp.			X	X
<i>Stylonychia</i> sp.			X	X
HELIOZOARIOS				
<i>Actinophrys</i> sp.	X			
Citas	1	1	2	2

1 Osorio-Tafall (1943)

2 Hoffmann, *et al.* (1986)

Registros no publicados de protozoos en cuevas de México.

ESTADO	Veracruz	Guerrero	Guerrero	Guerrero	Guerrero	Querétaro
CUEVA	Ojo de Agua	La Joya	La Mariposa	Juxtlahuaca	Aguacachil	Los Riscos
FLAGELADOS						
Bodonidae		X				
<i>Anisonema</i> sp.	X					
<i>Chilomonas</i> sp.					X	
<i>Peranema</i> sp.						
<i>Heteronema</i> sp.						
<i>Monas guttula</i>	X					
<i>Monas</i> sp.	X					
<i>Bodo</i> sp.			X			¿?
<i>Bodo edax</i>	X					
<i>Euglena</i> sp.					X, XX	
<i>Rhynchomonas nasuta</i>	X					
<i>Astasia</i> sp.		X			X, XX	
<i>Gonyostomum</i> sp.					X, XX	
<i>Chlamydomonas</i> sp.					X, XX	
<i>Volvox</i> sp.					X, XX	
AMIBAS DESNUDAS						
<i>Amoeba radiosa</i>	X					
<i>Mayorella</i> sp.	X				X	
<i>Vahlkampfia</i> sp.					X	
<i>Vahlkampfia limax</i>	X					
AMIBAS TESTADAS						
Arcellidae		X				
<i>Arcella</i> sp.					X	
<i>Euglypha</i> sp.					X	

Registros no publicados de protozoos en cuevas de México (Continua).

ESTADO	Veracruz	Guerrero	Guerrero	Guerrero	Guerrero	Querétaro
CUEVA GÉNERO/ ESPECIE	Ojo de Agua	La Joya	La Mariposa	Juxtlahuaca	Aguacachil	Los Riscos
CILIADOS						
Enchelyidae		X				
<i>Coleps</i> sp.		X			X	
<i>Chaenea</i> sp.						
Chilodonellidae		X				
<i>Chilodonella</i> sp.						X
Tetrahymenidae		X				
<i>Tetrahymena</i> sp.				XX	X, XX	X
<i>Colpidium</i> sp.				XX	X	
<i>Glaucoma</i> sp.					X, XX	
Parameciidae		X				
<i>Paramecium</i> sp.			X		X, XX	
<i>Paramecium aurelia</i>				X	X	
<i>Cyclidium</i> sp.				XX	X	
<i>Cyclidium glaucoma</i>						X
<i>Cinetochilum</i> sp.						X
<i>Vorticella</i> sp.		X			X	
<i>Uroleptus</i> sp.				XX	X	
Holostichidae		X				
<i>Holosticha</i> sp.						
<i>Stylonychia</i> sp.		X		XX	X	
<i>Euplotes</i> sp.		X				
<i>Blepharisma</i> sp.					X, XX	
<i>Metopus</i> sp.					X	
<i>Halteria</i> sp.					X	
HELIOZOOS						
Heliozoa		X				
Citas	1	2	3	5	6, 7	4

NOTA: X-una especie sin identificar, XX- varias especies sin identificar

1. Morales-Malacara y Losoya (1989-1990)
2. Morales-Malacara y Vázquez (1983-1984)
3. Morales-Malacara y Vázquez (1985)
4. Morales-Malacara y Vázquez (1986)
5. Morales-Malacara y Vázquez (1983)
6. Morales-Malacara y Vázquez (1982a)
7. Morales-Malacara y Vázquez (1982b)

ANEXO 3. Desarrollo de las técnicas utilizadas.

3.1 Técnicas micrográficas para protozoos de vida libre.

■ Adhesión a portaobjetos (Silva-Neto, 2000)

REACTIVOS:

- Albúmina-glicerol de Mayer

- Calentar ligeramente un portaobjetos, colocar una gota de albúmina-glicerol en un extremo.
- Colocar sobre la gota el extremo de un cubreobjetos y dejar que se extienda a lo largo del borde. Procurar que se forme entre el portaobjetos y cubreobjetos un ángulo de aproximadamente 45 °.
- Con movimiento firme hacer el extendido. Este no debe presentar “escalones” o alguna otra irregularidad. Dejar secar a temperatura ambiente.
- A partir de aquí se pueden realizar distintas técnicas de tinción como protargol y hematoxilina.

