



# Universidad Nacional Autónoma de México

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA CEPA  
DE *Bacillus* DE LOS ECOSISTEMAS MICROBIANOS  
LAMINADOS DE LA LAGUNA FIGUEROA, BAJA  
CALIFORNIA NORTE, MEXICO.**

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**B I O L O G O**

presenta

**ALEJANDRO LOPEZ CORTES**

México, D. F., mayo de 1962



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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## CONTENIDO

RESUMEN	1-2
I.- INTRODUCCION	3-16
II.- ORIGENES Y PRIMERAS ETAPAS DE LA EVOLUCION DE LA VIDA	17
A) Teoría Evolutiva Oparin-Haldane del Origen de la Vida.	17-31
B) Posibles Vías de Evolución de los Primeros Seres Vivos.	32-54
III.- METODOS Y MATERIALES	55
A) Aislamiento.	55-57
B) Medio de Almacenamiento y Determinación de la Morfología Colonial.	57-58
C) Técnicas de Anaerobiosis.	58
D) Microscopía Fotónica.	58-59
E) Microscopía Electrónica.	59-61
F) Perfil Bioquímico.	61-63
G) Fisiología.	63-64
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION	65-83
V.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	84-85
VI.- REFERENCIAS	86-92
A P E N D I C E	93-97

## RESUMEN

Este trabajo se centra en el estudio de los ecosistemas microbianos laminados similares a los pedernales de laminación fina que contienen microfósiles de las facies de Swartkoppie del Onverwacht Tardío de Sudáfrica, con una edad de  $3.4 \times 10^9$  años (Margulis et al., 1980 ).

Los ecosistemas o tapetes microbianos laminados presentan una gran diversidad de procariontes. En cada capa se encuentran poblaciones de microorganismos, algunos de los cuales participan en la precipitación y retención de minerales como la aragonita. Las películas de minerales producidas vía fotosintética, heterótrofa y abiótica permiten el establecimiento de nuevas poblaciones microbianas adaptadas a condiciones extremas de salinidad, desecación y altas temperaturas. En una perspectiva ecológica la participación de productores fotosintéticos y descomponedores heterótrofos, conduce a suponer la existencia de relaciones bioenergéticas complejas dentro del organosedimento laminado.

Con el fin de caracterizar en una primera etapa el tipo de bacterias que habitan el ecosistema microbiano laminado, se desarrolló un estudio sobre grupos individuales de microbios autóctonos además de considerar las argumentaciones geológicas, geoquímicas y paleontológicas.

El estudio de las diferentes rutas metabólicas y de las asociaciones bioenergéticas presentes en estos organosedimentos, permitirá profundizar en el entendimiento y reconstrucción de la evolución de las comunidades microbianas y de los procesos biogeoquímicos involucrados.

Los resultados hasta ahora obtenidos consisten en el aislamiento y caracterización parcial de una nueva cepa de Bacillus licheniformis. En colaboración con la Universidad de Boston se ha llegado a plantear que la cepa 36 B-M (B. licheniformis) tiene semejanza con Metallogenium en relación a la organización estelar de su estructura colonial, así como la capacidad de crecer en medios que contienen manganeso (Margulis et al., en preparación).

Esta organización celular ha sido propuesta como la contraparte contemporánea de un fósil denominado Eoastrion de la Formación de Hierro Gunflint, localidad con una edad de  $2 \times 10^9$  años (Awramik y Barghoorn, 1977; Margulis et al., en preparación).

## I.- INTRODUCCION

El estudio de los procesos del origen y evolución de la vida sobre la Tierra, incluye investigaciones relacionadas con representantes modernos de estromatolitos, tapetes algales y microfósiles procariontes precámbricos. De esta manera, se ha desarrollado una nueva ciencia que depende principalmente de la interpretación morfológica de los diferentes fósiles precámbricos, basada en sus análogos modernos. Actualmente, en el intento de proporcionar un marco de referencia disponible para su interpretación, se ha considerado conveniente analizar la microbiología, ecología, composición, distribución, micro y macroestructura así como la morfogénesis de sus análogos recientes y cómo esos factores se aplican al registro biogeológico (Walter et al., 1973; Awramik et al., 1978; Margulis et al., 1980).

El análisis comparativo de los organosedimentos ha mostrado la inexistencia de contrapartes modernas para muchas de las estructuras estromatolíticas preservadas en el registro fósil (Awramik, comunicación personal) además, estos organosedimentos raramente contienen microfósiles bien preservados (Awramik, 1971). Sin embargo, el estudio de los tapetes microbianos laminados recientes y de los organismos que los construyen, es una poderosa herramienta para la interpretación de los estromatolitos fósiles (Monty, 1967; Walter, 1976).

Las evidencias paleontológicas demuestran que los organosedimentos laminados eran abundantes en el medio ambiente prefanerozoico (Awramik, 1971; Schopf, 1975; Awramik et al., 1978; Weber et al., 1979). La aparición y di-

versificación de las formas de vida multicelular eucarionte, representadas por organismos precipitadores de carbonatos de calcio, excavadores y consumidores de algas y cianobacterias, provocó durante el Precámbrico Tardío una disminución en la diversidad y abundancia de los estromatolitos (Awramik, 1971; Bittou, 1973; Schopf, 1975). Los análogos modernos de los estromatolitos precámbricos se encuentran confinados a zonas restringidas de lagos, pantanos, manantiales calientes y fríos, planicies de marea, bahías hipersalinas y fondos oceánicos (Walter, 1976; Awramik et al., 1978).

Los ecosistemas microbianos laminados, incluyendo los tapetes microbianos dominados por cianobacterias, han sido descritos en varios ambientes actuales (Monty, 1965, 1967; Walter et al., 1973; Golubic, 1976; Krumbein et al., 1977; Horodyski, 1977; Horodyski et al., 1977; Horodyski y Von der Haar, 1975; Margulis et al., 1980). Uno de tales sitios es el "Complejo Laguna Figueroa".

La Laguna Figueroa es una laguna cerrada, elongada que se encuentra a lo largo de una cordillera de dunas que dan hacia las playas del Océano Pacífico, en Baja California Norte, México; a unos 220 km al sur de los EE. UU. y a 15 km al norte de San Quintín, B. C. Norte.

La barra de dunas de 8 a 12 m de altura y de 100 a 150 m de ancho, se extiende a lo largo de la costa y detrás de ella se encuentra la laguna, asociada con un pantano salino y una planicie de evaporitas; este conjunto recibe el nombre de "Complejo Laguna Figueroa" (Horodyski y Von der Haar, 1975) (Figura 1).



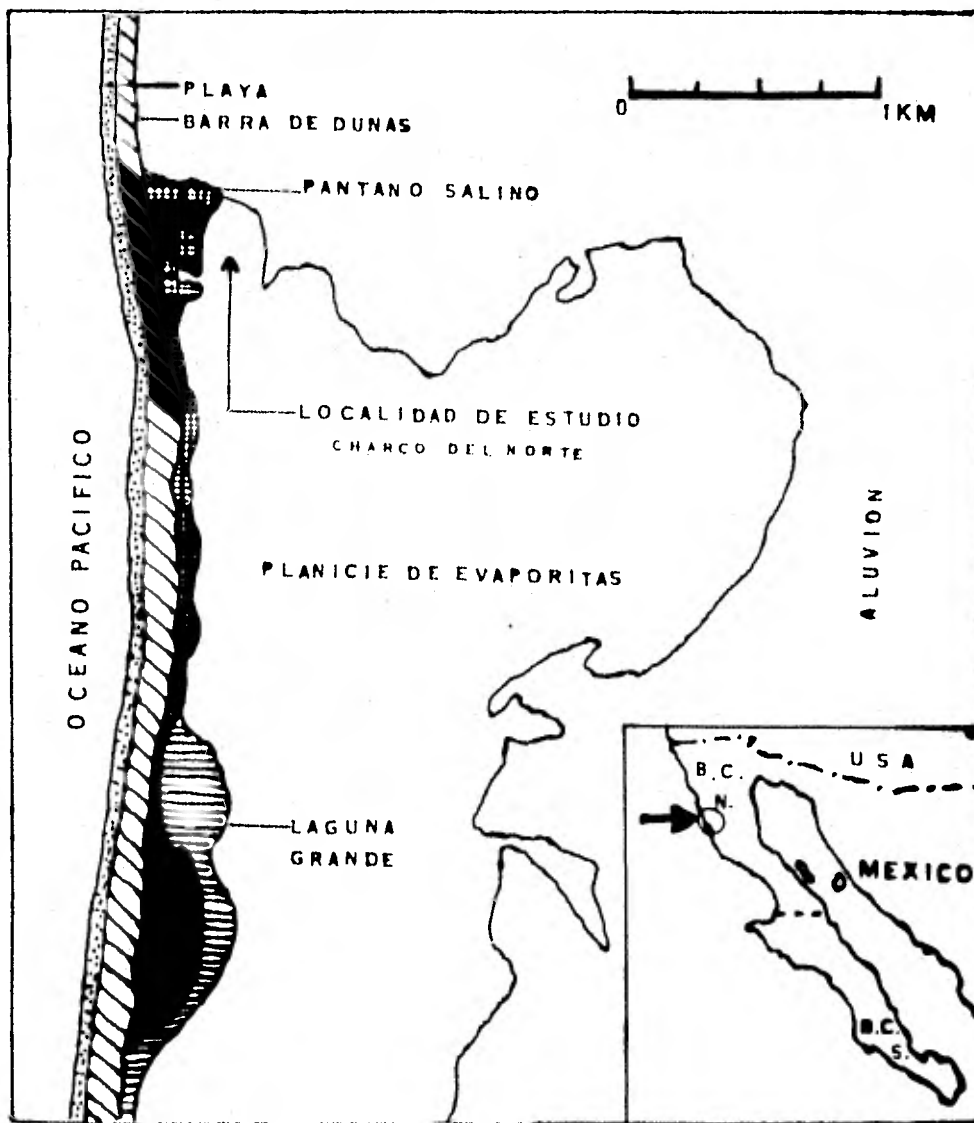


Figura 1. Mapa del "Complejo Laguna Figueroa", que muestra la localidad de estudio. (Adaptado de Horodyski, 1977).

Se sabe que la Laguna sufre un ciclo complejo de inundaciones, observado desde el verano de 1977 hasta el verano de 1981. La naturaleza semi-desértica de la localidad, nos permite suponer la existencia de tasas altas de evaporación, que provocan el establecimiento de condiciones extremas de salinidad, desecación y altas temperaturas, bajo las cuales un número muy limitado de organismos eucariontes es capaz de sobrevivir, y por lo contrario estas condiciones propician el desarrollo de cianobacterias, bacterias fotosintéticas y heterótrofas.

Los ciclos de desecación pueden determinar la morfología y la actividad bioenergética (Horodyski et al., 1977). Cuando están cubiertos por una capa de agua de aproximadamente 50 cm, se forma sobre los tapetes microbianos laminados una cubierta de lodo (Figura 11), que impide la actividad fotosintética, en estas condiciones las bacterias heterótrofas asociadas a las vainas de las cianobacterias, proliferan con facilidad utilizando sus polisacáridos como fuentes de energía, destruyendo las vainas y tricomas de las cianobacterias, para dar finalmente estratos de coloración oscura. En cuanto se evapora el agua, la cianobacteria Microcoleus prolifera originando un nuevo tapete "algal" caracterizado por estratos verdosos, iniciándose así un nuevo ciclo en la historia de la comunidad microbiana (Monty y Margulis comunicación personal).

Durante todo el año de 1980 la localidad permaneció inundada y fue hasta el verano de 1981 cuando nuevamente se desecó, en esta última visita se observó que la bacteria fotosintética Thiocapsa sustituye a la ciano

bacteria Microcoleus, dominando la primera en el tapete microbiano laminado (Margulis, comunicación personal).

Se ha considerado que los tapetes microbianos laminados del "Complejo Laguna Figueroa", son un buen modelo experimental en condiciones naturales, análogo a ciertos sedimentos precámbricos ricos en carbono, fierro y azufre representantes de aguas poco profundas (Hrodyski et al., 1977; Margulis et al., 1980).

En el "Complejo Laguna Figueroa", se ha reportado el encuentro de comunidades microbianas complejas representadas por los tapetes algales mamelares de Entophysalis, las borlitas de Lynghya y por los tapetes algales laminados de Microcoleus, auxiliares en el entendimiento de los depósitos proterozoicos, que incluyen los microfósiles preservados (Hrodyski et al., 1977). La estructura de la comunidad, patrones de degradación y los procesos de sedimentación involucrados, han sido elucidados por Hrodyski y Von der Haar (1975), Hrodyski (1977) y Hrodyski et al. (1977).

La comunidad microbiana de los tapetes laminados presenta gran diversidad metabólica de procariontes. En cada una de las láminas o capas se encuentran poblaciones de microorganismos algunos de los cuales participan en la precipitación y retención de minerales tales como la aragonita; además, otra buena parte de los minerales resultan de la actividad abiótica, de tal manera que la laminación del tapete es de naturaleza biológica y abiótica. Las películas de minerales producidas por vía fotosintética, heterótrofa y abiótica, permiten el establecimiento de nuevas poblaciones

microbianas adaptadas a los numerosos microambientes existentes en la comunidad microbiana laminada (Figuras 2,3,4 y 5).

Los procesos de formación de carbonatos, en donde los microorganismos están participando, también dependen de la disponibilidad de las sales de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , concentraciones de ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), temperatura, pH, profundidad, etc. (Monty, 1967; Kuznetsov, 1970; Gebelin y Hoffman, 1973).

La laminación resulta del gradiente en la intensidad luminosa, de los valores de pH y del  $\text{Eh}^\circ$ , propiciando así condiciones anaeróbicas, microaerofílicas y anaeróbicas (Margulis, comunicación personal).

Los gradientes de luminosidad y las diferentes longitudes de onda a que absorben los pigmentos se reflejan en la laminación clásica, verde-rojo-negro de la comunidad microbiana (Krumbein et al., 1980).

En una perspectiva ecológica la participación de productores como cianobacterias y bacterias fotosintéticas, que utilizan la radiación solar para producir materia orgánica y energía metabolizable, y la presencia de consumidores, representados por una amplia variedad de bacterias heterótrofas, conduce a suponer la existencia de relaciones bioenergéticas complejas dentro del organosedimento laminado, en donde se llevan a cabo la producción y utilización de gases de importancia metabólica como  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ .

Las bacterias han jugado un papel importante en la transformación geoquímica del planeta. Interactúan con la atmósfera a través de la producción y consumo de gases, con la litósfera precipitando ciertos minerales, y, finalmente, con la hidrósfera por la producción de  $\text{NH}_3$ , que al solubilizarse

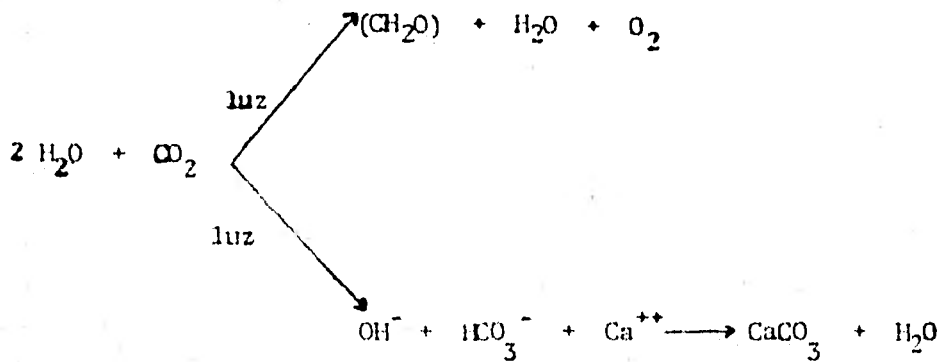


Figura 2. Precipitación de carbonatos por cianobacterias (Microcoleus y Lyngbya)

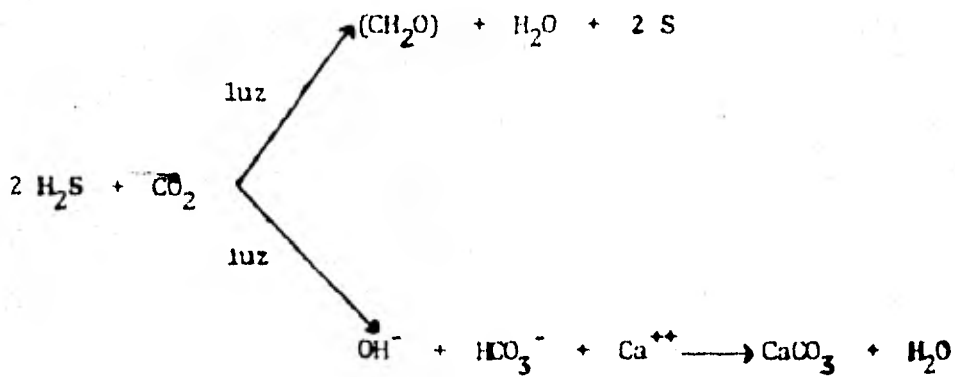


Figura 3. Precipitación de carbonatos por bacterias fotosintéticas (Chromatium y Thiocapsa)



Figura 4. Formación heterótrofa de carbonatos (Desulfovibrio y Bacteroides)

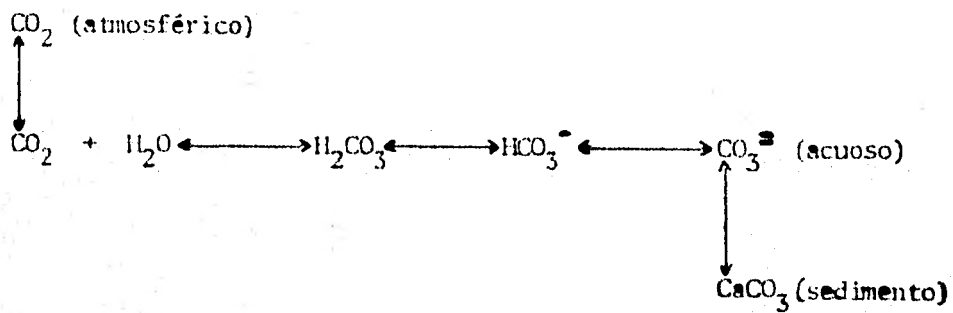


Figura 5. Precipitación abiótica de carbonatos

se transforma en el ión  $\text{NH}_4^+$ , manteniendo así condiciones favorables para la precipitación de carbonatos de calcio (Figura 6).

Estas son las razones que nos conducen a utilizar las bacterias como un buen modelo biológico que refleja parámetros medioambientales de la Tierra primitiva (Oparin, 1968; Balch et al., 1977).

Los trabajos de carácter microbiológico que anteceden a éste, caracterizan a la comunidad principalmente por la presencia de poblaciones de cianobacterias (Hrodyski et al., 1977) y solo los últimos estudios han incluido la descripción de las comunidades bacterianas fotosintéticas, heterótrofas y en particular las anaerobias, de tal manera que los trabajos microbiológicos que han resultado del estudio de estos organosedimentos, demuestran que falta todavía estudiar mucha de la diversidad microbiana (Margulis et al., 1980; Margulis et al., 1980a; Giovannoni, 1979; Krumbein, 1978) (Tabla 1).

Margulis et al. 1980, han supuesto que los tapetes microbianos laminados, son similares en apariencia a los pedernales de laminación fina, encontrados en las facies de Swartkoppie del Onverwacht Tardío de Sudáfrica, con una edad de  $3.4 \times 10^9$  años. En este sentido, además de realizar un estudio detallado más, sobre grupos individuales de microbios autóctonos, se consideraron los aspectos geológicos, geoquímicos y paleontológicos; como parte del proyecto realizado en colaboración con la Dra. Lynn Margulis del Departamento de Biología de la Universidad de Boston. El estudio consistió en el aislamiento y caracterización de una cepa de bacterias heterótrofas que



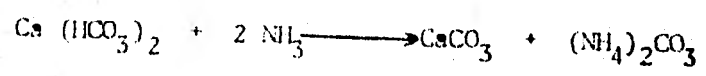
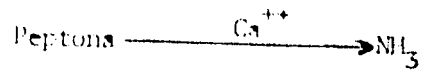


Figura 6. Efecto del cambio de pH producido por la actividad microbiana en la precipitación de carbonatos

Tabla 1. ORGANISMOS QUE HAN SIDO OBSERVADOS EN LAS COMUNIDADES MICROBIANAS LAMINADAS DE LA LAGUNA FIGUEROA  
(hasta febrero de 1981)

PROCARIOTES

Bacterias heterotrófas:

Beneckea  
Desulfovibrio  
Nocardia

Spirochaeta  
Pseudomonas  
Sphaerotilium

Bacillus spp.\*  
cocos, vibrios, espiroquetas,  
espirilos, bacilos y filamentos.

Flexibacterias:

Beggiatoa  
Saprospira

Bacterias fotosintéticas:

Chromatium  
Rhodospirillum  
Thiocapsa

rodoseudomonas

Cianobacterias:

Microcoleus chthonoplastes  
Lyngbya  
Enthophysalis

Spirulina  
Anabaena  
Oscillatoria

Pleurocapsa  
Pseudoanabaena  
Schizothrix

Phormidium

\*Este trabajo.

Tabla 1. ( continuación ).

EUCARIONTES

Algas verdes:

Dunaliella salina  
Enteromorpha

frústulas de diatomeas

Hongos:

Aspergillus sydowi

Protozoarios cillados y amiboides:

Stylonichia\*\*

Animales:

naúátodos, larvas de moscas, copéodos herpachtecoides.

En adición al material vivo, existen muchos derivados químicos y biológicos en los tapetes:

Material muerto:

- i) restos de plantas (vegetación de pantano salino)
- ii) restos de animales (especialmente artrópodos)

\*\*Forma parecida.

Adaptado de: Margulis et al., 1980 a.

toman parte del ecosistema microbiano laminado.

El perfil bioquímico y fisiológico de este tipo de organismos, además de ser auxiliar en la taxonomía, proporciona información acerca de las primeras etapas de evolución de las vías catabólicas. A partir del estudio del metabolismo comparado, se ha argumentado que los primeros organismos eran heterótrofos anaerobios, es decir, utilizaban la materia orgánica que resultó de la síntesis abiótica (Haldane, 1929; Oparin, 1938). Por supuesto que los heterótrofos actuales deben diferir de los primeros organismos en algunos aspectos de su metabolismo, ya que en la actualidad la materia orgánica de la que dependen, resulta de la actividad biológica a diferencia de la materia orgánica disponible en los mares primitivos (Broda, 1975).

Sin embargo, el estudio de las diferentes rutas metabólicas y de las asociaciones bioenergéticas presentes en estos tapetes microbianos laminados, permitirá profundizar en el entendimiento y reconstrucción de la evolución de los sistemas microbianos primitivos y de los procesos biogeoquímicos involucrados.

El capítulo a continuación resume el marco teórico en que adquiere sentido el trabajo experimental de esta tesis.

## II.- ORIGENES Y PRIMERAS ETAPAS DE EVOLUCION DE LA VIDA

### A.- Teoría Evolutiva Oparin-Haldane del Origen de la Vida.

A principios de nuestro siglo, existían diversos obstáculos para comprender el origen de los ancestros primarios de todos los organismos terrestres (Olea, 1981).

a) La creencia dominante de que sólo los seres vivos son capaces de sintetizar materia orgánica, imposibilitaba entender cómo se formaron los compuestos orgánicos antes de la aparición de la vida.

b) Los elegantes experimentos que intentaban resolver la controversia de la generación espontánea, realizados durante el siglo XIX, no contemplaban la posibilidad de una aparición súbita, pero a nivel molecular, de enzimas, genes, virus o coloides (Farley, 1977).

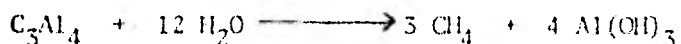
c) El descubrimiento de las bacterias quimioautótrofas, condujo a algunos científicos de la época a suponer, desde una errónea interpretación darwinista, que los primeros seres vivos debieron haber sido autótrofos "sencillos", que obtenían energía de la oxidación de sales inorgánicas. A la vez, esta suposición intentaba dar respuesta al problema de la síntesis de materia orgánica en ausencia de seres vivos.

d) Los planteamientos propuestos eran fundamentalmente especulativos e impedían abordar el problema experimentalmente.

Oparin (1924) y Haldane (1929), elaboraron independientemente los primeros trabajos que hacen del origen de la vida un problema científico legítimo, pues sus ideas se basan en diversas observaciones y hallazgos experimentales.

Podemos considerar que la Teoría Oparin-Haldane no resulta de la acumulación de conocimiento de las diferentes disciplinas hasta ese momento desarrolladas, por lo tanto no tiene precursores. Hasta entonces por vez primera se propone una forma totalmente nueva de interpretar y plantear el fenómeno de la aparición primaria de la vida.

En el planteamiento original de Oparin, se menciona la existencia de hidrocarburos en las atmósferas de estrellas rojas, cometas y meteoritos, así como los posibles mecanismos involucrados en la síntesis abiótica de materia orgánica en la Tierra primitiva, en este último sentido se ha señalado que la hipótesis de Mendeleev sobre el origen inorgánico del petróleo, fue de gran valor heurístico para Oparin (Graham, 1976).



Haldane, como otros bioquímicos, prestó atención a los experimentos de Baly, quien obtuvo formaldehído y sustancias similares a las que constituyen a las proteínas, a partir de una mezcla de agua, dióxido de carbono y amoníaco, bajo la acción de la radiación ultravioleta. Haldane sostiene que así se sintetizó en el pasado la materia orgánica, para finalmente acumularse en los océanos primitivos dando lugar a una "sopa caliente y diluída" (Farley, 1977).

Por lo tanto Oparin y Haldane plantean procesos abióticos de formación y transformación de la materia orgánica, es decir, la aparición de la vida no se concibe como un hecho repentino y fortuito sino que es precedido por

procesos naturales de síntesis de materia orgánica a partir de inorgánica, en presencia de fuentes de energía libre. El aumento de complejidad de estos compuestos orgánicos y de los microsistemas moleculares resultantes, conducirían al surgimiento de los primeros vivientes, que habrían sido heterótrofos: obtenían energía al fermentar la materia orgánica de origen abiótico presente en las aguas primigenias. El crecimiento de las poblaciones biológicas a lo largo de varias generaciones, condujo al agotamiento de aquellas y surgió así una de las presiones de selección que llevaría más adelante a la aparición de la autotrofia.

Para Oparin, el conocimiento del desarrollo ulterior de los primeros seres vivos, resultaría del estudio comparativo del metabolismo celular, inquietud que pretende ser retomada en esta tesis, es decir, en efecto hoy el problema está sujeto al trabajo teórico y experimental.

La concepción contemporánea de la teoría evolutiva sobre el origen de la vida no difiere en lo fundamental del trabajo de 1924. Oparin (1971, 1972 y otras obras) dividió en cuatro grandes etapas de complejidad creciente y de carácter cada vez menos universal, los procesos evolutivos que llevaron al origen de la vida en la Tierra:

- a) Aparición de hidrocarburos, cianuros y sus derivados inmediatos en el espacio cósmico y durante la formación de la Tierra y el desarrollo subsecuente de su corteza, atmósfera e hidrósfera.
- b) Transformación en la superficie del planeta de los compuestos iniciales del carbono en sustancias más y más complejas -monómeros y

polímeros- aparición de la sopa primordial.

- c) La autoformación en el seno de esta sopa de sistemas polimoleculares abiertos, capaces de interactuar recíprocamente con el medio y de crecer y multiplicarse gracias a esa interacción -aparición de los protobiontes.
- d) La evolución posterior de estos protobiontes, el desarrollo a través de la selección prebiológica de un metabolismo más perfecto y de estructuras moleculares y supramoleculares más perfectas -aparición de los organismos primordiales.

Las dos primeras etapas están subordinadas a las leyes físicas y químicas comunes a toda la naturaleza, lo que permite suponer que estos procesos de evolución química podrían existir en muchos lugares del universo, como indica la existencia de materia orgánica extraterrestre (Figura 7).

La reproducción en el laboratorio de las condiciones que pudieron haber prevalecido en la Tierra primitiva, ha mostrado convincentemente la síntesis de numerosos compuestos orgánicos entre los cuales se encuentran aminoácidos, bases purínicas y pirimidínicas, carbohidratos, ácidos orgánicos y otros (Lemmon, 1970). La hipótesis de evolución química está apoyada por el descubrimiento de una gran cantidad de moléculas orgánicas en condritas carbonosas y de sus precursores en núcleos cometarios y en el medio interestelar (Oró, 1972), reforzando así la idea de que la síntesis química en la Tierra prebiótica condujo a la presencia y acumulación, a lo largo del tiempo geológico, de cantidades sustanciales de moléculas orgánicas en las



charcas poco profundas y lagunas estuarinas (Oro et al., 1978).

Se ha sugerido que las sustancias orgánicas, monómeros y polímeros, aparecieron bajo diversas condiciones localizadas en diferentes regiones de la superficie de la Tierra, llamadas "territorios subvitales" (Oparin, 1974). En ellos la relación del proceso síntesis-desintegración de los compuestos del carbono pudo haber diferido, es decir, muchas sustancias de alto peso molecular pudieron unirse para formar entidades individuales, microsistemas multimoleculares, algunos continuaron desarrollándose y otros sufrieron descomposición parcial o completa debida a los cambios ambientales. No obstante, los productos de la descomposición pudieron combinarse nuevamente e iniciar nuevos procesos de desarrollo evolutivo, pero sobre bases distintas. Así, en varios territorios subvitales de la superficie de la Tierra, se encontraban diversos estados evolutivos a un mismo tiempo, lo que conduce a negar la idea de una emergencia única de la vida en la Tierra. Este concepto moderno asume la multiplicidad de la aparición de los primeros seres vivos (Oparin, 1974) (Figura 7).

La relativa facilidad con que se transforma la materia orgánica y el descubrimiento de interconversiones no enzimáticas, ha llevado a algunos investigadores a pensar que los procesos de evolución química necesariamente conducen a la aparición de la vida. Al respecto, Oparin contraargumenta en sus trabajos de 1971, 1972, 1978 y 1980, mencionando el caso de varios cuerpos celestes que muestran la presencia de compuestos del carbono con diferentes grados de complejidad y en los cuales no se ha detectado vida,

así pues, no todas las líneas de desarrollo de los compuestos del carbono son responsables de la emergencia primaria de organismos (Figura 7).

"Por tanto, a priori podríamos esperar el descubrimiento de tales procesos en una u otra forma, no solo en la Tierra sino también en otros cuerpos celestes. Sin embargo, en nuestro planeta en una etapa especial del desarrollo de la materia, surgió la transición de la evolución química a la evolución biológica. Después de este cambio predominaron leyes nuevas y mucho menos universales" (Oparin, 1972).

Los dos últimos postulados de la teoría contemporánea Oparin-Haldane, señalados en líneas anteriores, corresponden a la evolución prebiológica o protobiológica, en donde la formación de sistemas polimoleculares abiertos con separación de fase (SPASF), fue paso obligatorio para el surgimiento de la selección natural y para la transición de la evolución química a la biológica.

La existencia de poblaciones de microsistemas individuales y variables en la Tierra primitiva, permite establecer un proceso de selección natural primitiva o protoselección natural: los microsistemas que llevan a cabo reacciones coordinadas, bajo condiciones dadas del medio externo, se mantienen y aumentan su complejidad por la síntesis y crecimiento del sistema como un todo, mientras que otros microsistemas, bajo las mismas condiciones, se desintegrarían debido a las tasas bajas en el proceso de síntesis que realizan en su interior, limitando su crecimiento (Oparin, 1965) (Figura 7).

Los procesos de evolución química y prebiológica propuestos por Oparin (1971, 1979) se esquematizan a continuación.

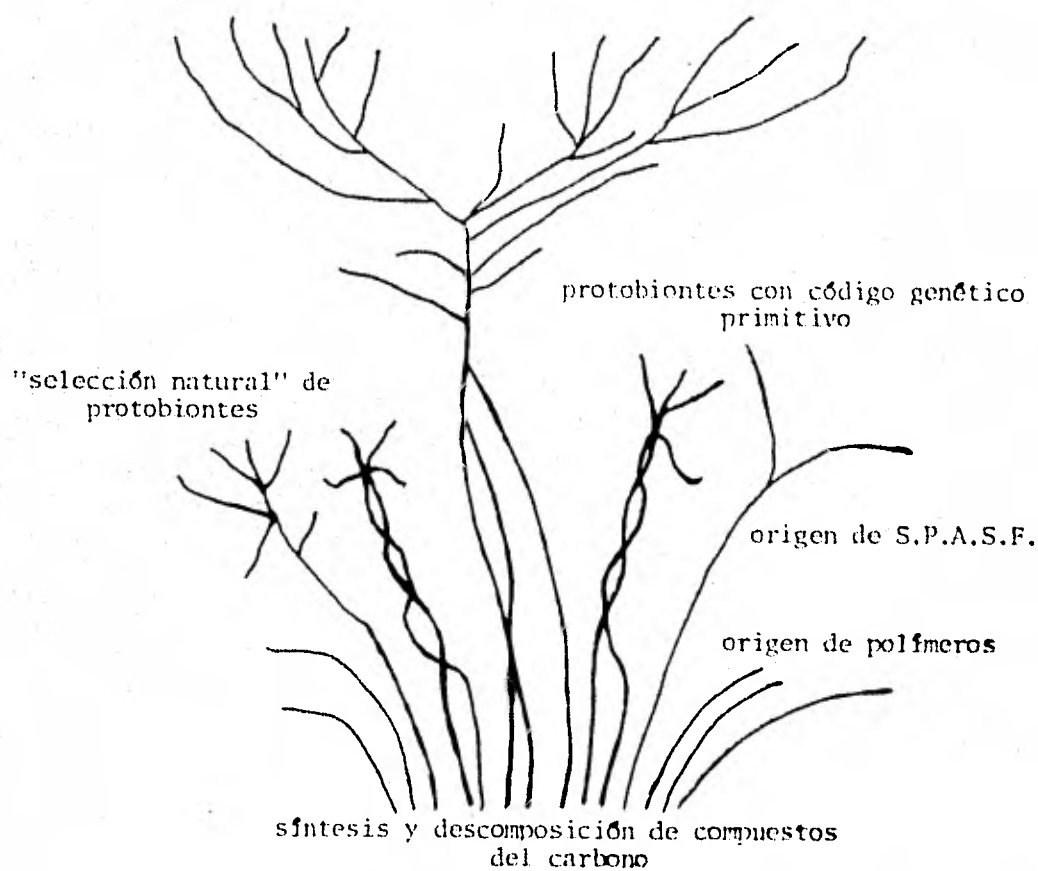


Figura 7. Esquema de las vías de evolución de los sistemas prebióticos.

Actualmente se ha propuesto una cantidad considerable de modelos químicos tales como: concervados (ver citas de Oparin), microesferas (Fox, 1976; Fox y Dose, 1977), microvesículas lipídicas (Oro et al., 1978; Hargreaves y Deamer, 1978; Deamer y Oro, 1980), microestructuras (Folsome, 1976) etc., que pretenden explicar si en la Tierra primitiva pudieron haber aparecido los SPASF, cuál pudo haber sido su naturaleza y su papel en los procesos de evolución prebiológica.

Es importante recordar que la evolución prebiológica no se refiere a la evolución de polímeros que pueden realizar interconversiones no enzimáticas, ya que, por ejemplo en un pentapéptido de L-glicina no existe individualidad ni variabilidad y por lo tanto no actuaría sobre él la proto-selección natural.

Las ventajas evolutivas que presentan los SPASF sobre los polímeros aislados o capaces de realizar interconversiones no enzimáticas se explican a continuación:

- a) Los sistemas con separación de fase mantienen su individualidad con respecto a su alrededor diluido, debido a la existencia de una frontera en cuyo interior y formando el límite están los constituyentes del sistema (Oparin, 1972; Fox, 1976; Oro et al., 1978).
- b) La presencia de un límite definido establece una permeabilidad selectiva al agua, pequeños iones y pequeñas moléculas orgánicas, facilitando la evolución de un sistema metabólico sencillo al utilizar tales compuestos (Hargreaves et al., 1978; Oro et al., 1978).

- c) En el interior del sistema, además de hallarse protegido el material orgánico, pueden alcanzarse concentraciones cinéticamente favorables, que iniciaron el establecimiento de reacciones sencillas que antecedieron al metabolismo (Oro et al., 1978; Oparin y Gladilin, 1980).
- d) Las poblaciones de microsistemas individuales y variables permiten establecer un buen modelo para explicar el proceso de protoselección natural, responsable de la desintegración y aumento en complejidad de los mismos bajo condiciones dadas del medio (Oparin, 1965, 1971, 1972; Oro et al., 1978).
- e) La influencia de factores mecánicos externos como las olas de los océanos primitivos, permite la división de los sistemas es decir, mecanismos primitivos de multiplicación (Oparin, 1972).
- f) La formación de microsistemas constituidos por polinucleótidos, polipéptidos y otros, permitieron la evolución de los sistemas de autoensamblaje específicos, representados en la actualidad por la síntesis de proteínas (Oró et al., 1978; Oparin y Gladilin, 1980).
- g) La capacidad de intercambiar materia y energía con su medio, permite oponerse al incremento en la entropía, posibilitando así el desarrollo de un estado estacionario orientado hacia su autoconservación y autopropagación, dentro de un conjunto dado de condiciones del medio externo (Oparin, 1971, 1972).
- h) Los microsistemas formados por el autoensamblaje de moléculas an-

lipídicas, permitirán comprender el origen de las primeras biomembranas. La naturaleza anfifílica de sus componentes le confieren cierta elasticidad, fluidez y capacidad de reparar espontáneamente las rupturas producidas por los efectos mecánicos. Además de que en su interior se llegan a formar vesículas con contenidos acuosos considerables (Oró et al., 1978).

Es claro que la selección natural se originó en la etapa prebiológica y determinó la formación de aquellas propiedades que son inherentes a todos los seres vivos.

Una característica exclusivamente específica de todo lo viviente, es la disminución de la entropía, la creación de un orden a partir del movimiento térmico y desordenado de las moléculas, ya que los sistemas vivos son sistemas abiertos cuya existencia resulta de la continua interacción de los mismos con el medio ambiente. Por eso, la formación de sistemas abiertos individuales en una solución acuosa primitiva homogénea, fue una etapa obligatoria en las vías del origen de los seres vivos (Oparin, 1979; Oparin y Gladilin, 1980).

Una segunda característica específica a desarrollar, es la adaptabilidad exclusivamente perfecta de su estructura y metabolismo, a la constante autoconservación y autopropagación de los sistemas en las condiciones dadas de existencia (Oparin, 1979; Oparin y Gladilin, 1980).

Y una tercera es el surgimiento de un patrón de transferencia de la información, basado en su organización intramolecular de compuestos con-

plejos, la herencia (Oparin, 1979; Oparin y Gladilin, 1980).

El desarrollo de un sistema de almacenamiento y transferencia de la información, de cadenas de reacciones químicas coordinadas en estado estacionario que resulta del intercambio de materia y energía, en resumen la adaptabilidad del todo y de las partes a un medio ambiente dado, sólo pudieron llevarse a cabo por la evolución gradual de microsistemas abiertos o protobiontes.

Todas estas características no pudieron haber surgido a nivel de polímeros aislados. El origen de la vida per se estuvo necesariamente asociado a la selección natural de sistemas variables, individuales y con separación de fases, de los cuales los seres vivos son los más avanzados (Oparin y Gladilin, 1980).

Sin embargo, no es bastante para entender cómo la organización de crecimiento y multiplicación de los protobiontes podría mejorar gradualmente.

Consideremos las mejoras como las que afectan principalmente el aparato catalítico del protobionte, importante factor de organización en el inicio del metabolismo que a su vez depende de las tasas de reacción de sus constituyentes. Las sustancias orgánicas e inorgánicas disponibles en la superficie de arcillas pudieron ser incorporadas al interior de los microsistemas polimoleculares (Oparin, 1965; Oro et al., 1978).

El entendimiento de la cinética enzimática y de la catálisis no enzimática, ha mostrado que las moléculas orgánicas y sales inorgánicas en soluciones homogéneas, tienen baja actividad catalítica pero sus diferentes

posibilidades de combinación y de adición de los compuestos resultan en un aumento en la actividad. En este sentido, se han obtenido actividades catalíticas que exceden la de la sustancia original por muchos miles de veces (Langenbeck, 1953, en Oparin, 1965).

La presencia de ciertos catalizadores en solución, no conduciría a que la selección natural actuara sobre ellos, ya que su habilidad de catalisis no les dió ninguna ventaja en longevidad o incremento en número, en comparación con otras moléculas que no tenían dicha habilidad. Esta situación fue diferente para los catalizadores incorporados dentro del sistema protobionte como un todo. La absorción selectiva por los protobiontes permitió la acumulación y formación de complejos catalíticos activos diversos en eficiencia (Oparin, 1968).

Es posible imaginar un enorme número de varios grupos atómicos cuyas combinaciones podrían haber catalizado las reacciones requeridas para la existencia de los protobiontes.

No obstante, la protoselección natural seguía actuando hasta quedar muy pocos de esos catalizadores que en el interior de los protobiontes llevaron a cabo nuevas reacciones, coordinadas con las antes existentes, confiriéndole ventajas sobre el resto de la población. Como consecuencia, el crecimiento y la multiplicación pudieron haber sido considerables, aumentando el tamaño de la cadena de reacciones, ramificándose o cerrándose en la forma de ciclos. Estas poblaciones de protobiontes ocuparon una posición clave en la evolución prebiológica y los catalizadores que poseían en esta



etapa de su evolución estarían representados por las coenzimas hoy familiares en bioquímica (Oparin, 1965).

Se sabe que las coenzimas, varias de las cuales son vitaminas, son complejos de moléculas orgánicas, esenciales para muchas reacciones catalizadas por enzimas. Al menos el 52% de las aproximadamente 1,750 enzimas recientemente catalogadas (IUPAC-IUB, 1972) requieren de una coenzima para su actividad (White, 1976).

La distribución universal de las coenzimas en los seres vivos actuales, ha permitido postular que en cierta etapa de evolución de los protobiontes las coenzimas actuaron reemplazando a los catalizadores orgánicos e inorgánicos más sencillos pero menos eficientes (Oparin, 1968).

Ciertamente, la aparición de procesos de síntesis, como la producción de coenzimas a partir de compuestos externos más y más simples, desencadenó la independencia de los protobiontes sobre la composición del medio (Horowitz, 1945; Oparin, 1965).

Sin embargo, la actividad catalítica de las coenzimas no es suficiente para explicar la complejidad de las vías metabólicas. Por lo tanto el mejoramiento ulterior del metabolismo primitivo requirió de enzimas o proteínas con una estructura secundaria y terciaria soberbiamente adaptada a sus funciones (Oparin, 1968).

Posiblemente, la polimerización de aminoácidos en protobiontes podría haber conducido a la formación de tales asociaciones de residuos, que podrían haber servido como centros activos. Sin embargo, esta ventaja se

perdería rápidamente si la polimerización se efectuara al azar, y esto frenaría el crecimiento del protobionte (Oparin, 1965).

En estas primeras etapas de desarrollo, los polinucleótidos contenidos en los protobiontes, pudieron haber ejercido un cierto efecto en la polimerización de aminoácidos existentes en el sistema. La estructura intramolecular de los primeros nucleótidos fue muy primitiva y cambió marcadamente durante el crecimiento y desarrollo de los protobiontes.

En los organismos contemporáneos, la síntesis de proteínas se lleva a cabo por un mecanismo exageradamente complicado y altamente desarrollado; un mecanismo de esta clase, por supuesto, pudo haber aparecido sólo durante la prolongada evolución de los sistemas vivos.

Es evidente que entre los polipéptidos originales débilmente catalíticos y las enzimas actuales, se produjo un enorme número de posibilidades de catálisis que fueron probadas y rechazadas por selección natural. Por esta razón sólo encontramos enzimas con estructuras altamente desarrolladas (Oparin, 1965, 1968).

De esta manera, ha sido posible trazar un esquema de las diversas etapas evolutivas que se extendieron entre los sistemas iniciales y los organismos primarios o eubiontes. Estas contemplan el desarrollo progresivo del sistema de autoensamblaje no específico, situado en el interior de los protobiontes primitivos iniciales, cuyas tasas de síntesis estaban dadas por oligómeros y polímeros con bajo grado de organización, obtenidos del medio exterior. El proceso de protoselección natural y las continuas transformaciones sufridas por estos sistemas, dieron lugar a poblaciones de proto-

biontes en los cuales ya se originan los elementos del autoensamblaje específico, en donde la conformación específica condujo a un mayor grado de polimerización, que representó un aumento gradual de sus niveles de organización, como son el crecimiento, la división y la diferenciación. Más tarde, la evolución de la selección prebiológica produjo un perfeccionamiento en el autoensamblaje específico que trajo como resultado la formación de estructuras adaptadas, representadas por estructuras y funciones de diferentes polímeros en el sistema de biosíntesis de la célula completa (Oparin, 1957; Oparin y Gladilin, 1980).

"La selección de los protobiontes también involucra una selección de sus constituyentes, lo que da como resultado un continuo aumento en el nivel de especificidad estructural de los polímeros y en su autoensamblaje, y en la formación de macromoléculas que combinan un mayor grado de polimerización con la capacidad de mantener una conformación estable específica. El desarrollo posterior de la selección natural de los protobiontes produjo el surgimiento de los sistemas biológicos primitivos, capaces de sintetizar polímeros biológicamente específicos" (Oparin y Gladilin, 1980).

## B.- Posibles Vías de Evolución de los Primeros Seres Vivos.

En realidad, con la aparición de los eubiontes se inicia una nueva etapa de desarrollo de la materia: la evolución de los seres vivos. El estudio detenido de este proceso de evolución puramente biológico, podrá facilitarnos en gran medida la comprensión de su génesis inicial, es decir, los seres vivos actuales situados en diversos peldaños de la escala evolutiva, proporcionan datos objetivos sobre las formas más tempranas de existencia de vida en este planeta (Lamarck, 1809; Darwin, 1859; Oparin, 1957). Al respecto, es particularmente útil el estudio comparado del metabolismo, los análisis sobre la secuencia de aminoácidos y bases en proteínas y ácidos nucleicos, el entendimiento del registro geológico y paleontológico del Precámbrico, así como el de sus análogos modernos (Oparin, 1968; Schwartz y Dayhoff, 1978; Awramik et al., 1978).

Ciertamente los eubiontes codificaban la información en la secuencia de bases del ADN, que a la vez determina la secuencia de aminoácidos en proteínas. Su genoma debió haber sido de bajo peso molecular debido a su relativa sencillez y por lo tanto debieron ser unicelulares, microscópicos, con membranas selectivamente permeables a los iones y al material orgánico disponible, lo que supone que su metabolismo fue heterótrofo, en donde las moléculas no sólo fueron fuente de compuestos activados para procesos catalíticos y de conversión bioenergética, sino también como precursores para la biosíntesis (Oparin, 1957; Margulis, 1972; Oro et al., 1978). La probable existencia de ambientes primigenios con bajos potenciales de óxido-

reducción, sugiere un carácter estrictamente anaeróbico para los primeros seres vivos. Los estudios de reconstrucción de medios ambientes primitivos y el concepto de territorio subvital, permiten suponer que los primeros eubiontes se desarrollaron en ambientes ricos en materia orgánica, como son la superficie de arcillas localizadas en charcas pequeñas y lagos estuarinos, con diferentes grados de salinidad, temperatura y pH; la asociación de los seres vivos con la superficie de arcillas serviría como forma de protección a los efectos producidos por la radiación ultravioleta. La distribución universal de las reacciones de óxido-reducción, polimerización y acoplamiento en la fijación química de la energía en los seres vivos actuales, sugiere que éstas también podrían haber existido en los primeros eubiontes (Oparin, 1968, 1971, 1974; Oró et al., 1978).

A continuación se presenta una argumentación que pretende sustentar la hipótesis heterótrofa sobre el origen de la vida (Oparin, 1924; Haldane, 1929), en contraposición a la idea de un metabolismo autótrofo en las primeras células.

La hipótesis heterótrofa requiere de la síntesis de compuestos orgánicos diversos bajo condiciones de la Tierra primitiva. Sin embargo, la idea de que la superficie de la Tierra se encontró extremadamente caliente, imposibilita la formación de una hidrósfera rica en materia orgánica. Desde la perspectiva del modelo de acreción inhomogénea sobre la formación de la Tierra (Walker, 1976), postula la aparición de una hidrósfera en etapas muy tempranas en la evolución del planeta, mientras que otras evidencias geológicas presentadas por Moorbath (1977), suponen que hace  $3.8 \times 10^9$  años

se depositaron las primeras rocas sedimentarias en medio acuoso, responsable de la formación del cinturón supracortical de Isua en Groenlandia. De esta manera podemos garantizar la existencia de masas de agua, que concentran materia orgánica en la Tierra primitiva.

El avance de la bioquímica comparada ha revelado que la complejidad metabólica está directamente asociada con el hábito alimenticio. Mientras más pocos y más simples sean los alimentos requeridos por los organismos, éstos poseen numerosas y largas vías metabólicas que a partir de la materia prima, conducen a una síntesis final de constituyentes celulares (Lamanna et al., 1973).

Otro argumento que se utiliza a favor de la hipótesis heterótrofa es el hecho de que aún en organismos quimioautótrofos y fotoautótrofos se encuentran algunos pasos de vías metabólicas heterótrofas, es decir, su amplia representatividad en el mundo vivo coloca a la heterotrofia como una vía metabólica ancestral (Oparin, todas sus obras). Por otra parte el análisis de las principales vías catabólicas, demuestra que la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación se encuentran regularmente asociadas a la membrana y a la cadena de transporte de electrones, lo que implica un alto grado de complejidad. Mientras que la fosforilación a nivel de sustrato, como son las etapas de la glucólisis, muestran que sus enzimas individuales no se encuentran ligadas entre sí por ninguna dependencia física, es decir, no parecen estar formando complejo enzimático alguno (Lehninger, 1975; Clarke y Elsdén, 1980). Sin embargo, algunas secuencias específicas de esos proce

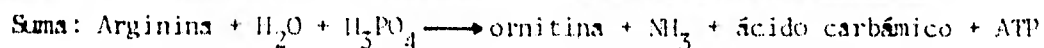
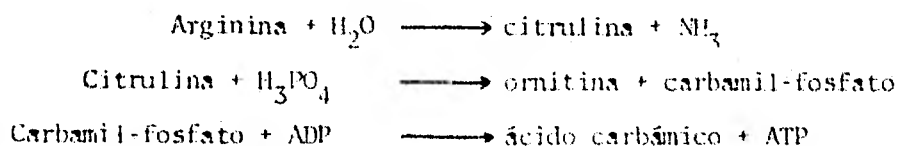
Los procesos se encuentran débilmente asociadas a la membrana plasmática. Además de que estos procesos sólo ocurren bajo condiciones anaeróbicas, los rendimientos bioenergéticos de la fermentación sólo permiten la síntesis de una a tres moléculas de ATP, lo que refleja su carácter primitivo.

En la actualidad se conocen diversas vías metabólicas heterótropas anaeróbicas estrictas (Decker *et al.*, 1970), lo que conduce a plantear la siguiente cuestión: ¿Cuál de las vías metabólicas heterótropas anaeróbicas actuales estuvo representada en los primeros seres vivos?

Una serie de consideraciones ha conducido al punto de vista de que las primeras vías metabólicas generadoras de ATP o moléculas acarreadoras alternativas, estuvieron representadas por la fosforilación a nivel de sustrato asociadas con reacciones de fermentación (Broda, 1975). Otro punto de vista al respecto es el propuesto por Oparin (1968), quien enfatiza en el metabolismo de los carbohidratos, sosteniendo que la glucólisis pudo haber sido la vía metabólica más primitiva. Apoyándose en lo propuesto por Oparin, Krebs y Kornberg (1957) sugieren que esto pudo haber sido seguido más tarde por una vía anaeróbica de las pentosas. Esto básicamente resulta de la amplia distribución de la glucólisis en los seres vivos actuales, además de que sólo requiere de once pasos enzimáticos para desdoblar la glucosa en alcohol, ácidos orgánicos y gases. Aún con estos argumentos esta hipótesis tiene el inconveniente de que los carbohidratos pudieron ser poco estables y difíciles de concentrarse bajo condiciones de la Tierra primitiva (Miller y Orgel, 1974; Broda, 1975). De tal forma que debieron usarse otros

sustratos fermentables anaeróbicamente pero con vidas medias altas.

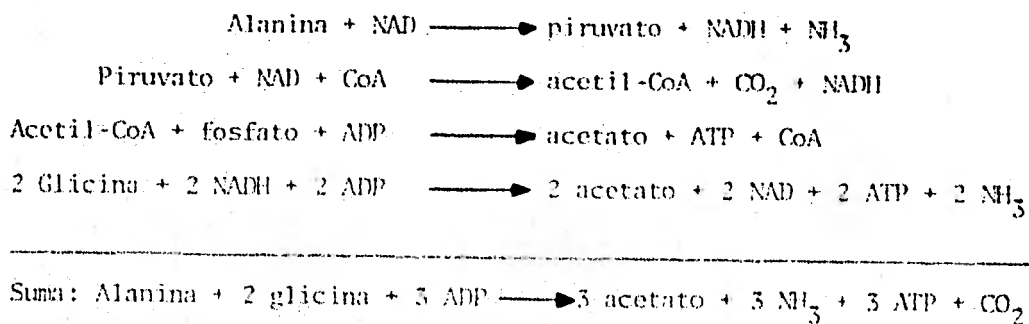
Clarke y Elsdén (1980) completan el planteamiento de Broda( 1975), postulando que los aminoácidos libres o dipéptidos fueron inicialmente utilizados como sustrato vía fermentativa, además de que se pudieron emplear en la síntesis de proteínas, sugiriendo así que en algunas vías catabólicas de las bacterias anseróbricas actuales, existen trazas de ciertas reacciones primitivas. Tal es el caso de las reacciones que producen carbamil-fosfato, en donde la arginina es utilizada por anaerobios de los géneros Streptococcus, Clostridium y Pseudomonas, que utilizan en un primer paso a la enzima L-arginina iminohidrolasa para producir citrulina y amoniaco, el próximo paso es el rompimiento fosforolítico de citrulina a ornitina y carbamil-fosfato por medio de la ornitina transcarbamilasa. La descomposición de la citrulina resulta en la formación de ATP en donde el paso final es llevado a cabo por la acción de la carbamato cinasa( Sokatch, 1969; Decker et al., 1970). La secuencia de reacciones es la siguiente:



Otro tipo de fermentación es la que ocurre con pares de aminoácidos, la reacción de Stickland, en donde un aminoácido es oxidado y otro reducido, por ejemplo la alanina funcionaría como donador de electrones y la glicina



como aceptor de los mismos (Sokatch, 1969; Decker et al., 1970).



Para la reducción de la glicina son requeridos fosfato inorgánico y ADP en adición a un ditiol o NADH. La reducción de la glicina a ácido acético se mostró estar acoplada a la formación de una cantidad estequiométrica de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Hay evidencias que muestran que dos proteínas son las involucradas.

De lo anterior concluyen los autores que de todas las reacciones conocidas en la fermentación de aminoácidos, sólo algunas ocurrieron en las etapas tempranas de la evolución metabólica (algunas de las presentadas anteriormente), ya que es posible generar enlaces pirofosfatos de fosfato inorgánico por una reacción acoplada entre un aceptor de electrones específico (glicina o prolina) activado por catalizadores específicos y un donador de electrones no específico, donde la producción de éste requiere de un catalizador. De donde sugieren un sistema primitivo en el que el poder

reductor es provisto directamente de un compuesto del medio, por ejemplo un ditiol, sin necesitar un catalizador específico.

Los tipos de compuestos importantes para la fosforilación a nivel de sustrato en metabolismos anaeróbicos se ilustran en la Tabla 2.

A pesar de que un número considerable de nutrientes es utilizado por los organismos anaeróbicos hay sólo seis a ocho pasos de fosforilación a nivel de sustrato para la conservación de energía (Tabla 2).

Muchos microorganismos anaeróbicos deben completar la formación de ATP por una sola fosforilación a nivel de sustrato, mientras que la mayoría de las células aeróbicas tienen además de varias fosforilaciones a nivel de sustrato también un sistema muy efectivo de fosforilación por transporte de electrones de la cadena respiratoria (Decker *et al.*, 1970).

Así, el número de procesos enzimáticos asociados con la fosforilación a nivel de sustrato, se ha encontrado ser sorprendentemente pequeño.

Ejemplos de la degradación anaeróbica de aminoácidos, alcoholes, ácidos grasos, bases nitrogenadas y carbohidratos (Barker *et al.*, 1940; Barker *et al.*, 1945; Krebs y Kornberg, 1957; Wood, 1961; Decker *et al.*, 1970), han mostrado que sólo unos pocos intermediarios ricos en energía (acil-CoA, formil FH<sub>4</sub><sup>\*</sup>, carbamil-fosfato) son formados (Tabla 2) (Decker *et al.*, 1970).

El proceso catalizado por las acilato cinasas es la más importante reacción para la producción de energía en anaerobios. Esto ocurre en todas

\* Acido tetrahidrofólico

Tabla 2. SUSTRATOS "RICOS EN ENERGIA" DE LAS ENZIMAS SIMETIZADORAS DE  
ATP EN LA FOSFORILACION A NIVEL DE SUSTRATO.

TIPO DE COMPUESTO	SUSTRATO	ENZIMA
fosfoacil anhídrido	acetil fosfato	acetato cinasa *
	carbamil fosfato	carbamato cinasa *
	3-fosfo gliceril 1-fosfato	3-fosfoglicerato cinasa *
	propionil fosfato	propionato cinasa *
	butiril fosfato	butirato cinasa *
fosfoenol éster	fosfoenol piruvato	piruvato cinasa *
acil tioéster	succinil CoA	succinato tiocinasa **
acil anilido	N <sup>10</sup> formil tetrahidrofolato	N <sup>10</sup> formil tetrahidrofolato cinasa **

\* ADP + sustrato  $\rightleftharpoons$  P  $\leftarrow$   $\rightleftharpoons$  ATP + sustrato

\*\* ADP + Pi + sustrato  $\rightleftharpoons$  X  $\leftarrow$   $\rightleftharpoons$  ATP + sustrato + X

Adaptado de Decker et al., 1970.

las especies del género Clostridium. Las acilato cinasas, por lo tanto, pueden ser consideradas enzimas típicas de la vida anaeróbica; aunque también han sido encontradas en organismos facultativos pero nunca en aerobios estrictos (Decker et al., 1970).

Se puede decir que muchas vías metabólicas ancestrales difícilmente se encuentran representadas en los seres vivos actuales, debido al proceso de selección natural, pero también existen algunos pasos enzimáticos de catabolismos anaeróbicos bacterianos, que han permitido suponer que en el pasado fueron diferentes sustratos fermentables los que se utilizaron como fuente de energía, encontrando en las fosforilaciones a nivel de sustrato, procesos enzimáticos de naturaleza primitiva o ancestral (Oparin, 1968; Decker et al., 1970; Clarke y Elsdén, 1980).

La evolución de los procesos biológicos requiere de tres componentes principales: la reproducción, la mutación y las presiones de selección del medio ambiente. A partir del análisis de los metabolismos fermentativos contemporáneos, se intentó una reconstrucción de la estructura de las comunidades microbianas que presumiblemente existían antes de la aparición de las primeras formas de vida autótrofas (López-Cortés y Lazcano-Araujo, 1980). Estos son eventos para los cuales carecemos, por el momento, de evidencias geoquímicas o paleontológicas; recordemos que los microfósiles más antiguos descubiertos hasta hoy corresponden a una población de procariontes de una edad de apenas  $3.5 \times 10^9$  años (Knoll y Barghoorn, 1977), y que los sucesos que se describen deben haber tenido lugar en los primeros millones

de años de la existencia de la vida en el planeta. A pesar de esta limitación, es posible renacer, a partir de las características metabólicas más extendidas entre los organismos contemporáneos y de técnicas como la secuencia de aminoácidos en proteínas, las primeras etapas de la evolución biológica.

Margulis (1972) ha detallado los procesos previos a la aparición de los primeros autótrofos, los cuales se enumeran a continuación:

- a.- Origen de la población ancestral de células procariontes heterótrofas anaerobias.
- b.- Origen y evolución de mecanismos de reparación a daños provocados a los ácidos nucleicos por la radiación ultravioleta (Hanawalt et al., 1968; Howard-Flanders et al., 1968).
- c.- Aparición de vías para reducir el dióxido de carbono y la fijación de nitrógeno molecular atmosférico (Sokatch, 1969; Postgate, 1970).
- d.- Origen de rutas biosintéticas productoras de derivados de tetrapirroles e isoprenoides (Tornabene et al., 1978).
- e.- Desarrollo de las diversas fermentaciones heterotróficas.

De esta manera demuestra que previa a la aparición de los primeros autótrofos ocurrió una diversificación de las rutas fermentativas. Este hecho solamente se puede interpretar como una estrategia evolutiva que permitió, gracias a un proceso temprano de especiación, en su sentido más amplio, la invasión de nuevos nichos ecológicos con la subsecuente fermentación de nuevos sustratos.

Si examinamos con detalle las fermentaciones contemporáneas ( ver Tabla 3 ), es necesario reconocer que una de las diferencias fundamentales que exhiben los microorganismos fermentativos contemporáneos con respecto a sus ancestros, es el de la utilización de sustratos que tienen un origen biológico, mientras que los heterótrofos anaerobios primitivos utilizaban sustancias orgánicas sintetizadas abióticamente (Broda, 1975). Esta situación es particularmente evidente en el caso de la utilización de polisacáridos, ya que estos compuestos difícilmente hubieran podido existir en cantidades apreciables en los mares primitivos, y su degradación anaerobia por especies de los géneros Clostridium, Lactobacillus y otros más probablemente revela una adaptación posterior.

Pero lo que también muestra el análisis de los productos de las fermentaciones contemporáneas es el hecho de que, aparte de los gases liberados, entre los compuestos formados se encuentran con frecuencia sustancias como los ácidos orgánicos o alcoholes, con grupos funcionales adicionales, que permiten nuevas reacciones de deshidrogenación e hidrogenación. Se puede afirmar entonces que los productos de algunas fermentaciones pueden servir, cuando son liberados al medio ambiente, como sustratos para las fermentaciones que llevan a cabo otros microorganismos.

La Tabla 4 muestra varios ejemplos en los que se han establecido cadenas de fermentaciones indicando las especies que son responsables de cada uno de estos pasos. Si recordamos que los microorganismos modernos que llevan a cabo esas fermentaciones son representantes de los que aparecieron

SUSTRATOS	PRODUCTOS	GENEROS	GASES LIBERADOS
DISACARIDOS Y MONOSACARIDOS	Acidos acético, láctico, succínico, propiónico, butírico, pirúvico, fórmico; acetona, etanol, butanol, isopropanol, 2,3 butanediol, acetofina, manitol, glicerol.	<u>Ruminococcus</u> , <u>Clostridium</u> , <u>Leuconostoc</u> , <u>Lactobacillus</u> , <u>Propionibacterium</u> , <u>Bacillus</u> , <u>Bacteroides</u> , <u>Eubacterium</u> , <u>Treponema</u> , <u>Borrelia</u> , <u>Peptococcus</u> , <u>Sarcina</u> , <u>Leptotrichia</u> , <u>Succinivibrio</u> , <u>Succinomonas</u> , <u>Butryvibrio</u> , <u>Lachnospira</u> , <u>Selenomonas</u> , <u>Megasphaera</u> , <u>Peptostreptococcus</u> , <u>Actynomices</u> , <u>Arachnia</u> , <u>Bifidobacterium</u> , <u>Rothia</u> , <u>Spirochaeta</u> , <u>Thermoplasma</u> , <u>Mycoplasma</u> , <u>Staphylococcus</u> .	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O
POLISACARIDOS	Acidos acético, láctico, succínico, propiónico, butírico; acetona, butanol, isopropanol.	<u>Ruminococcus</u> , <u>Clostridium</u> , <u>Lactobacillus</u> , <u>Cellulomonas</u> , <u>Propionibacterium</u> .	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>
POLIPEPTIDOS, DIPEPTIDOS Y AMINOACIDOS	Acidos acético, láctico, propiónico, butírico, pirúvico, málico, valérico; etanol, cetobutirato, metilmercaptan, formamida, fenoles, diamino valerato, alanina, citrulina, ornitina, mesaconato.	<u>Clostridium</u> , <u>Treponema</u> , <u>Peptococcus</u> , <u>Acidaminococcus</u> , <u>Fusobacterium</u> , <u>Streptococcus</u> , <u>Bacillus</u> , <u>Spirillum</u> , <u>Veillonella</u> , <u>Micrococcus</u> .	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> S
BASES PIRIMIDICAS	Acidos acético, láctico, fórmico, oxalicoglicólico; glicina, β-alanina.	<u>Clostridium</u> , <u>Peptococcus</u> , <u>Streptococcus</u> , <u>Micrococcus</u> .	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub>

Tabla 3. FERMENTACIONES ANAEROBIAS EN BACTERIAS.

SUBSTRATOS	PRODUCTOS	GENEROS	GASES LIBERADOS
BASES PURICAS	Acidos acético, láctico, propiónico, úrico, urea, formato, glicina.	<u>Clostridium</u> , <u>Peptococcus</u> , <u>Veillonella</u> , <u>Micrococcus</u> .	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub>
ACIDOS ORGANICOS	Acidos acético, succínico, propiónico, butírico; caproato.	<u>Clostridium</u> , <u>Propionibacterium</u> , <u>Megasphaera</u> , <u>Peptostreptococcus</u> , <u>Veillonella</u> , <u>Spirillum</u> , <u>Selenomonas</u> , <u>Streptococcus</u> , <u>Micrococcus</u> .	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O
ALCOHOLES	Acidos acético, succínico, propiónico, butírico, caproico.	<u>Clostridium</u> , <u>Propionibacterium</u> , <u>Spirillum</u> , <u>Succinivibrio</u> .	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O
ACIDOS ORGANICOS-ALCOHOLES	Butirato; caproato.	<u>Clostridium</u> .	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>

Tabla 3. FERMENTACIONES ANAEROBIAS EN BACTERIAS. (continuación)



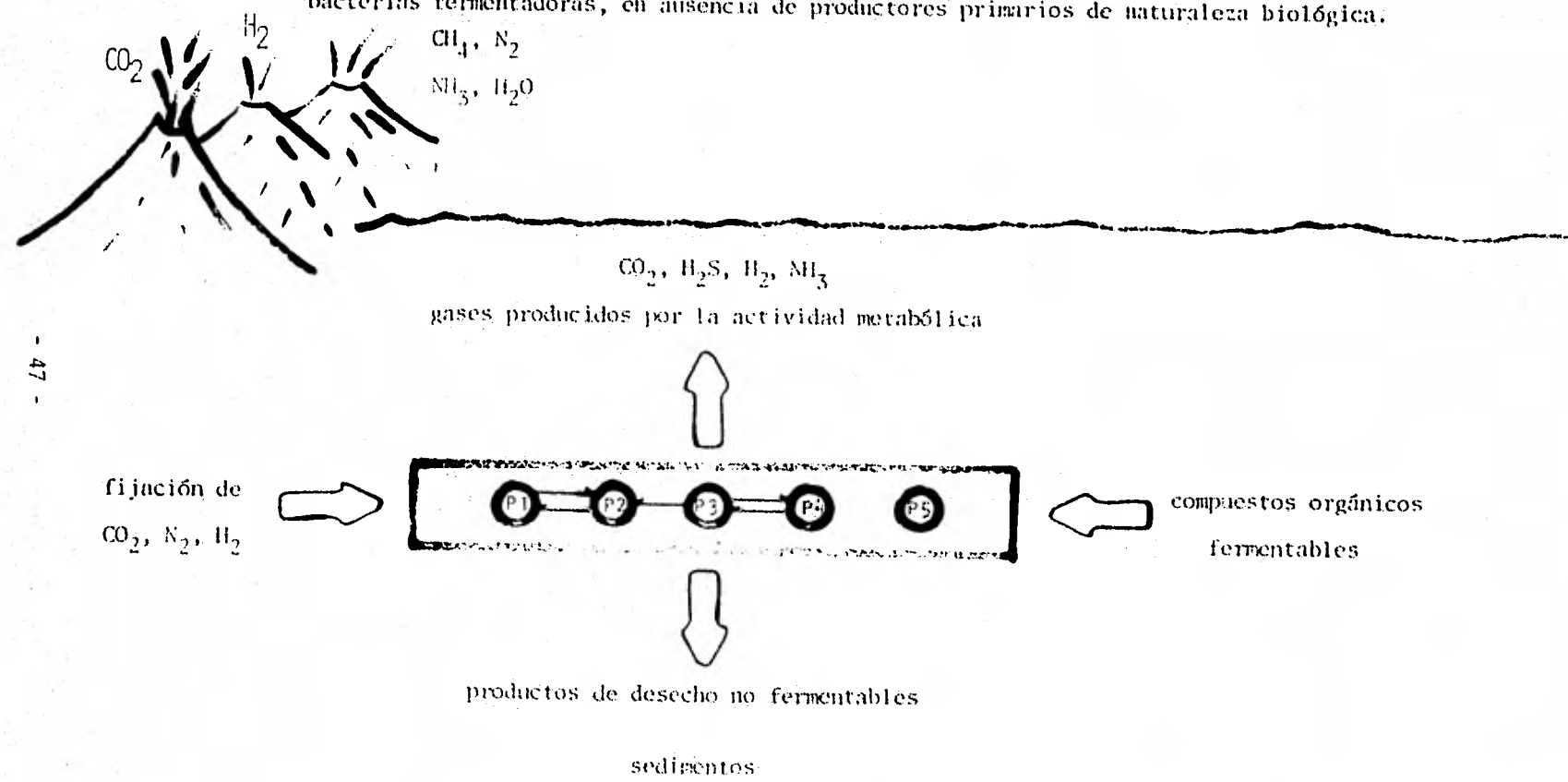
Tabla 4. POSIBLES CADENAS TROFICAS ESTABLECIDAS POR POBLACIONES DE BACTERIAS FERMENTADORAS.

Glucosa	<u>L. lycopersici</u> <u>C. butyricum</u>	Lactato	<u>P. pentosaceum</u>	Succinato	<u>P. shermani</u> <u>P. arabinosum</u>	Acetato	<u>C. kluyveri</u>	Butirato, H <sub>2</sub> , Caproato
Cisteína	<u>Clostridium</u>	Piruvato	<u>C. propionicum</u>	Propionato, CO <sub>2</sub>				
Arginina	<u>C. perfringens</u> <u>S. faecalis</u>	Citrulina	<u>C. perfringens</u> <u>S. faecalis</u>	Ornitina, CO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub>				
Ala-Gli	<u>C. lentoputrescens</u> <u>C. sticklandii</u>	Acetato	<u>C. kluyveri</u>	Butirato, H <sub>2</sub> , Caproato				
Adenina	<u>M. aerogenes</u>	Lactato	<u>P. pentosaceum</u>	Succinato	<u>P. arabinosum</u> <u>P. shermani</u>	Acetato	<u>C. kluyveri</u>	Butirato, H <sub>2</sub> , Caproato
Xantina, Guanina	<u>C. acidi-urici</u>	Acetato	<u>C. kluyveri</u>	Butirato, H <sub>2</sub> , Caproato				
Uracilo	<u>C. uracillicum</u>	Alanina	<u>C. propionicum</u>	Propionato, CO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub>				

antes de que existiesen los primeros autótrofos, se puede concluir entonces que los ancestros de los fermentadores contemporáneos, utilizaban como sustratos no solamente sustancias de origen abiótico, sino también aquéllas que se producían gracias a la actividad biológica. Lo que esta conclusión implica a su vez es que en la Tierra primitiva se daban, entre poblaciones de heterótrofos anaerobios coexistentes, no solamente relaciones de competencia intra e interespecifica por los mismos sustratos, sino que además existían redes tróficas entre diferentes poblaciones, pero todo ello en ausencia de productores primarios de carácter biológico. Se puede afirmar entonces que a pesar de que los primeros ecosistemas aparecieron con la vida misma, como una consecuencia lógica de la interacción de los eubiontes con el medio ambiente en el que habían surgido (Maynard-Smith, 1969), la aparición de diferentes rutas fermentativas llevó a un incremento en la complejidad de la biósfera primitiva, no solamente por el aumento en la diversidad sino además por el establecimiento de las primeras comunidades biológicas, entendidas éstas en su sentido ecológico más estricto como un conjunto de poblaciones que interaccionan entre sí y con su medio ambiente.

La Figura 8 esquematiza de una manera muy general, la situación descrita. Las comunidades de heterótrofos anaerobios, formadas por diferentes poblaciones, vivían en un medio esencialmente reductor, y su hábitat más probable debe haber sido sedimentos poco profundos, donde las concentraciones de materia orgánica de origen abiótico y biológico serían mayores. A pesar de que la productividad de estos ecosistemas debe haber sido relativamente

Figura 8 . Esquema que ilustra el establecimiento de relaciones tróficas entre poblaciones de bacterias fermentadoras, en ausencia de productores primarios de naturaleza biológica.



baja, el impacto medioambiental de su actividad metabólica se debe haber dejado sentir, sobre todo en la composición química de la atmósfera, la hidrósfera y los sedimentos.

Al iniciarse la historia de estas comunidades microbianas, la existencia de muchos nichos vacíos, permitía que nuevas especies los invadieran fácilmente, lo cual aumentaba la estabilidad de estas comunidades. El crecimiento poblacional se detuvo cuando algún compuesto esencial estaba siendo consumido por los organismos, tan rápidamente como estaba siendo producido abióticamente, hasta que la mutación produjo un organismo capaz de sintetizar el compuesto necesitado de otros compuestos más abundantes. La nueva capacidad metabólica dio al mutante una ventaja competitiva, así se multiplicó hasta que la nueva capacidad se extendió. El total de la población microbiana se expandió hasta que un compuesto esencial diferente fue menos disponible (Walker, 1980).

Así, la mutación combinada con la selección natural, causó que las vías biosintéticas evolucionaran a una etapa en el tiempo en direcciones determinadas por la mezcla de compuestos orgánicos provistos por la síntesis abiótica (Miller y Orgel, 1974). A medida que el proceso de diversificación del metabolismo fermentativo llevó a la utilización de todos los sustratos posibles, la invasión de nuevos nichos se vio imposibilitada. Se depositaron entonces en los sedimentos los productos de las fermentaciones, que además de que ya no podían ser degradados, eran tóxicos; pero más importante aún, el agotamiento de las sustancias orgánicas de origen abiótico provocado

por las condiciones de crecimiento relativamente irrestricto que existían, constituyó la presión de selección más importante que llevó a la aparición de los primeros autótrofos.

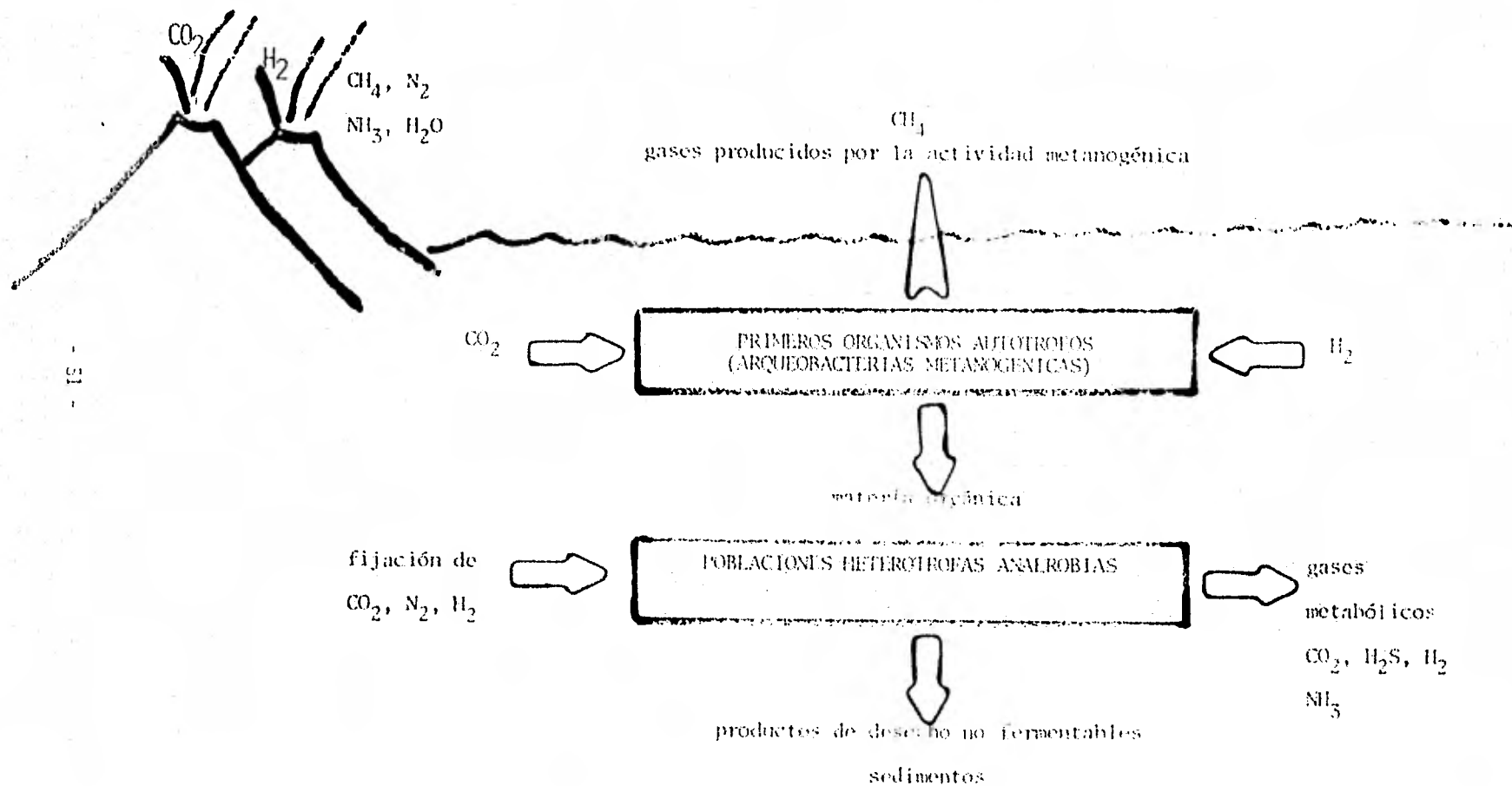
A continuación se resume algunas de las características de las bacterias metanógenas (Woese *et al.*, 1976; Batch *et al.*, 1977; Fox *et al.*, 1977; Zeikus, 1977) que sugieren que en efecto son las representantes contemporáneas de los primeros procariontes autótrofos que surgieron en la Tierra y que se convirtieron en los primeros productores primarios biológicos (ver Tabla 5 ). Es probable, en efecto, que los pigmentos y la fotosíntesis sean adquisiciones posteriores (Decker *et al.*, 1970; Olson, 1970; Hall, 1971) y que las primeras formas de vida autótrofa hayan sido organismos quimiosintéticos (Margulis, 1970; Walker, 1980). Tanto el  $\text{CO}_2$  como  $\text{H}_2$  eran gases relativamente abundantes en la atmósfera primitiva de la Tierra (Walker, 1977), y la utilización del primero como aceptor de electrones y el segundo como donador de electrones en la síntesis de materia orgánica y de energía, por parte de las bacterias metanógenas, sugiere entonces la existencia de ecosistemas como el que se muestra en la figura 9 .

Aunque es razonable suponer que algunas poblaciones de heterótrofos anaerobios hayan desaparecido al no lograr adaptarse a las nuevas condiciones, las nuevas comunidades biológicas que se establecieron, poseían ya productores primarios de carácter biológico, representados por los ancestros de las metanógenas contemporáneas. Sin embargo, aunque es probable que hubiese un incremento en la biomasa global con la aparición de los primeros

**Tabla 5. CARACTERISTICAS DE LAS BACTERIAS METANOGENAS.**

- 1.- Secuencia de nucleótidos en el 16 S ARN ribosomal diferente a eubacterias y cianobacterias.
- 2.- Ausencia de T  $\psi$  CG en el ARN<sup>t</sup>.
- 3.- Ausencia de péptido-glucano en la pared celular.
- 4.- Membrana plasmática constituida por éteres de glicerol y fitanol.
- 5.- Ausencia de citocromos.
- 6.- Anaerobios obligados.
- 7.- Producción de CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O y materia orgánica a partir del CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>.

Figura 9 . Esquema que ilustra el establecimiento de relaciones tróficas entre poblaciones de bacterias fermentadoras y poblaciones de bacterias quimioautotróficas.



autótrofos, es probable también que las nuevas comunidades estuviesen restringidas a hábitats muy específicos, posiblemente sedimentos de lagunas someras, donde la actividad de las metanógenas fuese favorecida por condiciones locales altamente reductoras de origen no biológico. (Walker, 1979). Las asociaciones que existen hoy en día entre organismos fermentativos productores de hidrógeno y metanobacterias (Zeikus, 1977) sugieren, sin embargo, que la liberación de este gas y el  $\text{CO}_2$  durante la fermentación, contribuyó a la creación de hábitats especialmente favorables para la actividad metanogénica.

Probablemente el mejor ejemplo contemporáneo de estos ecosistemas sea la relación entre los llamados organismos S y las bacterias metanógenas (ver Figura 10 ).

Al estudiar la mal llamada especie Methanobacillus omelianskii, Bryant et al., ( 1967) descubrieron que se trataba en realidad de una simbiosis entre una metanógena y un tipo de bacteria heterótrofa anaerobia carente de citocromo, al que dieron el nombre de organismo S. El establecimiento de una asociación en el laboratorio entre los organismos S y Methanobacterium ruminantium permitió a Adinarayana-Reddy et al. (1972), establecer las alteraciones al metabolismo fermentativo y el incremento en la eficiencia metabólica al reducirse la presión parcial de  $\text{H}_2$ . Este fenómeno, reconocido hoy como una transferencia interespecífica de hidrógeno (Zeikus, 1977), implica que la productividad orgánica en la Tierra primitiva debe haber aumentado no solamente gracias a la aparición de microorganismos autótrofos



(Walker, 1977,1979), sino también debido al establecimiento de relaciones cooperativas o simbióticas, indicadas en la figura 10 con una línea quebrada, entre autótrofos y heterótrofos. Sin embargo, la pérdida de  $H_2$  atmosférico en la Tierra primitiva (Walker, 1979, 1980) llevó a la desaparición de estos ecosistemas y eventualmente a la aparición de la fotosíntesis bacteriana. Los ejemplos que hoy existen de asociaciones entre organismos fermentativos y metanógenas, sólo pueden ser interpretados como resultado de un proceso de coevolución de más de tres mil quinientos millones de años, gracias a la producción de  $H_2$  por la actividad fermentativa y a su utilización por las arqueobacterias metanogénicas.

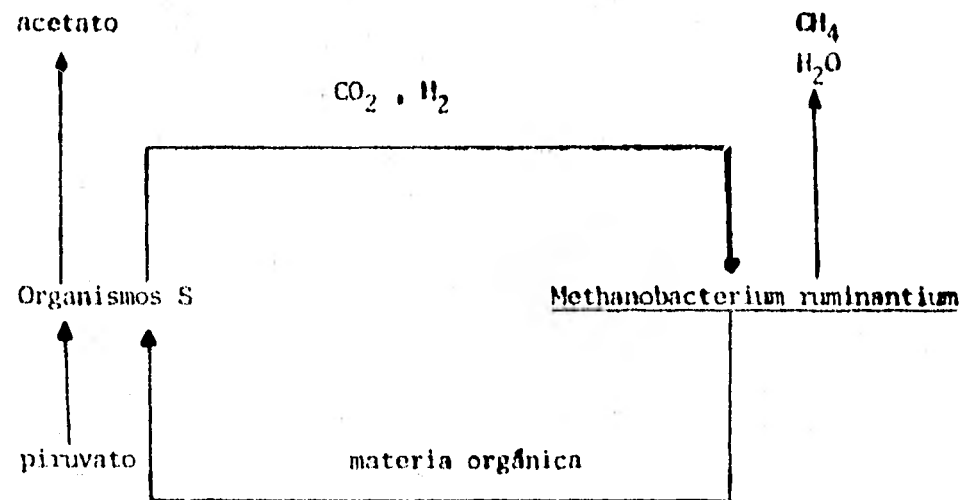


Figura 10. Ejemplo contemporáneo de relaciones bioenergéticas entre bacterias metanógenas y organismos heterótrofos fermentadores. Adaptado de : Adinarayana-Reddy, et al. 1972.

### III. - METODOS Y MATERIALES

#### A. - Aislamiento.

Las muestras del tapete microbiano laminado se obtuvieron del sitio indicado en la Figura 1, conocido por el grupo de Margulis y colaboradores como "North Pond", localidad inicialmente descrita por Horodyski y colaboradores en 1977, la cual forma parte del "Complejo Laguna Figueroa", Baja California Norte, México.

Los organosedimentos obtenidos de consistencia viscosa, desprenden un olor a sulfuro de hidrógeno sugiriendo que la comunidad microbiana es anaeróbica hasta un nivel de diez centímetros por debajo de la superficie (Giovannoni, 1979).

Las muestras estudiadas se colectaron en agosto de 1980, estando cubiertas por una capa de sedimentos terrígenos producto de las inundaciones del mismo año (Figura 11). En estas condiciones, los ecosistemas microbianos laminados experimentaron degradación de los polígonos de Microcoleus y una disminución o ausencia de la productividad y crecimiento de los tapetes cianobacterianos. No fue sino hasta agosto de 1981 que volvieron a reemerger los organosedimentos laminados apreciándose la desaparición de Microcoleus y varias especies de cianobacterias.

Para el verano de 1981, la comunidad alterada, estuvo dominada por bacterias cocoidales púrpuras sulfurosas tiocapsoides (Margulis et al., en preparación).

Las muestras fueron colectadas directamente en cajas de Petri estériles sujetas al sistema anaeróbico BBL 60465 CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> a temperatura ambien-

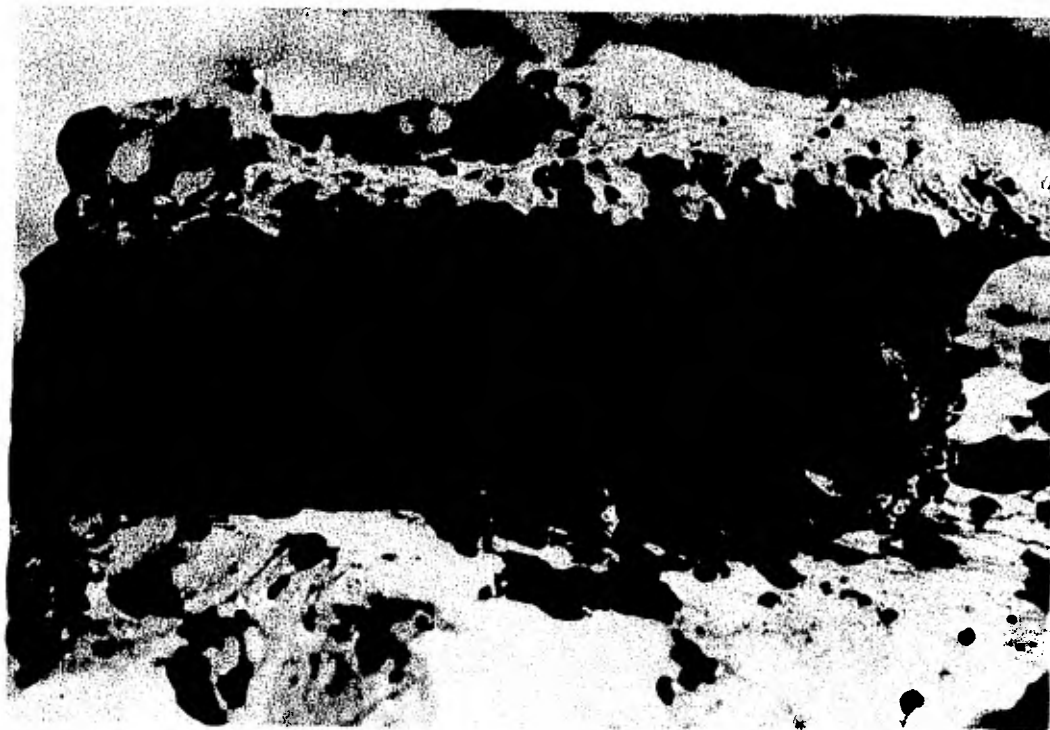


Figura 11. Muestra de un ecosistema microbiano laminado de la Laguna Figueroa, Baja California Norte, México (tamaño original).

te; muchas otras fueron envueltas simplemente con papel aluminio con el fin de evitar la desecación.

El aislamiento propiamente dicho se realizó en el laboratorio de Bacteriología del Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina, U.N.A.M., para esto se tomó un gramo de las capas de color negro y/o rojo de la parte interna de la muestra, disolviéndolo en nueve mililitros de agua destilada estéril o solución salina al 0.85% para posteriormente realizar diferentes diluciones ( $10$  a  $10^{-5}$ ) a partir de la concentración inicial.

De cada una de las diluciones se tomó 0.1 ml para sembrar en el medio de aislamiento AMC-Agar (Agua de Mar Complementada, ver Apéndice) extendiéndolo perfectamente bien por el método de estrías cerradas e incubándose a  $30^{\circ}$  C durante 24 a 48 horas.

Con el fin de obtener estructuras bacterianas o bacterias resistentes a las altas temperaturas, se trataron las mismas diluciones a  $75^{\circ}$  C durante diez minutos para sembrarse más tarde en el medio de aislamiento AMC-Agar.

Para garantizar la pureza de las cepas, las colonias previamente obtenidas en AMC-Agar fueron sembradas en Agar Nutritivo que contiene NaCl 1.0 y 1.5 M, incubándose a  $45$  y  $55^{\circ}$  C durante 24 a 48 horas.

#### B.- Medio de Almacenamiento y Determinación de la Morfología Colonial.

Para su almacenamiento las cepas fueron crecidas regularmente en tu-

bos inclinados con AMC-Agar a temperatura ambiente, resemebrándose cada cuatro meses. La morfología colonial se determinó en cultivos de 24 y más horas de crecimiento a 30, 45 y 55° C en los medios AMC-Agar y Agar-NaCl a diferentes molaridades.

#### C.- Técnicas de Anaerobiosis.

Las cepas aisladas fueron crecidas anaeróbicamente en Agar Anaeróbico Difco 0536-02, con ayuda del sistema de jarras anaeróbicas BBL 60465 CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>, incubadas durante siete días a temperatura de 30° C.

El medio Tioglicolato de Sodio con indicador y glucosa Difco 0236-01, también fue utilizado para simular condiciones con bajos potenciales de óxido reducción (Eh°).

Con cubiertas de cajas de Petri tipo Brewer y Agar Anaeróbico Difco 0536-02, también se obtienen condiciones anoxigénicas incubándose durante siete días a 30° C.

En otro método se usaron de dos a tres mililitros de aceite mineral en el medio basal O-F BBL-11484, que contenía una solución final de glucosa al 1%, el aceite se usó con la idea de impedir la oxigenación del medio.

#### D.- Microscopía Fotónica.

Los estudios de morfología celular se realizaron tanto en cultivos frescos como envejecidos, básicamente a partir de los crecimientos obte-

nidos en ANC-Agar y Agar NaCl 1.0 y 1.5 M.

Para determinar la reacción de Gram, se utilizó la metodología modificada de Hucker (Gerhardt et al., 1981).

La presencia de gránulos metacromáticos fue determinada con el colorante de Albert (Gerhardt et al., 1981).

Otro tipo de inclusiones citoplasmáticas como son los gránulos de poli  $\beta$  hidroxibutirato (PHB), se detectaron con el colorante Negro Sudán B (Gerhardt et al., 1981).

El método citado en Bradshaw (1979), se empleó para caracterizar la presencia de cápsula.

En el intento de complementar las técnicas de tinción se realizaron observaciones en contraste de fases con un fotomicroscopio Carl Zeiss.

#### E.- Micrografía Electrónica.

a.- Obtención de la muestra. La cepa problema fue crecida en el medio de cultivo ANC-caldo (ver Apéndice) durante 24 horas y cinco días a 30° C, centrifugándose en condiciones estériles a 5,000 rpm durante diez minutos.

b.- Fijación. El botón bacteriano se fijó en glutaraldehído al 3%, agregándose en algunos casos una solución de albúmina al 0.05%, disuelta en el fijador durante seis a ocho horas a 25° C, transcurrido el tiempo las muestras tratadas con albúmina se lavaron con amortiguador de cacodilatos 0.15 M pH 7.3, tres cambios de treinta minutos cada uno de ellos, las tratadas sin albúmina se lavaron con amortiguador de fosfatos 0.15 M pH 7.4 de

la misma manera que en el caso anterior.

c.- Postfijación. Los especímenes sin albúmina fueron postfijados en tetraóxido de osmio al 1%, usándose la campana de extracción y en amortiguador de fosfatos 0.15 M pH 7.4 por doce horas a 25°C.

Las muestras tratadas con albúmina también se postfijan con tetraóxido de osmio al 1%, pero con amortiguador de cacodilatos 0.15 M, en este paso algunos de los especímenes se marcaron con rojo de rutenio (0.0025 g de rojo de rutenio disueltos en 2.5 ml de amortiguador de cacodilatos 0.3 M más 2.5 ml de tetraóxido de osmio al 1%) y se almacenaron durante doce horas a 4°C.

d.- Deshidratación. Las muestras se deshidrataron en alcoholes a concentraciones graduales crecientes al 70, 80 y 90%, cada cambio de treinta minutos a temperatura ambiente, tres cambios de alcohol etílico absoluto cada uno a los cuarenta minutos y dos cambios de óxido de propileno cada cuarenta minutos.

e.- Infiltración. Los especímenes se pasaron por diferentes mezclas de óxido de propileno y Epon 812.

1a. mezcla 75:25 durante 48 horas

2a. mezcla 50:50 durante 72 horas

3a. mezcla 25:75 durante 48 horas

Los tratamientos se realizaron a 25°C. Por último se infiltraron en el Epon mezcla final 6:4 por tres horas en moldes de aluminio; esta mezcla debe almacenarse en la obscuridad a 4°C.



f.- Inclusión. Las muestras se incluyeron colocando la resina epóxica y las muestras en moldes planos que se rotulan y polimerizan en la estufa a 60°C por 12 a 24 horas.

g.- Contraste. Los cortes ultrafinos obtenidos, se trataron con acetato de uranilo al 2% durante veinte minutos, para posteriormente lavarse con agua destilada durante dos minutos, un segundo agente de contraste utilizado fue el citrato de plomo durante veinte minutos en una cámara de hidróxido de sodio para posteriormente lavar con agua destilada durante dos minutos. Algunos de los cortes solo fueron contrastados con el primer agente mencionado.

Las observaciones se llevaron a cabo con un microscopio Carl Zeiss E M-9 S-2.

F.- Perfil Bioquímico.

La fermentación de la D-glucosa fue probada usando el medio basal O-F BBL a una concentración final del 1%, utilizando un tapón de aceite mineral.

El medio basal O-F también nos permite detectar la capacidad que tiene el microorganismo para oxidar la D-glucosa en ausencia de un tapón de aceite. Además la movilidad y la producción de gas pueden ser apreciadas.

Otra metodología empleada para determinar la producción de ácidos a partir de la D-glucosa y otros carbohidratos es la citada en el Manual Bergey, octava edición, se utilizó el Medio 1 (ver Apéndice), donde los carbohidratos D-glucosa, D-manitol, D-arabinosa, L-arabinosa y D-xilosa se esteriliza-

ron con membranas milipore de 0.45  $\mu$ m de diámetro.

El Medio 2, citado en el mismo manual (ver Apéndice), se elaboró para determinar la producción de gas a partir del desdoblamiento de los azúcares antes mencionados. Para obtener un pH final de 7.0 se ajustó con NaOH 1.0 M.

El Medio 3, anotado en la misma obra (ver Apéndice), permitió la determinación de la producción de acetofina a partir de glucosa. Los reactivos agregados a la alícuota con crecimiento bacteriano de cinco días, fueron 0.5 ml de  $\alpha$  y 0.5 ml de NaOH al 40%. Esta misma característica puede determinarse a partir del ensayo Voges-Proskauer y los mismos reactivos.

La capacidad de reducir los nitratos fue identificada con el medio Agar-Nitratos Difco 0106-01 y la ayuda de los reactivos  $\alpha$  naftolamina al 0.5% y ácido sulfanílico al 0.8% (ver Apéndice). La presencia de nitratos en el medio se apreció con el polvo de zinc.

La producción de catalasa fue probada en el medio AMC-Agar con crecimiento bacteriano de 24 horas, colocando sobre las colonias peróxido de hidrógeno al 3%.

La detección de enzimas como la amilasa se determinó usando el medio Agar-Almidón 0.2% con crecimiento bacteriano de 24 horas y una solución de lugol como reactivo, la gelatina nutritiva Difco 0011-01 se usó para demostrar la presencia de la gelatinasa, responsable de su licuefacción y el medio de Litmus Milk Difco 0107-01, fue empleado para determinar la hidrólisis o peptonización de la caseína.

El medio SIM Merck 5470 es de utilidad para poner de manifiesto la diseminación de  $H_2S$ , la producción de indol a partir de triptofano utilizando el reactivo de Kovacs, así como un criterio fisiológico, la motilidad.

La desaminación de la fenilalanina se observó en el medio citado por Mac Faddin (1976), empleando el reactivo  $FeCl_3$  al 10% (ver apéndice).

Las pruebas de descarboxilación de la arginina y lisina se realizaron con la ayuda del medio Base Descarboxilasa de Moeller Difco 0890-01.

El medio Citrato de Simmons Difco 0091-01 se empleó para determinar la capacidad que tienen los microorganismos para utilizar un ácido carboxílico como fuente de carbono.

#### G.- Fisiología.

El efecto cualitativo producido por las altas concentraciones de  $NaCl$  (0.6, 1.0, 1.5, 2.0 M) en el crecimiento, fue determinado con el medio que contiene Agar-Nutritivo Difco 105450 y  $NaCl$ .

Se llevaron a cabo crecimientos en el medio antes citado, incubados a temperaturas de 45, 55 y 65°C con el fin de simular los parámetros medioambientales.

La cepa crecida en AMC-caldo fue sujeta a temperaturas de 55, 65, 75, 85 y 95°C durante cinco y diez minutos, resemebrándose en AMC-Agar con el fin de determinar la existencia de estructuras de resistencia a las altas temperaturas.

El caldo con azida al 0.025% con púrpura de bromocresol como indicador

de pH, Merck 3032, se empleó para determinar la capacidad de crecimiento en un medio que contiene un inhibidor del transporte de electrones en la cadena respiratoria aerobia.

La capacidad de crecer en Sabouraud Dextrosa Agar Difco 0109-01 se empleó como un criterio taxonómico más.

Por otra parte, todas las pruebas también se realizaron con la cepa control tipo Bacillus subtilis e 6051 ATCC, proporcionada por el Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I. P. N.

La capacidad de oxidar el manganeso fue determinada en la Universidad de Boston por parte de la Dra. Lynn Margulis (Margulis et al., en preparación).

#### IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

De los diez aislamientos intentados se obtuvieron aproximadamente ciento veinte cepas heterótrofas "puras", no necesariamente diferentes, en las cuales dominaban las formas bacilares que crecieron regularmente en agar NaCl al 7% y también la mayoría de ellas creció en el sistema anaeróbico BBL CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 60465. Otras características que se encontraron ampliamente distribuidas fueron la capacidad de crecer en tioglicolato de sodio, la producción de ácido y gas a partir de D-glucosa, ácido de D-manitol, acetona de D-glucosa, además de que buena parte de ellas reducía los nitratos a nitritos.

Los bacilos esporulados se seleccionaron para ser caracterizados, la presencia de endosporas sirvió como criterio para facilitar su reconocimiento con respecto a otras bacterias, ya que esta estructura es exclusiva de no más de diez géneros.

Las características de la morfología colonial de la cepa 36 B-M, se establecieron a partir de los crecimientos obtenidos en AMC-Agar incubados a 30°C durante 24 horas, siendo ésta de forma irregular extendida, elevación plana, margen filamentosos y consistencia butirosa (Figura 12 ). Los cultivos envejecidos son capaces de formar un "tapete bacteriano" que llega a cubrir la superficie de la caja de Petri. En Agar-NaCl 1.0 M y 1.5 M incubados a 45 y 55°C durante 24 horas exhibieron morfologías celulares distintas. Los crecimientos en Agar-NaCl 1.0 M a 45°C presentaron colonias de forma esférica rodeadas por mechones de hebras esteladas, estas mismas características han sido observadas en tratamientos a 55°C y la misma concentración de sales

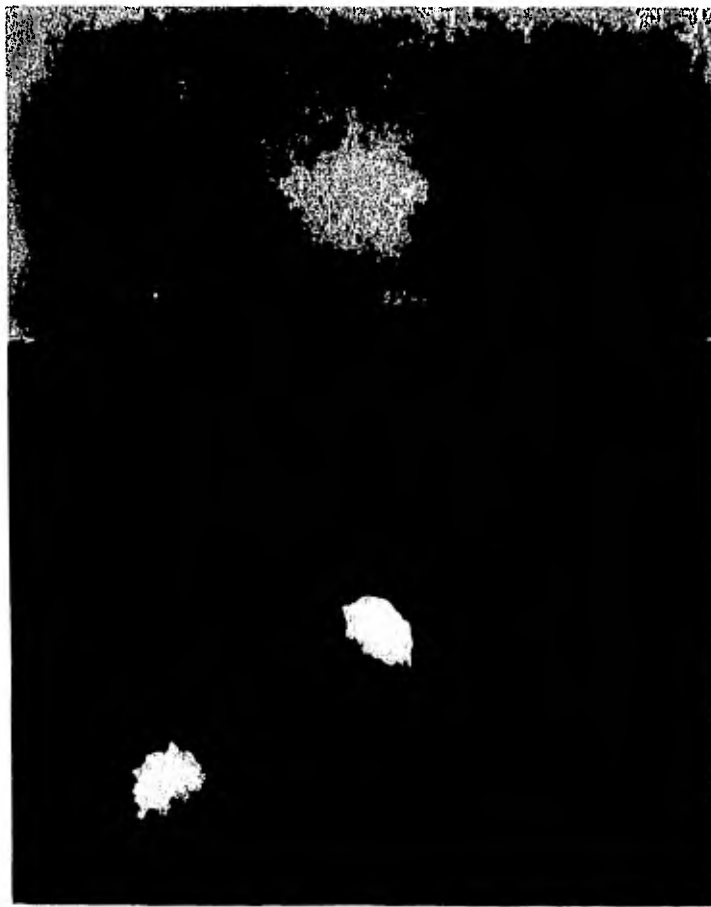


Figura 12. Morfología colonial de la cepa 36 B-M crecida en AMC-Agar durante 24 horas a 30° (C (aumento 5 X )

(Figura 13). Cuando se crecen Agar-NaCl 1.5 M, incubados a 45 y 55°C se ha observado el desarrollo de colonias esféricas, convexas, brillosas, carentes de los mechones de hebras a su alrededor (Figura 14). La estructura colonial estelar tiene semejanza con la colonia del género Metallogenium (Margulis et al., en preparación), la cual es considerada contraparte contemporánea de Eoastrion, un microfósil de dos mil millones de años de antigüedad (Awramik y Barghoorn, 1977). La capacidad de crecer en medios que contienen manganeso ha sido determinada por Margulis en la Universidad de Boston, observándose también en dichos medios, las estructuras coloniales que se parecen a Metallogenium (Margulis et al., en preparación).

La cepa 36 B-M crecida en AMC-Agar durante 24 horas a 30°C corresponde a bacilos Gram positivos, capaces de agruparse en cadenas, formadores de capsula y capaces de moverse. Se ha detectado en cultivos envejecidos, por medio de la técnica de Schaeffer-Fulton modificada, la presencia de endosporas y esporas libres; las preparaciones para microscopio de contraste de fases corroboraron la existencia de endosporas al observarse en el interior de los bacilos estructuras altamente refringentes y también esporas libres; la forma de estas estructuras es elíptica o cilíndrica, cuya posición va de central a subterminal, deformándose ligeramente el esporangio en algunos casos, en este tipo de microscopio se ha podido apreciar la capacidad que tienen estas bacterias para desplazarse por sí mismas.

El crecimiento colonial extendido que presentan estas bacterias bajo



Figura 13. Morfología colonial de la cepa 36 B-M crecida en Agar-NaCl 1.0 M durante 24 horas a 45° C (aumento 3 X )



Figura 14. Morfología colonial de la cepa 36 B-M crecida en Agar-NaCl 1.5 M durante 24 horas a 55° C (aumento 3 X )



condiciones anteriormente descritas y la presencia de una cápsula toman importancia adaptativa cuando nos referimos a la morfogénesis de los organos sedimentos: un crecimiento extendido trae como consecuencia el desarrollo de un sustrato, característica importante en el proceso de colonización y de sucesión de dichos ecosistemas microbianos; esta característica y la ca pacidad que tienen estos microorganismos de resistir la desecación, así co mo su facultad de adherirse a las superficies aunada a su capacidad de atra par minerales, son propiedades en las que las cubiertas celulares juegan un papel importante.

Las observaciones al microscopio de contraste de fases, de bacterias crecidas en Agar-NaCl 1.0 y 1.5 M incubadas a 45°C durante 24 horas muestran la existencia de bacilos delgados en cadena de aspecto filamentosos, bacilos cortos o cocobacilos y bacilos esporulados (Figura 15).

Los medios con la misma molaridad de NaCl, fueron incubados a 55°C duran te 24 horas, las bacterias ahí crecidas mostraron la presencia de bacilos cor tos o cocobacilos, bacilos sueltos y bacilos con esporas (Figura 16).

La estructura colonial de la cepa 36 B-M de aspecto estelar, semejante a la de Metallogenium, aunada a la morfología celular antes descrita, permi te sugerir la existencia de un ciclo de vida complejo distinto al de las bacterias convencionales, en las cuales la división celular está representa da por la fisión binaria.

Especulativamente podemos suponer que la división celular de la cepa

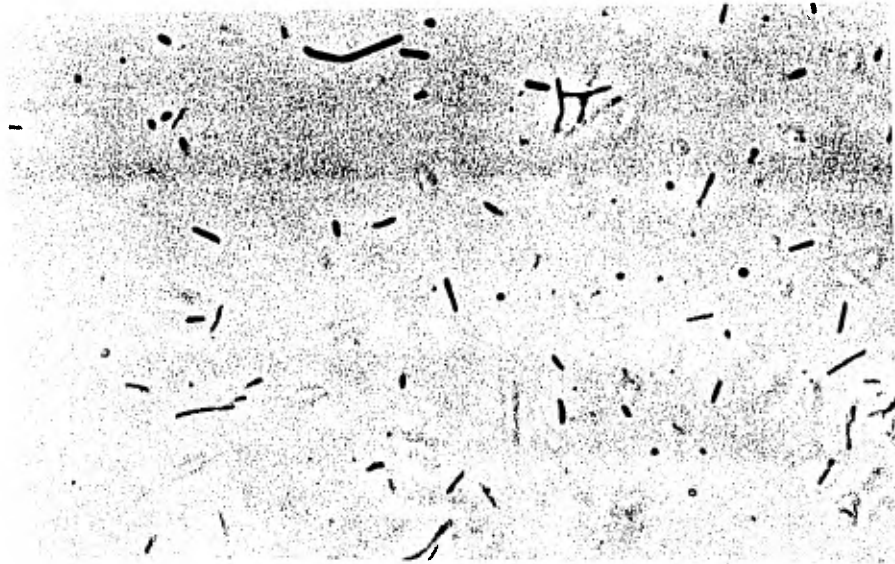


Figura 15. Fotomicrografía obtenida en contraste de fases de la cepa 36 B-M, corresponde a bacilos sueltos o agrupados en cadena (aumento 100 X )



Figura 16. Fotomicrografía obtenida en contraste de fases de la cepa 36 B-M, muestra las endosporas con posición central que no definen el esporangio (aumento 100 X ).

36 B-M es semejante a la de algunas bacterias formadoras de apéndices y/o yemas descritas en la IV parte del Manual Bergey (octava edición), en cuyo ciclo de vida se han observado formas filamentosas y formas cocoidales. Como se ha mencionado anteriormente, otra característica que comparte con Metallogenium es la capacidad que tiene la cepa 36 B-M de oxidar el manganeso. Es claro que "Metallogenium" es un fenómeno de crecimiento colonial estelado y no un taxón de bacterias (Margulis et al., en preparación), es decir, es una característica que puede estar representada en diversos grupos de bacterias, cianobacterias y algas que no necesariamente presentan relaciones de parentesco.

Se ha sugerido que la función del hábito de gemación en estos casos, es proveer a la bacteria de un mecanismo para escapar de los depósitos de manganeso en que puede quedar atrapada; el crecimiento de los filamentos delgados a través de estos depósitos hace posible la formación de enjambres celulares que puede tener lugar en el medio acuoso (Brock, 1979).

Las secciones ultrafinas para el microscopio electrónico de la cepa 36 B-M crecida a 30°C durante 24 horas en AMC-caldo, complementan la caracterización hecha con las técnicas para el microscopio fotónico. Las micrografías de las secciones longitudinales y transversales de la cepa problema muestran que se trata de bacilos agrupados en cadena con el aspecto de un filamento (Figura 17), la organización de la única y muy gruesa capa de peptidoglucano de su pared celular, corresponde a la de bacterias Gram posi-



Figura 17. Micrografía electrónica de una sección longitudinal que muestra el agrupamiento en cadena de los bacilos de la cepa 36 B-M. P (pared celular), C (citoplasma) y las flechas indican la localización de los septos (30,000 X )

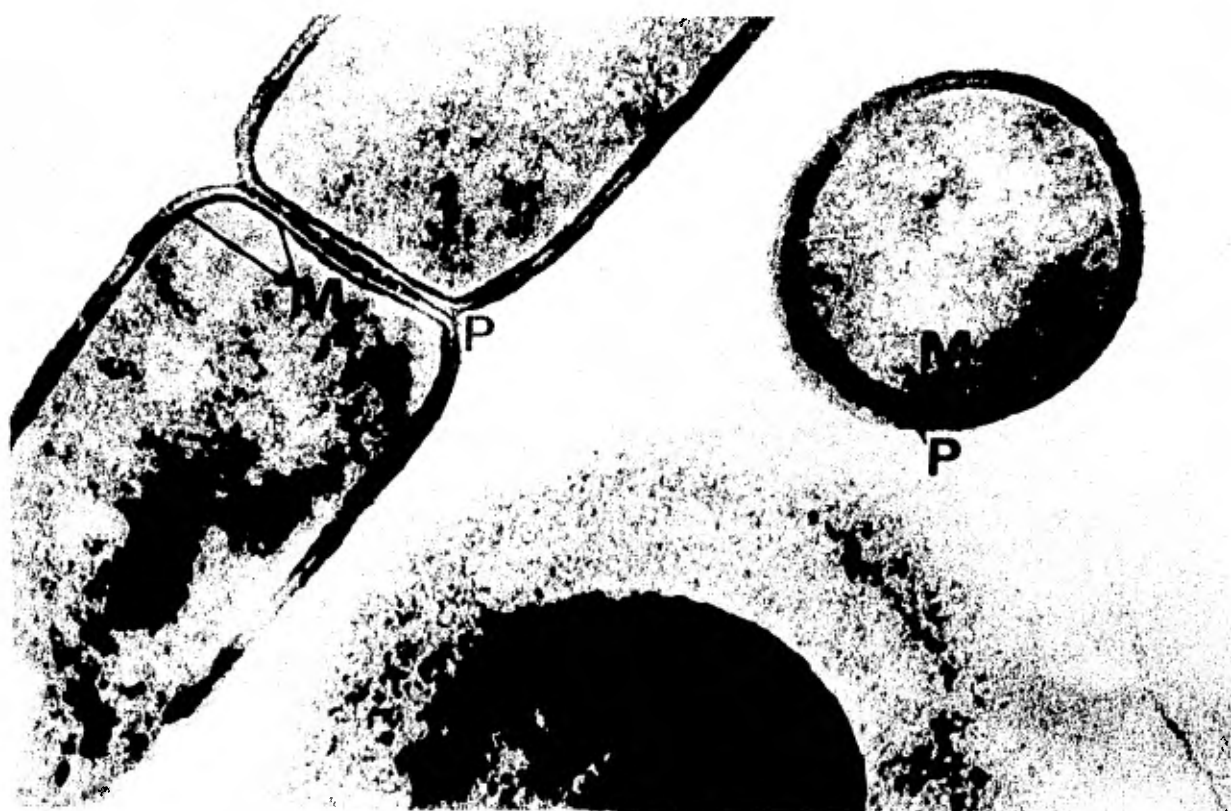


Figura 18. Micrografía electrónica de una sección fina de células vegetativas dispuestas en forma longitudinal y transversal. M (membrana citoplásmica), P (pared celular) (90,000 X )

tivas (Figura 18), bajo estas condiciones las bacterias únicamente están representadas por células vegetativas que exhiben un sistema de bicapa de la membrana y el arreglo general de su citoplasma.

La misma cepa, 36 B-M, como se ha indicado en la metodología, fue sometida a condiciones que favorecen la formación de endosporas, es decir, fue crecida en medios que contienen altas concentraciones de NaCl incubados a altas temperaturas o en medios que contienen bajas concentraciones de NaCl, incubados durante cinco días a 30°C. En este caso algunos de los especímenes fueron marcados con rojo de rutenio, lo que permitió distinguir la presencia de envolturas celulares (Figura 19).

Las secciones ultrafinas de bacterias bajo las últimas condiciones descritas, exhiben la posible secuencia de formación de endosporas, en donde fue observada la presencia de mesosomas de tipo vesicular asociados con la formación del septo transversal de la preespora (Figura 19). Una vez terminada la formación de la endospora se pudo apreciar su forma elíptica o cilíndrica, su posición va de central a subterminal sin deformar el esporangio (Figura 20). Una sección ultrafina de bacteria esporulada, nos muestra en uno de sus extremos una estructura que podría interpretarse como una yema en la que se aprecia un sistema de doble membrana y la organización interna de su citoplasma (Figura 21).

Por sí sola, la morfología de los microbios limita, más aún imposibilita la identificación de la mayoría de estos organismos. A partir de estudios sobre plantas y animales se ha podido rastrear la evolución de caracte

Figura 19. Micrograffias electrónicas que muestran la ultraestructura de la copa *T. B-M* tratada con el marcador R,R. (rojo de rutenio). En forma secuencial se aprecia la formación de endospora.

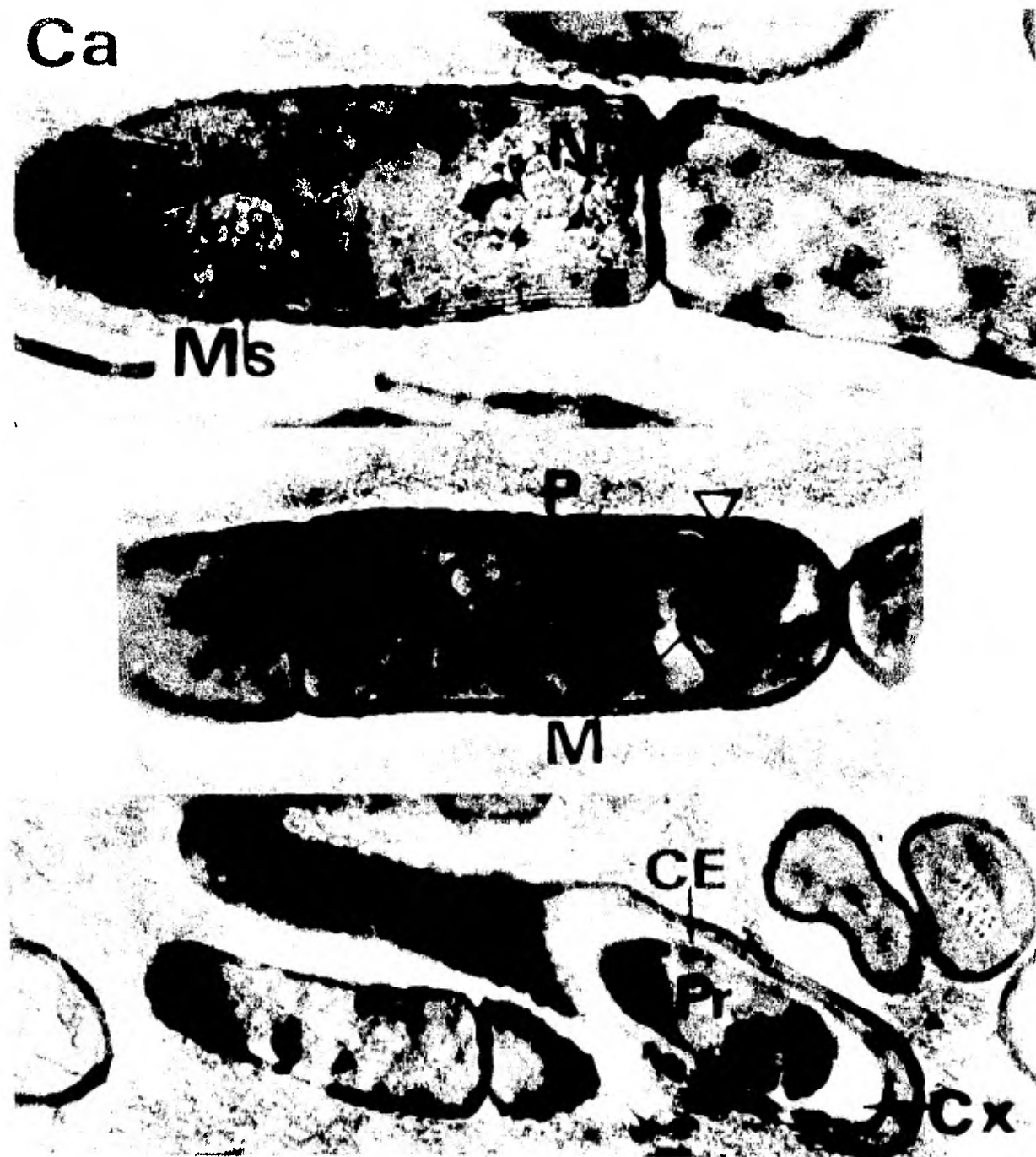


Figura 19. (continuación)

Superior.

Bacilos que muestran una cápsula (Ca), mesosomas de tipo vesicular (Ms) y la región nuclear ( N ) (80,000 X ).

Central.

Formación del septo de la preespora (flecha), material genético ( N ), citoplasma ( C ), membrana citoplásmica ( M ), pared celular ( P ) (80,000 X ).

Inferior.

Endospora de posición central, se distinguen, de adentro hacia afuera: protoplasto de la endospora (Pr), cortex (Cx), cubiertas de la endospora (CE) (80,000 X ).



Figura 20. Etapa final de la formación de la endospora. Protoplasto de la endospora (Pr), cortex (Cx) y cubiertas de la endospora (CE) (80,000 X ). En el inserto se aprecia un corte transversal de la endospora ya formada, mostrando las estructuras arriba mencionadas (130,000 X )





Figura 21. Micrografía electrónica de una sección longitudinal de la cepa 36 B-M, en la que se pueden apreciar las regiones nucleares ( N ) tanto de la endospora como del esporangio y las cubiertas de la endospora (CE) (100,000 X )

rísticas codificadas por un número de genes. Algunas características bacterianas también están codificadas por multigenes, como las endosporas. Las características multigenéticas no son equivalentes a los rasgos metabólicos usados en la práctica para identificar especies bacterianas. Las vías metabólicas deben ser conocidas en detalle antes de que se determine si son codificadas de la manera antes mencionada. Es decir, dos grupos de microbios pueden producir un metabolito final idéntico y así compartir el mismo rasgo bioquímico. Sin embargo las bases genéticas de las vías metabólicas pueden tener o no diferencias en la secuencia de nucleótidos del ADN. Por ejemplo, tanto Zymomonas como Escherichia oxidan la glucosa, liberando dióxido de carbono y agua. Pero los dos géneros difieren en todas las enzimas del catabolismo de la glucosa, así la fermentación de la glucosa no puede ser codificada por un conjunto único de genes, lo que muestra la existencia de convergencias metabólicas, de tal manera que las propiedades bioquímicas determinadas deben manejarse con cautela, para su complementación será necesaria la identificación de enzimas y vías metabólicas completas, con la ayuda de técnicas como el marcaje con radioisótopos, electroforesis y cromatografía (Margulis, 1981).

De los datos obtenidos en el perfil bioquímico y fisiológico se observa que la cepa 36 B-M realiza algunos procesos metabólicos en condiciones anoxigénicas, como son: la producción de ácido a partir de la D-glucosa en el medio O-F, el crecimiento en agar anaeróbico, tioglicolato de sodio, la reducción de nitratos a nitritos y la producción de acetofina por vía

fermentativa, considerándose a las bacterias con estas características como modelos vivos de estilos de vida prefanerozoicos (Tabla 6 y 7).

Otras propiedades bioquímicas reflejan las condiciones atmosféricas de nuestro planeta en la actualidad, como son la presencia de catalasa, enzima responsable del desdoblamiento del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua; la producción de condiciones alcalinas a partir del citrato vía ciclo de Krebs, así como la fosforilación por transporte de electrones de diferentes sustratos relacionados con carbohidratos y aminoácidos (Tabla 6).

Por otro lado, la cepa problema, crece en altas concentraciones de cloruro de sodio, 2.0 M, así como en cloruro de potasio, lo que conduce a pensar en la naturaleza halofílica facultativa de estas bacterias, es decir, crecen en altas concentraciones de cloruro de sodio, sin requerir de esta sal para su crecimiento.

Los tratamientos con altas temperaturas exhibieron el carácter mesófilo de la cepa 36 B-M, las propiedades fisiológicas antes mencionadas junto con la habilidad de oxidar el manganeso, se establecieron con el fin de simular las condiciones medio ambientales observadas en los ecosistemas microbianos laminados (Tabla 7). Con fines puramente taxonómicos se emplearon otras listas de parámetros bioquímicos y fisiológicos (Tabla 6 y 7).

La filogenia podría ser reconstruida sin hacer especulaciones demasiado abusivas, si la secuencia y el número total de pares de nucleótidos del ADN fuera conocida en muchas bacterias diferentes. Desafortunadamente esta idea

está más allá de la capacidad de cualquier método actual (Margulis, 1981).

Los resultados de la Tabla 8 nos muestran que posiblemente la cepa 36 B-M corresponde a la especie Bacillus licheniformis, descrita en la octava edición del Manual Bergey. Propiedades morfológicas y fisiológicas particulares de la cepa 36 B-M, como son la estructura distintiva de su morfología colonial de aspecto estelar, que posiblemente resulta de un ciclo de vida en el cual las bacterias no responden solamente al patrón convencional de división celular de los bacilos, es decir, en un solo plano; la capacidad de oxidar el manganeso y la facultad de crecer en altas concentraciones de cloruro de sodio 2.0 M, permiten postular que posiblemente se trata de una nueva cepa de B. licheniformis, la cual está adaptada a los cambios medio ambientales que sufren estos tapetes microbianos.

El estudio realizado hasta el momento es un avance inicial que pretende entender la biología de las bacterias formadoras de esporas en estos ecosistemas microbianos.

TABLA 6. PERFIL BIOQUIMICO

	36 B-M	<u>B. subtilis</u> e 6051 ATCC
<b>Producción de ácido de:</b>		
D-glucosa M-1	+	+
D-manitol M-1	+	+
D-arabinosa M-1	-	-
L-arabinosa M-1	+	+
D-xilosa M-1	+	+
D-glucosa O-F aeróbico	+	+
D-glucosa O-F anaeróbico	+	+
<b>Producción de gas de:</b>		
D-glucosa M-2	+	-
D-manitol M-2	+	-
<b>Producción de:</b>		
Acetofna de D-glucosa M-3	+	+
Reducción de $\text{NO}_3^-$ a $\text{NO}_2^-$	+	+
Hidrólisis del almidón	+	+
Hidrólisis de la caseína	+	+
Hidrólisis de la gelatina	+	+
Presencia de catalasa	+	+
Producción de $\text{H}_2\text{S}$	-	-
Liberación de indol	-	-
Desaminación de la D-L fenilalanina	-	-
<b>Descarboxilación de la:</b>		
Arginina	+	-
Lisina	+	?
Utilización del citrato de Simons	+	+
? = sin determinar		

TABLA 7. FISILOGIA

	36 B-M	<u>B. subtilis</u> e 6051 ATCC
Crecimientos en:		
Sistemas anaeróbicos		
BBL CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> 60465	+	-
Tioglicolato Difco 0236-01	1	1
Medio O-F anaeróbico	+	+
Agar-NaCl 0.3 M	+	+
0.6 M	+	+
1.0 M	+	+
1.5 M	+	-
2.0 M	+	-
Caldo nitruro de sodio (azida) 0.025%	-	-
Sabouraud Dextrosa Agar	+	+
Movilidad SIM	+	+
Oxidación de Mn <sup>++</sup> Medio K	+	?
Temperatura máxima de crecimiento ( °C )	50-55	45-55
Crecimiento a 3°C	-	-

1= crecimiento a lo largo de la alícuota, ?= sin determinar

TABLA B . DIAGNOSIS DE LAS CARACTERISTICAS COMPARATIVAS DE LA CEPA 36 B-M CON OTRAS ESPECIES DEL

GENERO BACILLUS\*

CARACTERISTICAS	36 B-M	<u>B.licheniformis</u>	<u>B.subtilis</u> 6051 ATCC
Forma de la espora	e	e	e
Deformación del esporangio	-	-	-
Posición de la espora	c	c	c
Acido de D-glucosa M-1	+	+	+
Gas de D-glucosa M-2	+	+	-
Acetofna de D-glucosa M-3	+	+	+
Reducción de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> a NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	+	+
Hidrólisis de almidón	+	+	+
Hidrólisis de la gelatina	+	+	+
Hidrólisis de la caseína	+	+	+
Crecimiento en Agar-NaCl 7%	+	+	+
Crecimiento en Agar Anaeróbico	+	+	-
Temperatura máxima de crecimiento ( °C )	50-55	50-55	45-55

e= elíptica o cilíndrica    c= domina la posición central    + = ligeramente positivas

\*Esta tabla fue elaborada a partir de los datos reportados en el Manual Bergey (octava edición)

## V.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Existe un alto grado de inseguridad en la clasificación de los organismos reportados como B. subtilis, B. licheniformis, B. mesentericus y B. pumilus. En la sexta edición del Manual Bergey se sugiere que B. mesentericus, la cepa europea, corresponde a un estado de crecimiento de B. subtilis y la cepa americana según la misma edición, es idéntica a B. pumilus. B. licheniformis aparece como una especie separada en la séptima edición, mientras que había sido combinada con B. subtilis en la sexta edición mencionándose únicamente en el apéndice.

Entre las cepas mejor conocidas como B. subtilis, la cepa de Marburg conserva el nombre, pero la de Ford es ahora llamada B. licheniformis (House-right, 1962).

Una cepa de bacterias formadoras de endosporas y capaces de oxidar el manganeso, fue aislada y caracterizada parcialmente. Esta bacteria parece ser una nueva cepa de B. licheniformis, al menos en el sentido de que no comparte todas las características enlistadas en el Manual Bergey para esta especie. Esta cepa, la 36 B-M, es marcadamente tolerante a los cambios del medio ambiente que afectan regularmente a los tapetes de la Laguna Figueroa: cambios extremos en la temperatura que oscilan entre los 10 y 55°C, desecación asociada con el aumento en la concentración de sales alternando con inundaciones, la existencia de condiciones anaeróbicas, los nutrientes varían de altas cantidades, cuando los restos de animales y plantas enriquecen al tapete, a bajas cantidades durante los tiempos de inundación. La cepa descrita en este trabajo, 36 B-M, puede crecer bajo todas estas condiciones.



El trabajo fue enfocado particularmente sobre aquellas bacterias que fueron aisladas frecuentemente, miembros regulares en la comunidad, los cuales por la virtud de depositar minerales junto con la existencia de morfologías y estructuras distintivas, son de alguna manera importantes en el proceso de preservación durante los eventos post-mortem.

La finalidad de este estudio es completar la caracterización de las comunidades del tapete microbiano, precursores de estromatolitos.

Se admite que sólo una fracción muy pequeña de características y estructuras distintivas ha sido estudiada con detalle, lo que conduce a sugerir el siguiente trabajo para el futuro:

- a) Completar la caracterización bioquímica y fisiológica, que involucra la precipitación de minerales como el manganeso y el fierro.
- b) Determinar el ciclo de vida de la cepa 36 B-M, lo que implica a su vez el entendimiento de la formación de la colonia.
- c) Determinar los cocientes G-C, criterio importante en la taxonomía bacteriana.
- d) Complementar el estudio de la ultraestructura de la cepa problema.
- e) Efectuar estudios de correlaciones inmunológicas buscando semejanzas y diferencias.
- f) Estudiar por electroforesis las diferentes enzimas presentes, para buscar otros parámetros de identidad o diferenciación.

## REFERENCIAS

- ADINARAYANA-REDDY, C., BRYANT, M. P. y WOLIN, M. J. 1972. "Characteristics of S Organisms Isolated from Methanobacillus omelianskii". J. Bacteriol. **109**, 539-545.
- AWRAMIK, S. M. 1971. "Precambrian Columnar Stromatolite Diversity: Reflection of Metazoan Appearance". Science **174**, 825-827.
- AWRAMIK, S. M., GEBELIN, C. D. y CLOUD, P. 1978. "Biogeologic Relationships of Ancient Stromatolites and Modern Analogues". en W.E. Krumbein (ed.), Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology. Vol. I. Ann. Arbor Science, Ann Arbor, Michigan. pp. 165-178.
- BALCH, W. E., MAGRUM, L. J., FOX, G. E., WOLFE, R. S. y WOESE, C. R. 1977. "An Ancient Divergence Among the Bacteria". J. Mol. Evol. **9**, 305-311.
- BARKER, H. A., RUBEN, S. y BECK, J. V. 1940. "Radiative Carbon as an Indicator of Carbon Dioxide Reduction. IV. The Synthesis of Acetic Acid from Carbon Dioxide by Clostridium acidu-urici". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **26**, 477-482.
- BARKER, H. A. y KAMEN, M.D. 1945. "Carbon Dioxide Utilization in Synthesis of Acetic Acid by Clostridium thermoaceticum". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **31**, 219-225.
- BRADSHAW, L. J. 1979. Laboratory Microbiology. W. B. Saunders Company. Philadelphia.
- BROCK, T. D. 1979. Biology of Microorganisms. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- BRODA, E. 1975. Evolution of the Bioenergetic Processes. Pergamon Press. Oxford.
- BRYANT, M. P., WOLIN, E. A., WOLIN, M. J. y WOLFE, R. S. 1967. "Methanobacillus omelianskii, a Symbiotic Association of Two Species of Bacteria". Arch. Mikrobiol. **59**, 20-31.
- BUCHANAN, R. E. y GIBBONS, N. E. (eds.) 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore. Eighth edition.
- BUTTON, A. 1973. "Algal Stromatolites of the Early Proterozoic Wolberg Group, Transvaal Sequence". J. Sedim. Petr. **43**, 160-167.
- CLARKE, P. H. y ELSDEN, S.R. 1980. "The Earliest Catabolic Pathways". J. Mol. Evol. **15**, 333-338.
- DARWIN, C. 1859. On the Origins of Species. A Facsimile of the First Edition. Harvard University Press, Cambridge, 1964.

- DEAMER, D. W. y ORO, J. 1980. "Role of Lipids in Prebiotic Structures". Biosystems 12, 167-175.
- DECKER, K., JUNGERMANN, K. y THAYER, R. 1970. "Energy Production in Anaerobic Organisms". Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 9, 138-158.
- FARLEY, J. 1977. The Spontaneous Generation Controversy. From Descartes to Oparin. The Johns Hopkins University Press. Baltimore.
- FOLSOME, C. E. 1976. "Synthetic Organic Microstructures and the Origins of Cellular Life". Naturwissenschaften 63, 303-306.
- FOX, S. W. 1976. "The Evolutionary Significance of Phase-Separated Microsystems". Origins of Life 7, 49-68.
- FOX, S.W. y DOSE, K. 1977. Molecular Evolution and the Origin of Life. Marcel Dekker, New York.
- FOX, G. E., MAGRUM, L.J., BALCH, W.E., WOLFE, R.S. and WOESE, C.R. 1977. "Classification of Methanogenic Bacteria by 16S Ribosomal RNA Characterization". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4537-4541.
- GEBELIN, C.D. y HOFFMAN, P. 1973. "Algal Origin of Dolomite Laminations in Stromatolitic Limestone". J. Sedim. Petr. 43, 331.
- GERHARDT, P., MURRAY, R. G. y COSTILOW, R.N. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington.
- GIONO, S. y Col. 1980. Manual de Laboratorio de Bacteriología Médica. E.N.C.B., I.P.N. México.
- GIOVANNONI, S.J. 1979. A Strain of Red Beneckeia from Cyanobacterial Mats of Laguna Mormona, Baja California. Master Thesis. Boston University Graduate School.
- GOLUBIC, S. 1976. "Organisms That Build Stromatolites". En M.R. Walter (ed.), Stromatolites. Elsevier, Amsterdam. 113-126.
- GRAHAM, L.R. 1976. Ciencia y Filosofía en la Unión Soviética. Siglo Veintiuno de España Editores, Madrid.
- HALDANE, J.B.S. 1929. "The Origin of Life". The Rationalist Annual 148, 3-10.
- HALL, J.B. 1971. "Evolution of the Prokaryotes". J. Theor. Biol. 30, 429-454.

HANAWALT, P.C., PETTIJOHN, D.E., PAULING, C., BRUNK, C., SMITH, D., KANNER, L. y COUCH, J. 1968. "Repair, Replication of DNA *in vivo*". Cold Spring Harbor Symp. On Quantitative Biology XXXIII. 187-194.

HARGRAVES, W.R. y DEANER, D.W. 1978. "Origin and Early Evolution of Bi-layer Membranes". En D.W. Deamer (ed.), Light Transducing Membranes. Structure, Function and Evolution. Academic Press, New York. 23-59

HORODYSKI, R.J. 1977. "Lyngbya Mats at Laguna Mormona, Baja California, México. Comparison with Proterozoic Stromatolites". J. Sedim. Petr. 47, 1305-1320.

HORODYSKI, R.J. y VON DER HAAR, S.P. 1975. "Recent Calcareous Stromatolites from Laguna Mormona (Baja California) México". J. Sedim. Petr. 45, 894-906.

HORODYSKI, R.J., BLOESER, B. y VON DER HAAR, S.P. 1977. "Laminated Algal Mats from a Coastal Lagoon, Laguna Mormona, Baja California, México". J. Sedim. Petr. 47, 680-696.

HOROWITZ, N. 1945. "On the Evolution of Biochemical Synthesis". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 31, 153-157.

HOUSERIGHT, R.D. 1962. "The Biosynthesis of Homopolymeric Peptides". En J.C. Gunsalus y R.Y. Stanier (eds.), The Bacteria. Academic Press, New York. Vol. III 390-391.

HOWARD-FLANDERS, P., RUPP, W.D., WILKINS, B.M. y COLE, R.S. 1968. "DNA Replication and Recombination After UV Irradiation". Cold Spring Harbor Symp. On Quantitative Biology XXXIII, 195-205.

KNOLL, A. y BARGHOORN, E. 1977. "Archean Microfossiles Showing Cell Division from the Swaziland System of South Africa". Science 198, 396-398.

KREBS, H.A. y KORNBERG, H.L. 1957. "A Survey of the Energy Transformations in Living Matter". Ergeb. Physiol. Biol. Chem. and Exp. Pharmacol. 49, 212-298.

KRUMBEIN, W.E. 1978. "Algal Mats and Their Litification". En W.E. Krumbein (ed.), Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology. Vol. I Ann Arbor, Science, Ann Arbor, Michigan 209-225.

KRUMBEIN, W.E., COHEN, Y. y SHILO, M. 1977. "Solar Lake (Sinai). 4. Stromatolitic Cyanobacterial Mats". Limnol. Oceanogr. 22, 635-656.

KRUMBEIN, W.E., STAL, L., STOLZ, J. y TEBO, B. 1980. "Photosynthetic Organisms: Isolation, Cultivation and Nitrogen Fixation". Planetary Biology and Microbial Ecology. NASA-Ames Research Center and Santa Clara University. July-August.

KUZNETZOV, S.I. 1970. The Microflora of Lakes and Its Geochemical Activity. University of Texas Press, Austin.

LAMANA, C., MALLATE, M.F. y ZIMMERMAN, L. 1973. Basic Bacteriology: Its Biological Background. Williams & Wilkins Co. Baltimore.

LAMARCK, J.B. 1809. Filosofía Zoológica. Mateu. Barcelona. 1975.

LEWINGER, A. 1975. Bioenergética. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México.

LEMON, R.M. 1970. "Chemical Evolution". Chem. Rev. 70, 95-109.

LOPEZ CORTES, A. y LAZCANO ARAUJO, A. 1980. "Estructura de las Comunidades Microbianas Heterótrofas Primigenias". Rev. Lat-Amer. Microbiol. 22, 5. Resúmenes de la Séptima Reunión de Provincia. Asociación Mexicana de Microbiología, 20-24 de enero, Oaxaca, Oax. Méx.

MAC FADDIN, J.F. 1976. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. The Williams and Wilkins, Co. Baltimore.

MARGULIS, L. 1970. Origin of Eukaryotic Cells. Yale University Press, New Haven, Conn.

MARGULIS, L. 1972. "Early Cellular Evolution". En C. Ponnamperuma (ed.), Exobiology. Amsterdam, North Holland. 342-368.

MARGULIS, L., BARGHOORN, E., ASHENDORF, D., BANERJEE, S., CHASE, D., FRANCIS, S., GIOVANNONI y STOLZ, J. 1980. "The Microbial Community in the Layered Sediments at Laguna Figueroa, Baja California, México: Does It Have Precambrian Analogues?". Precambrian Research 11, 93-123.

MARGULIS, L., CHAPNICK, S., GROSOVSKY, B. y LAZCANO-ARAUJO, A. 1980. a. "Microbial Mat Bacteria: Heterotrophs Which Form Distinctive Structures or Manganese Precipitates". Planetary Biology and Microbial Ecology. NASA Ames Research Center and Santa Clara University. July-August.

MARGULIS, L., GROSOVSKY, B.D., STOLZ, J.F., GONG-COLLINS, E.J., LENK, S. y LOPEZ-CORTES, A. "Distinctive Microbial Structures and the Prephanerozoic Fossil Record". (En preparación para la revista Precambrian Research).

MAYNARD-SMITH, J. 1969. "The Status of neo-Darwinism". En C.H. Waddington (ed.), Towards a Theoretical Biology, 2: Sketches. Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 82-89.

MILLER, S.L. y ORGEL, L.E. 1974. The Origins of Life on the Earth. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

- MONTY, C.L.V. 1965. "Recent Algal Stromatolites in the Windward Lagoon, Andros Island, Bahamas". Annals Soc. Geol. Belgique 88, 269.
- MONTY, C.L.V. 1967. "Distribution and Structure of Recent Stromatolitic Algal Mats, Eastern Andros Island, Bahamas". Annals Soc. Geol. Belgique 90, 55.
- MOORBATH, S. 1977. "Las Rocas Más Antiguas y la Acreción de los Continentes". Investigación y Ciencia No. 8. Barcelona.
- OLEA, F.A.. 1981. Radiólisis y del Acido Aconítico en Medio Acuoso Básico y su Posible Significado en la Evolución Química. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias. UNAM.
- OLSON, J.M. 1970. "The Evolution fo Photosynthesis". Science 168, 438-446.
- OPARIN, A.I. 1924. The Origin of Life. Traducido del ruso y reimpresso en J.D. Bernal, 1967. Origin of Life. Cleveland: World, 199-241.
- OPARIN, A.I. 1938. Origin of Life. Dover. New York. 1968.
- OPARIN, A.I. 1957. The Origin of Life on the Earth. Oliver and Boyd. Edinburgh.
- OPARIN, A.I. 1965. "The Origin of Life and the Origin of the Enzymes". Adv. Enzimology 27, 347-380.
- OPARIN, A.I. 1968. Genesis and Evolutionary Development of Life. Academic Press, New York.
- OPARIN, A.I. 1972. "The Apperance of Life in the Universe". En C. Ponnampereuma (ed.), Exobiology. North Holland Publishing Co., Amsterdam. pp.1-15.
- OPARIN, A.I. 1971. "Possible Pathways of Prebiotic Systems". En A. Pérez Miravete y D. Peláez (eds.), Recent Advances in Microbiology. X Congreso Internacional de Microbiología, México, 1970.
- OPARIN, A.I. 1974. "A Hypotetic Scheme for Evolution of Protobionts". Origins of Life 5, 223-226.
- OPARIN, A.I. 1978. "The Nature and Origin of Life". En C. Ponnampereuma (ed.), Comparative Planetology. Academic Press, New York.
- OPARIN, A.I. 1979. Teoría Evolutiva del Origen de la Vida. Plaza & Janes, Barcelona, Capítulo IX. Conclusión.

- OPARIN, A.I. y GLADILIN, K.L. 1980. "Evolution of Self-Assembly of Proto-bionts". Biosystems 12, 133-145.
- ORO, J. 1972. "Extraterrestrial Organic Analysis". Space Life Sci. 3, 507-550.
- ORO, J., SHERWOOD, E., EICBERG, J. y EPPS, D. 1978. "Formation of Phospholipids Under Primitive Earth Conditions and the Role of Membranes in Prebiological Evolution". En D.W. Deamer (ed.), Light Transducing Membranes. Structure, Function and Evolution. Academic Press. New York.
- POSTGATE, J. 1970. "Biological Nitrogen Fixation". Nature 226, 25-27.
- SCHWARTZ, R.M. y DAYHOFF, M.O. 1978. "Origins of Prokaryotes, Eucaryotes, Mitochondria and Chloroplasts". Science 199, 395-403.
- SCLOPF, J.W. 1975. "Precambrian Paleobiology: Problemas and Perspectives". Ann. Rev. Earth Planet. Sci. 3, 213-249.
- SOKATCH, J.R. 1969. Bacterial Physiology and Metabolism. Academic Press, New York.
- TORNABENE, T.G., WOLFE, R.S., BALCH, W.E., HOLZAR, G., FOX, G.E. y ORO, J. 1978. "Phytanyl-Glycerol Ethers and Squalenes in the Archaeobacterium Methanobacterium thermoautotrophicum. J. Mol. Evol. 11, 259-266.
- WALKER, J.C.G. 1976. "Implications for Atmospheric Evolution of the Inhomogeneous Accretion Model of the Origin of the Earth". En B.I. Windley (ed.), The Early History of the Earth. John Willey and Sons, Chichister. pp. 537-546.
- WALKER, J.C.G. 1977. Evolution of the Atmosphere. Macmillan Publishing Co., Inc. New York.
- WALKER, J.C.G. 1979. "The Influence of Life on the Evolution of the Atmosphere". Presentado en la XXII Reunión Plenaria de COSPAR, Bangalore, India.
- WALKER, J.C.G. 1980. "Atmospheric Constraints of the Evolution of Metabolism". Origins of Life 10, 93-104.
- WALTER, M.N. 1976. (ed.) Stromatolites, Developments in Sedimentology. Elsevier. Amsterdam.
- WALTER, M.N., GOLUBIC, S. y PREISS, W.V. 1973. "Recent Stromatolites from Hydromagnesite and Aragonite Depositing Lakes Near the Coorong Lagoon, South Australia". J. Sedim. Petr. 43, 1021-1030.

WEBER, R., CEBALLOS, S., LOPEZ, A., OLEA, A., SINGER, S. 1979. "Los Estromatolitos del Precámbrico Tardío de los Alrededores de Caborca, Estado de Sonora, I; Reconstrucción de Jacutophyton Shapovalova e Interpretación Paleocológica Preliminar". Univ. Nat. Autón. México, Inst. Geología, Revista 3, 9-23.

WHITE, H.B. 1976. "Coenzymes as Fossils of an Earlier Metabolic State". J. Mol. Evol. 7, 101-104.

WOESE, C.R., SOGIN, M.L., STAHAL, D.A., LEWIS, B.J. y BONEN, L. 1976. J. Mol. Evol. 7, 197.

WOOD, W.A. 1961. "Fermentation of Carbohydrates and Related Compounds". En J.C. Gunsalus y R.Y. Stanier (eds.), The Bacteria. Academic Press, New York. Vol. 11. pp.151.

ZEIKUS, J.G. 1977. "The Biology of Methanogenic Bacteria". Bacteriol. Rev. 41, 514-541.



## A P E N D I C E

### I. - Medios

#### A. - Agua de Mar Artificial (AMA) 2X

Scrips Oceanography Institute, University of California.

MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	395.2 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	46.4 g
NaCl	561.6 g
KCl	24.0 g

Ajustar a un volumen de 16 litros de agua destilada.

Dejar que la mezcla se combine enteramente al menos media hora antes de usarse.

Diluir el AMA 2X 1:1 con agua destilada para obtener la misma concentración de la mayoría de las sales presentes en el agua de mar (AMA X).

#### B. - Agua de Mar Complementada (AMC)

Scrips Oceanography Institute, University of California

Bacto-peptona o Bacto-triptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glicerol	3.0 ml
AMA X	750.0 ml
Agua deionizada	250.0 ml
Agar	12.0 g

**C.- Medio 1 (M-1)**

Manual Bergey, octava edición.

$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	1.0	g
KCl	0.2	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.2	g
Extracto de levadura	0.2	g
Agar	15.0	g
Púrpura de bromocresol	0.008	g
Carbohidrato	5.0	g
Agua destilada	1000.0	ml

**D.- Medio 2 (M-2)      pH 7.0**

Manual Bergey, octava edición.

Bacto-peptona	5.0	g
Extracto de levadura	3.0	g
NaCl	5.0	g
Agar	3.0	g
Púrpura de bromocresol	0.008	g
Carbohidrato	10.0	g
Agua destilada	1000.0	ml

**E.- Medio 3 (M-3)**

Manual Bergey, octava edición.

Bacto-peptona	7.0 g
Bacto-dextrosa	5.0 g
NaCl	5.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

**F.- Medio para la desaminación de la fenilalanina**

pH 7.3

Mac Faddin (1976).

D-L Fenilalanina	2.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
NaCl	5.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
Agar	12.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

**G.- Medio K para determinar la oxidación de manganeso**

Margulis *et al.*, en preparación.

MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0.1 g
Peptona	1.0 g
Extracto de levadura	0.25 g
Bacto-agar	7.5 g
Agua de mar artificial (X)	500.0 ml

## II.- Reactivos

### A.- Solución A:

α naftol	5.0 g
alcohol etílico absoluto	100.0 ml

### Solución B:

NaOH	40.0 g
agua destilada	100.0 ml

Añadir a un cultivo M-3 de 72 horas de crecimiento 0.5 ml de solución A y 0.5 ml de solución B, el desarrollo de un color rojo en 30 minutos indica un resultado positivo.

### B.- Solución A:

α naftol amina	5.0 g
ácido acético (5N)	1000.0 ml

### Solución B;

ácido sulfanílico	8.0 g
ácido acético (5N)	1000.0 ml

Partes iguales de las soluciones A y B se añaden a el cultivo de Agar-Nitrato con crecimiento de 24 horas, un color rojo intenso se desarrolla si los nitratos están presentes.

C.- $\text{FeCl}_3$	12.0 g
HCl concentrado	2.5 ml
agua destilada	100.0 ml

Colocar de dos a tres gotas del reactivo a alícuotas que contienen D-L fenilalanina con crecimiento bacteriano de 24 horas, el desarrollo de un color verde oscuro indica una respuesta positiva.