■ Hematoxilina de Harris

REACTIVOS:

- Mezcla alcohol-formol 8:2 (alcohol absoluto y formol comercial)

- Hematoxilina de Harris

- Alcoholes graduales (70, 80 y 96 %) y alcohol etílico absoluto

- Xilol

- Preparar portaobjetos para adhesión.
- Agregar una pequeña gota de cultivo y dejar secar.
- Cubrir la preparación con alcohol-formol por 45 segundos.
- Lavar con agua destilada y escurrir dos veces, un minuto cada una.
- Agregar hematoxilina cubriendo toda la superficie de la muestra adherida y dejar de tres a cinco minutos.

- Lavar con agua destilada. Sin dejar secar observar al microscopio el grado de tinción.
- Lavar con agua destilada.
- Lavar con agua de la llave.
- Lavar con agua destilada.
- Deshidratar en alcoholes graduales 70/80/96/100 %, tres minutos en cada uno.
- Pasar a xilol por cinco minutos.
- Montar en Bálsamo de Canadá o Euparal.

■ Técnica de nitrato de plata de Klein (en Kudo, 1971)

REACTIVOS

- Nitrato de Plata al 5 %
 - Colocar una gota de cultivo sobre un portaobjetos y dejar secar.
 - Agregar una solución de nitrato de plata al 5 % durante cinco minutos.
 - Lavar dos veces con agua destilada.
 - Colocar el portaobjetos en una caja de Petri con agua destilada bajo la lámpara de rayos ultravioleta o al rayo del sol durante cinco minutos. Colocar una hoja blanca debajo de la caja de Petri.
 - Lavar con agua destilada.
 - Dejar secar al aire, montar.

■ Protargol (Silva-Neto, 2000)

REACTIVOS:

- Mezcla alcohol-formol 8:2 (alcohol absoluto y formol comercial)
- Protargol al 1 % Merck® para histología o microscopia
- Hidroquinona al 1 %
- Tiosulfato de sodio al 2.5 %
- Alcoholes graduales (70, 80 y 96 %) y alcohol etílico absoluto
- Xilol
 - Preparar portaobjetos para adhesión.
 - Agregar una pequeña gota de cultivo y dejar secar.

- Cubrir la preparación con alcohol-formol por 45 segundos.
- Lavar con agua destilada durante dos minutos.
- Poner en el fondo de una charola de vidrio con tapa papel filtro húmedo. Distribuir ahí las preparaciones.
- Cubrir las preparaciones con protargol.
- Incubar a 50-60 °C por 35 minutos, evitando que se evapore el protargol.
- Lavar las preparaciones rápidamente una a una con agua destilada.
- Pasar a la hidroquinona de 10-20 segundos.
- Pasar al tiosulfato de sodio al 2.5 % por 30 segundos. Si la impregnación es baja regresar al revelador.
- Lavar con agua destilada por un minuto.
- Deshidratar en alcoholes graduales 70/80/96/100 %, tres minutos en cada uno.
- Pasar a xilol por cinco minutos.
- Montar.

■ Butanol-Nigrosina (Borrer, 1969)

REACTIVOS:

- Solución de bicloruro de magnesio al 8 %
- Fijador Champy:
 - Acido crómico al 1 % 7 partes
 - Dicromato de potasio al 3 % 7 partes
 - Tetróxido de osmio al 2 % 4 partes
- T- butanol
- Nigrosina:
 - Solución acuosa al 0.5 %
- Alcoholes graduales (70,80 y 96 %) y alcohol etílico absoluto
- Xilol
 - Colocar los ciliados en bicloruro de magnesio al 8% de cinco a diez minutos para relajarlos.
 - Transferir a fijador Champy recién preparado de tres a quince minutos.

- Colocar una gota con los organismos de aproximadamente un centímetro de diámetro con la pipeta sobre el portaobjetos.
- Añadir inmediatamente una gota de la solución butanol-nigrosina (1:1).
- Deshidratar en alcoholes graduales 70/80/96/100 %, tres minutos en cada uno.
- Aclarar en xilol por cinco minutos.
- Montar.

3.2 Técnicas micrográficas, histológicas e inmunológicas para protozoos endoparásitos de murciélagos.

- Giemsa (Gaviño *et al.*, 1977)

REACTIVOS

- Metanol
- Colorante Giemsa® al 2.5%
 - Colocar una gota pequeña de sangre en el extremo de un portaobjetos.
 - Colocar sobre la gota el extremo de un cubreobjetos y dejar que se extienda a lo largo del borde. Procurar que se forme entre ambos un ángulo de aproximadamente 45 °.
 - Con movimiento firme hacer el extendido. Este debe cubrir aproximadamente, tres cuartas partes del portaobjetos y no presentar “escalones” o alguna otra irregularidad.
 - Dejar secar el extendido a temperatura ambiente.
 - Inclinar la preparación y escurrirle metanol para fijarla.
 - Cubrir la preparación con el colorante Giemsa por 10-15 minutos.
 - Lavar al chorro de agua de la llave, en forma suave y breve.
 - Dejar secar.
 - Observar en el microscopio con el objetivo 100x.

■ Tinción de hematoxilina-eosina para cortes histológicos (Estrada *et al.*, 1982)

REACTIVOS

- Hematoxilina de Hill
- Eosina
- Alcohol a distintas diluciones (50, 70 y 96 %) y absoluto
- Alcohol acidulado al 1%
- Xilol
- Carbonato de litio
- Agua corriente y destilada
 - Colocar los portaobjetos en una canastilla de tinción de caja Coplin.
 - Introducir la canastilla en dos cambios de xilol de cinco minutos cada uno.
 - Alcoholes graduales (absoluto, 96, 70 y 50 %) para hidratar el tejido, dos minutos en cada uno.
 - Agua destilada por dos minutos.
 - Teñir con hematoxilina por 15 minutos. Enjuagar en agua corriente por dos minutos. Si se sobretiñó el corte, colocarlo en alcohol acidulado para bajar la coloración y enjuagar nuevamente.
 - Realizar tres inmersiones rápidas en carbonato de litio. Enjuagar por dos minutos en agua destilada.
 - Alcohol al 50 % por dos minutos.
 - Eosina por 10 minutos.
 - Alcoholes graduales (96, 96 y 100 %, Alcohol-Xilol 50 %) para deshidratar el tejido, dejándola dos minutos en cada una.
 - Xilol, dos cambios dejándola dos minutos en cada uno.
 - Montar.

■ Hemoaglutinación Indirecta Cuantitativa

REACTIVOS

- Solución salina estabilizadora
- Sueros testigo reactivo y no reactivo

MATERIAL

- Policubetas de poliestireno de 96 pocillos en U
- Micropipetas automáticas de 25 µl
- Microdiluidores para 25 µl o pipetas multicanal
 - Colocar 25 µl de solución salina estabilizadora en todos los pocillos de una policubeta.
 - Colocar 25 µl de cada muestra de los sueros, testigo y problema, en la primera fila (A) de la policubeta (dilución inicial $\frac{1}{2}$). Inactivar los sueros problema previamente a 56 °C durante 30 minutos, por razones de seguridad.
 - Colocar los microdiluidores en los 12 pocillos de la fila A, rotándolos no menos de 15 veces y pasándolos progresivamente a las filas subsiguientes (B, C, D, etc.) efectuando cada vez el mismo número de rotaciones, se completan así las diluciones dobles ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, etc.). Es necesario controlar la carga del microdiluidor al comenzar y terminar las diluciones en un papel absorbente calibrador.
 - Estas mismas diluciones sucesivas dobles pueden hacerse con la pipeta multicanal de 25 µl.
 - Se coloca 25 µl de la suspensión antigénica en cada pocillo, agitando luego con suaves golpes en los bordes de la placa. Dejar en reposo en una superficie plana, sobre un papel húmedo (evita las cargas electrostáticas) y en una mesa libre de vibraciones.
 - La lectura se realizará en el tiempo estipulado por el productor.
 - La falta de reactividad se manifiesta por la sedimentación del antígeno en forma de botón. La reactividad del suero se manifiesta por la formación de un manto de bordes irregulares que cubre del 50 al 100 % del fondo del pocillo, como se muestra a continuación:

