

11261  
2ej  
10



Universidad Nacional Autónoma de México  
FACULTAD DE MEDICINA

LAS COMUNIDADES MICROBIANAS ESTRATIFICADAS  
DE BAJA CALIFORNIA, MEXICO: UN MODELO HIPO-  
TETICO PARA LOS MICROECOSISTEMAS MODERNOS Y  
DEL PRE-FANEROZOICO.



**T E S I S**

Que para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(MICROBIOLOGIA)

p r e s e n t a

**ALEJANDRO LOPEZ CORTES**

**FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

Abril de 1987



## **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 está 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.

	CONTENIDO	PAG.
	RESUMEN.	i
	ABSTRACT.	ii
Capítulo 1.	INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS DE LA TESIS.	
	1.1 REFERENCIAS.	1-8
Capítulo 2.	PROCARIONTES EN ESTROMATOLITOS POTENCIALES: UN MODELO DE SUCCESION MICROBIANA.	9-37
	2.1 RESUMEN.	
	2.2 INTRODUCCION.	
	2.3 HISTORIA DE CAMPO.	
	2.4 MATERIALES Y METODOS. COLECTA DE LAS MUESTRAS. MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO.	
	2.5 RESULTADOS Y DISCUSION. HISTORIA DE CAMPO. MICROSCOPIA.	
	2.6 REFERENCIAS.	
Capítulo 3.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE CEPAS DEL GENE <i>Rd</i> Bacillus CAPACES DE OXIDAR MANGANESO.	
	3.1 RESUMEN.	38-39
	3.2 INTRODUCCION.	
	3.3 MATERIALES Y METODOS AISLAMIENTO. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES. CICLO DE VIDA Y FORMACION DE LA COLONIA. IDENTIFICACION BIOQUIMICA Y FISIOLÓGICA. OXIDACION DE MANGANESO.	
	3.4 RESULTADOS Y DISCUSION.	
	3.5 APENDICE.	
	3.6 REFERENCIAS.	64-66
Capítulo 4.	FIJACION DE NITROGENO ASOCIADA CON COMUNIDADES MICROBIANAS ESTRATIFICADAS DE GUERRERO -- NEGRO, BAJA CALIFORNIA SUR, MEXICO.	
	4.1 INTRODUCCION.	67-70
	4.2 MATERIALES Y METODOS. ACTIVIDAD DE NITROGENASA. CROMATOGRAFIA DE GASES. ANALISIS COLORIMETRICO DEL AGUA.	
	4.3 RESULTADOS Y DISCUSION. ACTIVIDAD DE NITROGENASA. ANALISIS COLORIMETRICO DEL AGUA.	72-100
	4.4 REFERENCIAS.	101-102

Capítulo 5.

DISCUSION GENERAL.

103-110

5.1 REFERENCIAS.

110

## RESUMEN.

LAS COMUNIDADES MICROBIANAS ESTRATIFICADAS DE BAJA CALIFORNIA, MEXICO: UN MODELO HIPOTETICO PARA LOS MICROECOSISTEMAS MODERNOS Y DEL PRE-FANEROZOICO.

La cuenca hipersalina de la Laguna Figueroa, sitio "Charco del Norte", Baja California Norte, México, presentó períodos largos de inundación durante los años de 1979 y 1980. En esas condiciones la actividad fotosintética y consecuentemente el crecimiento del tapete microbiano estuvo limitado. Los estudios de microscopía de muestras obtenidas en 1982 y 1984 apoyan la idea de una sucesión secundaria de la comunidad microbiana. La aparición de novo del productor primario original y principal, la cianobacteria Microcoleus, que presenta varios tricomas envueltos por una vaina común está restringida al pantano salino. El crecimiento y degradación de los tapetes microbianos es de utilidad en la identificación e interpretación de los microfósiles del pre-Fanerozoico. También fueron aisladas cuatro cepas del género Bacillus, capaces de oxidar manganeso de los sitios "Charco del Norte" y "Pentapus", Baja California Norte. Las cepas CHN-36-80-L, CHN-36-80-B y P2-V-83-2, se compararon con el microfósil Eoastrion de la Formación de Hierro Gunflint con una edad de 2,000 millones de años que se encuentra en el escudo continental de Canadá y Harrapoonella radia del Super Grupo Pilbara en Australia a la que se le calcula una antigüedad de 3,500 millones de años. La morfología singular de las cepas antes citadas y su capacidad para precipitar manganeso, incluye a la cepa P2-V-83-3, son algunos de los aspectos que posiblemente participan en la preservabilidad de las células procariontes como microfósiles.

Por cromatografía de gases, se hizo el ensayo de reducción de acetileno en etileno con muestras de tapetes microbianos de Guerrero Negro Baja California Sur, México. Los resultados mostraron que aunque existe una tasa de fijación de nitrógeno de 1.22 a 23.30 gN/ha/año, ésta es poco confiable debido a la alta diversidad microbiana y prevalencia de microambientes anaerobios. La adición de 100 nanomoles de sulfato de amonio no inhibió la actividad de nitrogenasa posiblemente porque no todos los fijadores de nitrógeno molecular presentan los mismos sistemas de retroalimentación en presencia amoníaco.

## ABSTRACT

### STRATIFIED MICROBIAL COMMUNITIES FROM BAJA CALIFORNIA: HYPOTHETIC MODEL FOR THE MODERN AND THE PRE-PHANEROZOIC MICROECOSYSTEMS.

In the hypersaline basin of Laguna Figueroa, "North Pond" site, Baja California Norte, México; long lasting floods occurred in 1979 and 1980. Under these conditions the photosynthetic activity and consequently the growth of the microbial mat were limited. Phase contrast and SEM microscopy of samples from 1982 and 1984 suggest a secondary succession of the microbial communities. Reappearance of the original and main primary producer, a cyanobacteria with several trichomes and surrounded by a common sheath (Microcoleus) is recognized. The growth and degradation of the microbial mats can be used for the identification and interpretation of the pre-Phanerozoic microfossils. In addition, four strains of manganese-oxidizing bacteria (Bacillus) were isolated from "North Pond" and "Pentapus" sites, in Baja California Norte. The strains CHN-36-80-L, CHN-36-80-B and P2-V-83-2, are compared with the microfossil Eoastrion Gunflint Iron Formation, Canada (2,000 Ma old) and Warrawoonaella radia from Pilbara Supergroup, Australia (3,500 Ma old). The distinctive colonial morphology of these strains and their capacity to precipitate manganese (including P2-V-83-3) might explain mechanisms for the preservability of the prokaryotic cells. The acetylene reduction assay was made by gas chromatography with samples of microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. The rates of the nitrogen fixation 1.22 to 23.30 g N/ha/year, however, they are questionable, because the high microbial diversity and the prevalence of anaerobic microenvironments. The addition 100 nmole ammonium sulphate did not inhibit the nitrogenase activity, it is possible because the ammonium feedback systems from the nitrogen fixing organisms are different.

## Capítulo 1. INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS DE LA TESIS.

Los fósiles del pre-Fanerozoico abarcan edades que van de 3,800 a 570 millones de años antes del presente y pueden agruparse en tres categorías amplias: 1) estromatolitos, 2) megafósiles de algas y 3) microfósiles.

Los estromatolitos son los fósiles más sobresalientes encontrados por los geólogos de campo que trabajan en terrenos pre-Fanerozoicos, éstos y los microfósiles se han encontrados en rocas de 3,500 millones de años (Knoll y Barghoorn, 1977, Awramik, 1982, Awramik y col. 1983, Schopf, 1983).

Los estromatolitos son rocas laminadas cuyo origen está claramente relacionado con la actividad de comunidades microbianas, las cuales por su morfología, fisiología y arreglo en el espacio y tiempo, interactúan con el ambiente físico-químico para producir un patrón de laminación que es retenido en la estructura final de la roca (Krumbein, 1983).

Otros fósiles son de algas macroscópicas que alcanzan dimensiones de varios milímetros de diámetro y se han reconocido en rocas tan antiguas como de 1,300 millones de años, las que se consideran evidencias inegables de la presencia de células eucariontes. Sin embargo, las macroalgas fósiles son raras en el registro del pre-Fanerozoico (Schopf, 1977; Awramik, 1982).

Los microfósiles pueden o no localizarse asociados a las laminaciones de estromatolitos, ambos tipos comúnmente se

preservan como microestructuras que corresponden a paredes orgánicas de tamaño, forma y organización variable (Awramik, 1982).

Las microbiotas no estromatolíticas incluyen microfósiles bentónicos y planctónicos. Estos últimos han sido llamados "acritarcas" y por definición son paredes orgánicas esféricas de posición taxonomica incierta (Awramik, 1982).

En lo general los microfósiles del pre-Fanerozoico se preservan en matrices minerales de óxidos de silicio como el pedernal y las lutitas (Knoll y Barghoorn, 1977).

En la actualidad existen zonas restringidas de lagos, aún los permanentemente cubiertos por hielo del Antártico, pantanos, manantiales calientes y fríos, planicies de mareas, bahías hipersalinas y fondos oceánicos inhóspitos al desarrollo de plantas y animales, que pueden estar ocupados por comunidades o tapetes microbianos exuberantes conformados principalmente por células procariontes (Walter, 1976; Awramik y col. 1978). Según Krumbein (1983), estos sistemas microbianos laminados deben llamarse "estromatolitos potenciales". Los sistemas laminados no consolidados, relacionados claramente con la actividad de comunidades microbianas y frecuentemente llamados "estromatolitos recientes" o "estromatolitos vivos" los definen como "estromatolitos potenciales".

Existen técnicas disponibles para estudiar en el campo el crecimiento y función de los estromatolitos potenciales. Los datos obtenidos son esenciales para la interpretación del

medio ambiente, de la morfología y distribución de los mismos. Se tiene la esperanza de que este tipo de trabajos conduzcan a investigaciones ecológicas sobre los estromatólitos, ya que tales estudios proporcionarán información indispensable para la interpretación del material fósil (Brock, 1976; Stolz, 1983; Krumbein, 1983).

Las comunidades microbianas estratificadas en sedimentos laminados de la Laguna Figueroa de Baja California Norte, han sido objeto de varios estudios. En estas investigaciones se han comparado estos sedimentos laminados modernos con aquellos preservados en el registro fósil del pre-Fanerozoico.

El grupo de Horodyski estudió la zona de la Laguna Figueroa a principio de la década de 1970, y dió a conocer diversas comunidades representadas por los tapetes mamilares de Enthophysalis, formados por células cocoidales envueltas en una vaina viscosa, las borlitas de Lyngbya correspondientes a organismos fototróficos oxigénicos de aspecto filamentosos y finalmente las comunidades microbianas estratificadas o tapetes microbianos laminados de Microcoleus, que fueron interpretados entonces como auxiliares en la comprensión de depósitos del pre-Fanerozoico que contienen microfósiles preservados. Horodyski estableció la estructura de las comunidades así como los patrones de degradación y los procesos de sedimentación que tomaron parte en su formación y estudió con interés principal a las cianobacterias (Horodyski y Von Der Har 1975; Horodyski, 1977; Horodyski y col. 1977).

Desde 1979 el grupo de Margulis se propuso, entre otros estudios, caracterizar nuevos componentes microbianos de la comunidad estratificada, en particular las bacterias heterótrofas, fototrófas anoxigénicas, sulfato reductoras y otras (Margulis y col. 1980). Sin embargo, los trabajos microbiológicos sobre estos organosedimentos laminados demuestran que todavía falta estudiar muchos aspectos de la diversidad microbiana (Margulis y col. 1980).

El conocimiento de los miembros microbianos que habitan y construyen el estromatolito potencial se ha incrementado, la identificación incluye: un vibrio marino productor de un pigmento rojo, la prodigiosina, del género Brevibacterium (Giovannoni y Margulis, 1981), una nueva cepa de Bacillus megaterium altamente tolerante a la sal y Arthrobacter (Gong-Collins, 1986), una cepa eurihalina de Bacillus licheniformis (López-Cortés, 1982) varios productores primarios procariontes: Thiocapsa pfennigii, Chromatium sp., Chloroflexus sp. (Stolz, 1983; Margulis y Stolz 1984), y varios ciliados marinos que comprenden a: Euplotes, Cyclidium, Paranohyale (Margulis y col. 1983) y un amiboflagelado Paratetramitus jugosus (Read y col. 1983).

En Guerrero Negro, Baja California Sur, México, se encuentran los estanques de trabajo para la extracción de halita. Estos estanques presentan comunidades microbianas estratificadas exuberantes, semejantes a las de la Laguna Figueroa

(Awramik y col. 1978; Javor, 1979). El Charco # 5 presentó en abril de 1985 una salinidad de 8.6% y su contenido microbiano estaba representado por Oscillatoria limnotica, D. salina, Microcoleus, Chloroflexus, Beggiatoa y Thioploca a una temperatura de 21 C. El Charco # 8 en el mismo año tenía una salinidad de 13.8% y además la organización y contenido microbiano también fue distinto, presentó diatomeas como Nitzschia, Amphora, Navicula y procariontes como Chloroflexus, Microcoleus y Beggiatoa, a una temperatura de 22 C ( D'Amelio y col. 1985).

El programa "Planetary Biology Intern" patrocinado y administrado por el Marine Biological Laboratory de Woods Hole MA de los E.U.A. brindó al autor la oportunidad de trabajar con las comunidades microbianas estratificadas de Guerrero Negro Baja California Sur, México. El trabajo experimental sobre estas muestras se realizó en el NABA Ames Research Center Moffett Field CA, bajo la supervisión del Dr. Rocco Mancinelli. El capítulo 4 de esta tesis presenta los resultados relacionados con la fijación de nitrógeno molecular asociada a las comunidades microbianas estratificadas de Guerrero Negro, con base en la prueba de reducción de acetileno en etileno evaluada por cromatografía de gases y un detector de ionización de flama.

En esta investigación se obtuvieron datos que permitirán cuestionar la siguiente hipótesis:

Las comunidades microbianas estratificadas en sedimentos laminados de Baja California, México, quizá proporcionan un modelo que representa a ciertos aspectos de la paleoecología del pre-Fanerozoico; ésto, apoyado por la anaerobiosis prevaliente, la escasez de plantas y animales y la presencia de poblaciones masivas de microorganismos fototróficos que depositan sedimentos laminados ricos en carbono.

Los objetivos de esta tesis son:

1. Enumerar cambios ocurridos en la comunidad microbiana estratificada de la localidad "Charco del Norte" debidos a eventos climáticos drásticos.
2. Identificación morfológica, bioquímica y fisiológica de cuatro cepas bacterianas capaces de oxidar manganeso divalente, provenientes de "Charco del Norte" y "Pentapus", Baja California Norte, México.
3. Descripción de la morfología celular de las cepas bacterianas que oxidan manganeso divalente, cuando se desarrollan en medio "K" líquido y sólido y medio de acetato de manganeso 0.002%, además de evaluar su capacidad de oxidar manganeso divalente.
4. Determinar la tasa de fijación de nitrógeno molecular asociada con las comunidades microbianas estratificadas de Guerrero Negro Baja California Sur, por el método de reducción de acetileno en etileno.

## 1.1 REFERENCIAS.

- AWRAMIK, S. M., GEBELIN, C. D. y CLOUD, P. 1978. Biogeologic relationships of ancient stromatolites and modern analogues. En *Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology*. Ed. W. E. Krumbein Vol. 1 Ann Arbor Science. Ann Arbor, Michigan; 165-178.
- AWRAMIK, S. M. 1982. The pre-Phanerozoic fossil record. En *Mineral Deposites and the Evolution the Biosphere*. Eds. H. D. Holland y M. Schidlowski, Dahlem Konferenzen, Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, New York; 67-82.
- AWRAMIK, S. M., SCHOPF, J. W. y WALTER, M. R. 1983. Filamentous fossil bacteria from the Archean of Western Australia. *Precambrian Res.* 20: 357-374.
- BROCK, T. D. 1976. Biological techniques for the study of microbial mats and living stromatolites. En *Stromatolites, Developments Sedimentology*. ed. M. N. Walter, Elsevier, Amsterdam; 21-29.
- D'AMELIO, E., COHEN, Y. y DES MARAIS, D. 1985. Comparative thin light microscopy of select recent submerged cyanobacterial mats. Información obtenida del cartel que se encuentra en el edificio Life Sciences en NASA Ames Research Center Moffett Field CA.
- GIOVANNONI, S. J. y MARGULIS, L. 1981. A red Benecke from Laguna Figueroa, Baja California, México. *Microbios*, 30: 47-63.
- GONG-COLLINS E., 1986. A euryhalic, manganese and iron oxidizing Bacillus megaterium from a microbial mats at Laguna Figueroa, Baja California Mexico. *Microbios*. en prensa.
- HORDDYSKI, R. J. y VON DER HAAR, S. P. 1975. Recent calcareous stromatolites from Laguna Mormona (Baja California) México. *J. Sed. Petr.* 45: 894-906.
- HORDDYSKI, R. J. 1977. Lyngbya mats at Laguna Mormona, Baja California, México. Comparison with Proterozoic stromatolites. *J. Sed. Petr.* 47: 1305-1320.
- HORDDYSKI, R. J., BLOESER, B., VON DER HAAR, S. P. 1977. Laminated algal mats from a coastal lagoon, Laguna Mormona, Baja California, Mexico. *J. Sed. Petr.* 47: 680-696.
- JAVOR, B. J. 1979. Ecology, physiology and carbonate chemistry of blue green algal mats, Laguna Guerrero Negro, Mexico, Ph D. Thesis, University of Oregon E.U.A.

KNOLL, A. y BARGHOORN, E. 1977. Archean microfossil showing cell division from the Swaziland system of South Africa. *Science*, 198: 396-398.

KRUMBEIN, W. E. 1983. Stromatolites the challenge of a term in space and time. *Precambrian Res.* 20: 493-531.

LOPEZ-CORTEZ, A. 1982. Aislamiento y caracterización de una cepa de Bacillus de los ecosistemas microbianos laminados de la Laguna Figueroa Baja California. Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

MARGULIS, L., BARGHOORN, E., ASHENDORF, D. BANERJEE, B., CHASE, D. FRANCIS, S. GIOVANNONI, S. y STOLZ, J. 1980. The microbial community in the layered sediments at Laguna Figueroa, Baja California México: Does it have Precambrian analogues. *Precambrian Res.* 11: 93-123.

MARGULIS, L., GROSDOVSKY, B. D. D., STOLZ, J. F., GONG-COLLINS, E. J., LENK, S., READ, D. y LOPEZ-CORTEZ, A. 1983. Distinctive microbial structures and the pre-Phanerozoic fossil record. *Precambrian Res.* 20: 443-447.

MARGULIS, L. y STOLZ, J. 1984. The stratified microbial community at Laguna Figueroa, Baja California, México. A possible model for pre-Phanerozoic laminated microbial communities preserved in cherts. *Origins of Life*, 14: 671-679.

READ, L. K., MARGULIS, L., STOLZ, J., OBAR, R. y SAWYER, T. K. 1983. A new strain of Paratetramitus jugosus from Laguna Figueroa, Baja California, México. *Biol. Bull.* 165: 241-264.

SCHOPF, J. W. 1977. Precambrian paleobiology: Problems and perspectives. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 3: 213-249.

SCHOPF, J. W. (Ed.) 1983. *Earth's earliest biosphere. Its origin and evolution.* Princeton University Press, New Jersey.

STOLZ, J. F. 1983. Fine structure of the stratified community at Laguna Figueroa, Baja California, México. I. Methods of in situ study of the laminated sediments. *Precambrian Res.* 20: 479-492.

WALTER, M. N. (Ed.) 1976. *Stromatolites, developments sedimentology.* Elsevier. Amsterdam.

## Capítulo 2. PROCARIONTES EN ESTROMATOLITOS POTENCIALES: UN MODELO DE SUCESION MICROBIANA.

### 2.1 RESUMEN.

Los estromatolitos potenciales de la cuenca hipersalina de la Laguna Figueroa, localidad "Charco del Norte" han sufrido cambios dramáticos debido a los periodos prolongados de inundación en los años de 1979 y 1980. Esta inundación colocó por encima del tapete de "Microcoleus", 1.0 cm de sedimento silico clástico, el cual limitó la actividad fotosintética y por lo tanto, el deposito de sedimentos laminados. La totalidad del proceso de crecimiento y descomposición del tapete laminado, puede ser de gran utilidad en la interpretación paleontológica de litologías del pre-Fanerozoico y requiere de más estudios (Awramik, 1982; Awramik y col., 1978; 1983; Brock, 1976; Francis y col., 1978; Knoll y Barghoorn, 1977; Schopf, 1977; 1983).

En este capítulo se describen las técnicas usadas para la obtención de datos que permitan postular un proceso hipotético de sucesión microbiana secundaria, en la que se reconoce la reaparición de una cianobacteria del género Microcoleus, el productor primario original y principal de estas comunidades microbianas estratificadas hasta el verano de 1979. Se presentan los resultados de los estudios de microscopía fónica y electrónica de barrido de las comunidades microbianas estratificadas de la localidad "Charco del Norte" ob-

tenidas en el verano de 1984, los que permiten suponer un proceso ecológico de regeneración de las capas verde y roja.

La nueva capa verde de 1.0 mm de espesor muestra la presencia de Microcoleus, Oscillatoria, Phormidium, Spirulina y Lyngbya. Las bacterias fototróficas anoxygenicas caracterizan la capa roja de 1.0 mm de espesor, localizada por debajo de la nueva capa verde.

## 2.2 INTRODUCCION.

Las comunidades microbianas estratificadas son ecosistemas complejos que contienen una gran diversidad de especies bacterianas. El estudio de sus componentes microbianos ha sido limitado a especies que son facilmente identificables en el campo y que pueden ser aisladas y cultivadas. Las cianobacterias, bacterias púrpuras y en menor grado las bacterias verdes fotosintéticas pueden ser identificadas a partir de muestras de campo, por su tamaño, morfología y pigmentación (Brock, 1974; Golubic, 1976; Truper y Kramer, 1981). El examen de las muestras de campo por microscopia fotonica tiene sus limitaciones. Para el estudio detallado de las formas típicas, el aislamiento y cultivo permiten la caracterización y la identificación de los componentes microbianos de los estromatolitos potenciales, no sólo para identificarlos sino con propósitos de entender las condiciones medio ambientales y paleontológicas (Golubic, 1976; Rippka y col., 1979; Stanier y col., 1980). Sin embargo, los miembros de la comunidad, factibles de ser cultivados y aislados, pueden no ser especies predominantes en el campo (Stolz, 1984). Aunque las características fisiológicas y morfológicas son la base para la clasificación de los procariontes en diez y seis phyla (Margulis y Schwartz, 1982), esos phyla también pueden ser identificados por su morfología ultraestructural.

### 2.3 HISTORIA DE CAMPO.

La Laguna Figueroa se encuentra al norte de la Bahía de San Quintín, estado de Baja California Norte, México, yace en una cuenca inundable e hipersalina. La localidad de estudio "Charco del Norte" ha estado sujeta a procesos periódicos de inundación-deseccación (véase Figuras 2.1 A, B, y C). La Laguna Figueroa mide aproximadamente 16 km de longitud y 1 km de ancho, se encuentra a lo largo de una barra de dunas asociadas a las playas del Océano Pacífico. La extensión de la planicie de evaporitas varía notablemente de acuerdo con las condiciones temporales de la estación del año. Las lluvias abundantes del invierno de 1979 y 1980 convirtieron la planicie en una laguna de agua dulce. La localidad permaneció inundada durante todo el año de 1980, hasta el verano de 1981, cuando se desecó nuevamente. El nivel de la inundación alcanzó tres metros de profundidad en marzo de 1980 (véase Figuras 2.2 A, B, y C) y produjo cambios estructurales importantes en la composición microbiana del estromatolito potencial, que Horodyski y colaboradores (1975; 1977) describieron erróneamente como el tapete "algal" laminado de *Microcoleus*.

En 1981, las bacterias fototróficas anoxigénicas de los géneros Thiocapsa y Chromatium sustituyeron a la cianobacteria del género Microcoleus, y se convirtieron en los productores primarios principales de la comunidad microbiana estratificada. Los tapetes laminados típicos dominados por Micro-

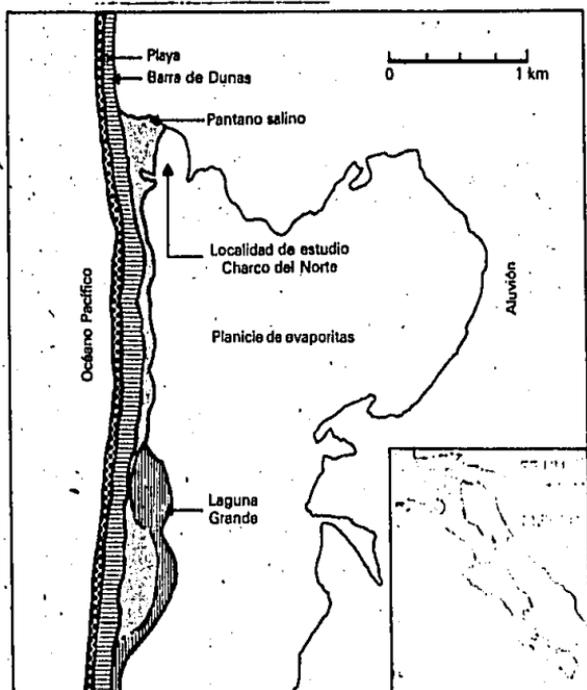


Figura 2.1 A. Mapa de Baja California, México. El detalle muestra la ubicación de la localidad de estudio, situada al norte de la Bahía de San Quintín.

Figura 2.1 B. Imagen obtenida por el Sky-Lab, se aprecia la localidad de estudio desecada, cortesía de L. Margulis.



Figura 2.1 C. Imagen obtenida por avión, se reconoce el mismo sitio inundado, cortesía de L. Margulis.



Figura 2.2 A. Polígonos de desecación de *Microcoleus* como se observaron desde 1965 hasta el verano de 1979, localidad "Charco del Norte", cortesía de R. Horodyski, escala con intervalos de 5.0 cm.

Figura 2.2 B. La misma localidad en mayo de 1979; el sitio se encontró inundado por un metro de agua dulce durante todo el año de 1980.

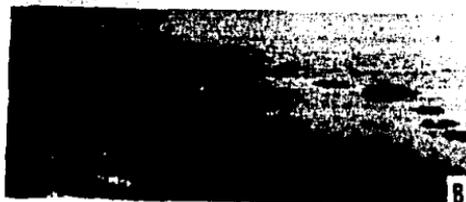


Figura 2.2 C. En el verano de 1982



coleus previos a la inundación de 1979 se compararon con muestras obtenidas en 1982 y 1984 y se notaron cambios a nivel de la composición microbiana (Stolz, 1983; Stolz y Margulis 1984 y López-Cortés y col. 1984).

## 2.4 MATERIALES Y METODOS.

### COLECTA DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de las comunidades microbianas estratificadas para este estudio se colectaron en los veranos de 1982 y 1984 en la localidad "Charco del Norte". De las muestras de 1982 se elaboraron preparaciones en fresco para ser observadas con la ayuda de un microscopio NIKON H. Con un nucleador se obtuvieron las muestras que se colocaron en cajas de Petri estériles, para más tarde llevar a cabo observaciones con un microscopio de contraste de fases NIKON Labophot.

### MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

Para la microscopía electrónica de barrido las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % a partir de una solución concentrada al 70 % (Research Industries LADD, cat # 20100, lot # 389), diluido con una solución amortiguadora de citrato de sodio 0.2 M y agua filtrada de la localidad, este proceso de fijación fue ideado por el Dr. Chase del Veterans Administration Hospital Laboratory of Sepulveda, California y el fijador fue proporcionado por el Dr. Stolz durante la expedición de 1984. Por razones de distancia, las muestras se fijaron durante un periodo de cuatro días a 4 C, más tarde

las muestras se deshidrataron progresivamente en una serie de diluciones de alcohol en agua destilada (50, 60, 70, 80, 90 %), durante una hora cada paso y en alcohol etílico absoluto de una a dos horas, se secaron al punto crítico del dióxido de carbono con una secadora Techniques CPA II. Finalmente se recubrieron con carbón y plata en una evaporadora de vacío JOEL JEE-4B. Las observaciones se realizaron en un microscopio JOEL JSM-35 A 20 kV. El secado y las observaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido del Centro de Investigaciones en Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, bajo la supervisión de la bióloga Yolanda Hornelas Uribe.

## 2.5 RESULTADOS Y DISCUSION.

### HISTORIA DE CAMPO.

Se presenta a continuación una comparación de la textura y cambios microbianos de los estromatolitos potenciales de la Laguna Figueroa durante los veranos de 1979, 1982 y 1984 (véase Tabla 2.1 y Figura 2.3 A, B y C).

Como describieron Horodyski y colaboradores (1977), en 1977 existía un tapete microbiano vigoroso formado por tres láminas de coloración distinta, cubierto por una capa fina de minerales evaporíticos (yeso, anhidrita y halita), y arenas de cuarzo. En la lámina inferior de color verde dominó la cianobacteria *Microcoleus*, la lámina de color rojo presentó bacte-

**TABLA 2.1. PRODUCTORES PRIMARIOS DE LOS TAPETES MICROBIANOS,**  
**"Charco del Norte"**

---

AÑO Y EVENTO	PRODUCTORES PRIMARIOS
Antes de 1979	Microcoleus chthonoplastes Chloroflexus sp. Pleurocapsa sp. Thiocapsa sp.
Inundación de 1979	Thiocapsa sp. Pleurocapsa sp.
Inundación de 1980	Thiocapsa sp.
Evaporación de 1982	Spirulina sp. Pleurocapsa sp. Oscillatoria sp. Lyngbya sp. Chromatium sp. Thiocapsa sp.
Evaporación de 1984	Spirulina sp. Oscillatoria sp. Microcoleus sp. Phormidium sp. Lyngbya sp. Nostoc-Anabaena spp. Bacterias fototróficas

---

Todos estos géneros probablemente han tenido análogos pre-Fanerozoicos.



Figura 2.3 A. Tapete o comunidad microbiana estratificada obtenida en agosto de 1980, se aprecia el sedimento silicoclástico de la superficie (flecha).



Figura 2.3 B. Aspecto de una muestra de campo, de 1982, se reconoce una capa notable de sedimento orgánico liso de color negro (flecha) y por debajo la laminación antigua.



Figura 2.3 C. Detalle de una muestra de la comunidad microbiana asociada a minerales evaporíticos (1982).

rias fototróficas anoxigénicas del tipo de Chromatium, Thiocapsa y Chloroflexus; la lámina de color negro y altamente sulfurosa contenía bacterias heterótrofas.

El tapete de 1979 (véase Figura 2.3 A), se caracterizó por ser altamente sulfuroso y por tener en la superficie un centímetro de sedimento silicoclástico y yeso y por debajo la laminación antigua (Margulis y col., 1980).

#### MICROSCOPIA.

La primera parte de la descripción se realizó a partir de las observaciones de las muestras de campo 150 a 169, con la ayuda de un microscopio NIKON H. A partir de las muestras de 1982 se detectó el desarrollo de un nuevo tapete microbiano de 2 a 3 mm de espesor, asociado a minerales evaporíticos. La comunidad microbiana de 1982 presentó nodulos negros de cianobacterias asociados a la lámina verde y se encontró por debajo una lámina de color rojo que contenía los siguientes procariontes: Oscillatoria, Lyngbya, Spirulina, Pleurocapsa, Chloroflexus, Chromatium y Thiocapsa. Por debajo del tapete microbiano nuevo e incipiente existía una notable capa de sedimento orgánico liso de color negro de 10 cm de espesor, resultado de la actividad de bacterias sulfato reductoras, finalmente se encontró la laminación antigua y la paleocorteza (véase Figura 2.3 B y C). Fue evidente la heterogeneidad espacio-temporal del proceso de crecimiento del nuevo tapete microbiano.

En el verano de 1984 la diversidad microbiana de las ca-

pas verde y roja se incrementó y se hicieron patentes las diferencias profundas de la composición microbiana entre pocos centímetros de distancia vertical y horizontal.

Los resultados que se presentan a continuación corresponden a la microscopía de contraste de fases y electrónica de barrido; se emplearon para la identificación los criterios de los siguientes autores; Fogg y col., (1973); Golubic, (1976); Ortega, (1984); Margulis y Stolz comunicación personal (1986) y Walter, (1976).

La reaparición de Microcoleus solo se observó en las regiones asociadas al pantano salino en "Charco del Norte" pero no en la planicie de evaporitas (Margulis y Stolz comunicación personal, 1986).

Con la ayuda de un fotomicroscopio NIKON Labophot se identificó a los productores primarios más evidentes del nuevo tapete microbiano de 1984. La cianobacteria Microcoleus (véase Figuras 2.4 A y B), constructor típico de estromatolitos potenciales, se identificó con base en su capacidad distintiva de formar filamentos con varios tricomas activamente móviles envueltos por una vaina mucilaginosa (Golubic, 1976). Las cianobacterias con tricomas de puntas curvas caracterizan a los miembros del género Oscillatoria (véase Figura 2.5), así como el tamaño y morfología singular de la cianobacteria Spirulina (véase Figura 2.6) y una gran diversidad de células no identificadas.

La microscopía de contraste de fases evidenció la pre-

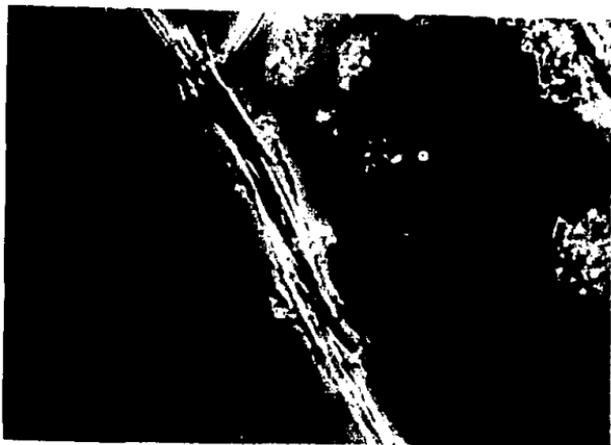


Figura 2.4 A y B. Cianobacterias de la familia Oscillatoriaceae, se caracterizan por presentar tricomas activamente móviles y envueltos por una vaina común gelatinosa, características distintivas del género Microcoleus, aumentos 20 X y 40 X respectivamente.

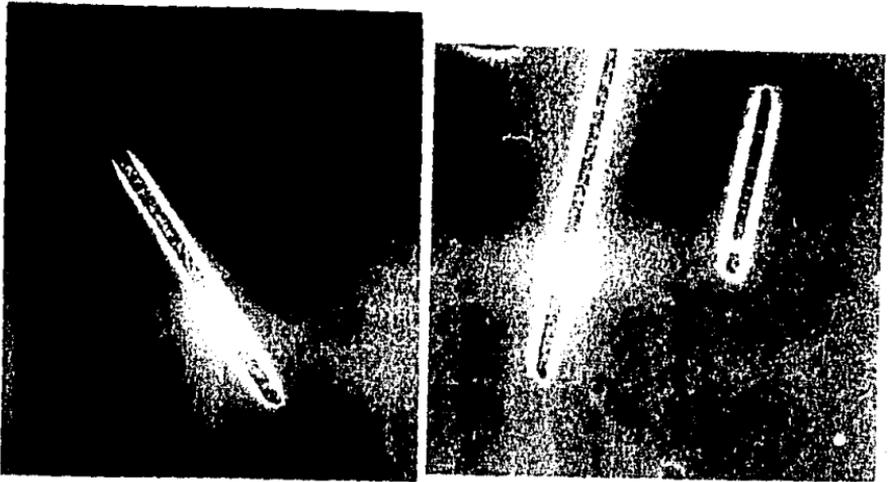


Figura 2.5 Cianobacterias filamentosas sin vaina singular del género Oscillatoria, se caracteriza por sus puntas encorvadas, el diámetro del tricoma es de 5.0 micras (40 X).



Figura 2.6 Cianobacterias filamentosas de la familia Oscillatoriaceae, sin vaina, de forma helicoidal, el diámetro de cada tricoma es de 5.0 micras y corresponde al género Spirulina asociada a miembros del género Oscillatoria, 40 X.

sencia de filamentos de cianobacterias disminuidos en volumen con separación de sus células adyacentes (vease Figura 2.7). Los miembros de la familia Oscillatoriaceae presentan las características antes mencionadas durante sus primeras etapas de degradación (Golubic y Barghoorn, 1977; Francis y col., 1978). Estas observaciones fueron verificadas por microscopía electrónica de barrido y se compararon con microfósiles pre-Fanerozoicos (vease Figuras 2.8 A y B).

Las envolturas gelatinosas extracelulares o vainas de las cianobacterias filamentosas y la habilidad para deslizarse fuera de la vaina, corresponden a estrategias adaptativas que llevan a la construcción de estromatolitos potenciales. Como una consecuencia de este fenómeno las vainas de las cianobacterias filamentosas pueden preservarse, lo que repercute en una alta potencialidad de fosilización y elevada frecuencia de este tipo de microorganismos en el registro fósil del pre-Fanerozoico (Golubic y Hofmann, 1976; Golubic y Barghoorn 1977; Krumbein, 1983; Margulis y col., 1983).

La razón de que se preserven de manera diferente las envolturas y las células, quizá se deba al atrapamiento de metales y sales por los productos extracelulares localizados en las vainas.

El género Pseudoanabaena presenta un patrón de degradación distintivo por el incremento en el volumen de sus células individuales y su degradación explosiva. En el pasado se interpretó a células voluminosas de filamentos fósiles como



Figura 2.7 Cianobacterias filamentosas que muestran un patrón de degradación característico, 40 X.

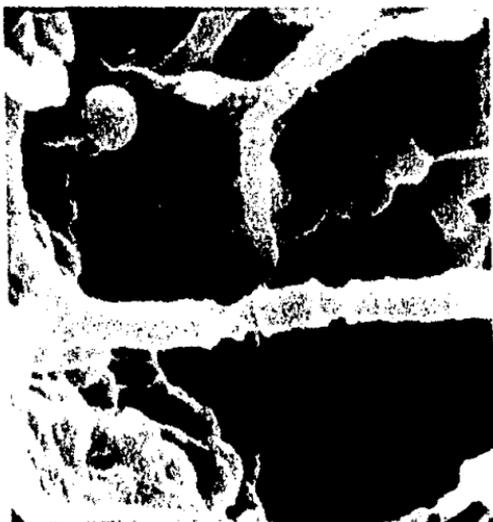


Figura 2.8 A. Diversidad microbiana evidente, sobresale un filamento que muestra el colapso de una célula y evidencia los procesos de degradación post-mortem, diámetro de 1.0 micras (9,400 X).

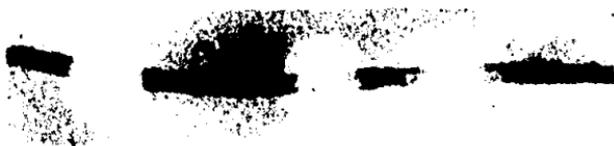


Figura 2.8 B. Microfósil filamentosos del pre-Fanerozoico, que presenta células colapsadas, debido, quizá a los procesos de degradación, tomado de Schopf, 1983.

posibles heterocistos y por lo tanto su asociación con el proceso biológico de fijación de nitrógeno atmosférico, en esta perspectiva los procesos de degradación han permitido replantear estas interpretaciones. En esta dirección, los filamentos no septados del pre-Fanerozoico quizá corresponden a vainas vacías de cianobacterias, más que a hongos o algas verdes (Golubic y Barghoorn, 1977; Schopf, 1983).

En relación a la formación de los microfósiles, las imágenes de microscopía electrónica de barrido muestran la potencialidad diferencial que tienen las células procariontes para mineralizarse, lo que sugiere, repercute en su capacidad de conservarse como microfósiles (véase Figuras 2.9 y 2.10).

Los razgos empleados para su identificación se mencionan en los pies de figura. Desde el punto de vista morfológico los componentes procariontes que se presentan en este capítulo, probablemente han tenido análogos pre-Fanerozoicos (Awramik, 1982; Golubic y Barghoorn 1977; Knoll, 1977; Walter, 1976), que sólo se preservan como vainas, cápsulas o glicocalix y no como paredes celulares (Knoll, 1977).

En la interpretación del registro fósil del pre-Fanerozoico se llegó a englobar a muchos fósiles filamentosos como microorganismos análogos a las cianobacterias, al respecto es conveniente reconsiderar estas interpretaciones ya que las bacterias quimilitotróficas (véase Figura 2.11), y otros procariontes pueden presentar esa morfología, (Schopf, 1983).



Figura 2.9. Tricoma de cianobacteria sin vaina, diámetro de 47 micras (320 X).

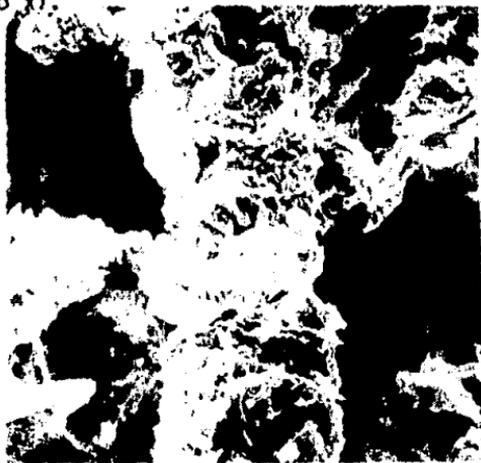


Figura 2.10. Vaina de cianobacteria filamentosas impregnada de minerales evaporíticos y frustulas de diatomeas, el diámetro de la vaina es de 36 micras (780 X).



Figura 2.11. También se han reconocido procariontes quimiolitotautotróficos parecidos a Beggiatoa, observándose la presencia inclusiones intracelulares de azufre elemental, el diámetro del filamento es de 2.5 micras (40 X).

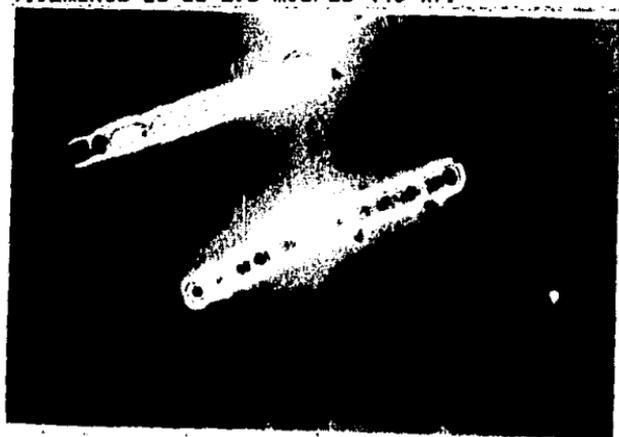


Figura 2.12. Cianobacterias filamentosas no identificadas, el tricoma mide 1.0 micra de diámetro (40 X).

La identificación por microscopía fotónica y electrónica de barrido, pueden complementar los estudios de microscopía electrónica de transmisión realizados por Stolz, (1983;1984) y Stolz y Margulis, (1984); sin embargo, se consideran insuficientes y requieren de estudios ulteriores. Margulis y Stolz en 1986 afirmaron que la microscopía electrónica de barrido es insuficiente para garantizar que los organismos que se presentan como pertenecientes al género Phormidium (véase Figuras 2.13, 2.14, 2.15, 2.16), lo fueran en efecto y señalaron que se pueden confundir con miembros del género Chloroflexus.

La microscopía de las nuevas capas verde y roja de 1984, (López-Cortés y Hornelas, 1985), evidencian la existencia de una gran diversidad de células procariontes (véase Figura 2.17). La forma esférica de las células, la agrupación en racimo, el tamaño de 1.0 micras de diámetro por célula, la presencia de una vaina tenue y la procedencia de la muestra son características singulares del género Thiocapsa (véase Figura 2.18).

La identificación de las células procariontes que se presenta, cobrará valor solo si se lleva cabo aislamientos a partir de inóculos de tapetes microbianos en fase de crecimiento, a fin de caracterizar e identificar los productores primarios (Rippka y col., 1979; Truper y Pfennig, 1981), de las diferentes capas de la comunidad microbiana estratificada en sedimentos laminados.

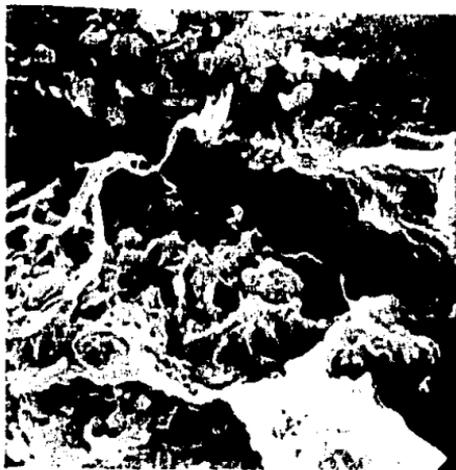


Figura 2.13.



Figura 2.14.



Figura 2.15.



Figura 2.16.

Figura 2.13. Cianobacteria filamentosa parecida al género Phormidium, tricoma de 0.9 micras de diámetro sin vaina, la flecha indica un agregado de células cocoidales con un diámetro de 1.2 micras envueltas por una vaina tenue, parecidas a Thiocapsa (2,200 X).

Figura 2.14. Cianobacteria filamentosa septada, sin vaina, parecida a Phormidium de 0.8 micras de diámetro; en el fondo se observa un agregado de células cocoidales parecidas a Thiocapsa, 1.0 micra de diámetro (5,400 X).

Figura 2.15. Cianobacteria filamentosa, Phormidium y cianobacterias cocoidales no identificadas, de 4.5 micras de diámetro, en proceso de gemación (3,200 X).

Figura 2.16. Complejo microbiano no identificado compuesto por cianobacterias filamentosas, frustulas de diatomeas, cocos y bacilos (1,200 X).



Figura 2.17. Asociación compleja de posibles bacterias fototróficas anoxigénicas, bacilos de  $1.1 \times 0.45$  micras; cocos de  $1.0$  micra de diámetro, filamentos de  $0.7$  micra de diámetro y vibrios de  $1.0 \times 0.7$  micras de diámetro (4,400 X).



Figura 2.18. Agregado de posibles bacterias fototróficas anoxigénicas del género Thiocapsa, con vaina tenue y de  $1.0$  micra de diámetro; se aprecia su asociación con minerales evaporíticos (4,000 X).

## 2.6 REFERENCIAS.

AWRAMIK, S. M., GEBELIN, C. D. Y CLOUD, P. 1978. Biologic relationships of ancient stromatolites and modern analogues. En *Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology*. Ed. W. E. Krumbein. Vol. I. Ann Arbor Science. Ann Arbor, Michigan; 165-178.

AWRAMIK, S. M. 1982. The pre-Fanerozoic fossil record. En *Mineral Deposites and Evolution of the Biosphere*. Eds. H. D. Holland y M. Schidlowski, Dahlem Konferenzen, Berlin, Heidelberg, Springer New York, 67-82.

AWRAMIK, S. M., SCHOPF, J. W. y WALTER, M. R. 1983. Filamentous fossil bacteria from the Archean of West Australia. *Precambrian Res.* 20: 357-374.

BROCK, T. D. 1976. Biological techniques for the study of microbial mats and living stromatolites. En *Stromatolites, Development in Sedimentology*, Ed. M. N. Walter. Elsevier Amsterdam: 21-29.

FOGG, G. E. STEWART, W. D. P. FAY, P. Y WALSBY, E. 1973. *The blue-green algae*. Academic Press, New York.

FRANCIS, S. MARGULIS, L. y BARGHOORN, E. 1978. On the experimental silification of microorganisms II. On the time of appearance of eukaryotic organisms in the fossil record. *Precambrian Res.* 6: 65-100.

GOLUBIC, S. 1976. Organisms that build stromatolites. En *Stromatolites*, ed. M. R. Walter. Elsevier, Amsterdam: 113-140.

GOLUBIC, S. y HOFMANN, H. J. 1976. Comparison of Holocene and mid-Precambrian Entophysalidaceae (Cyanophyta) in stromatolites algal mats; cell division and degradation. *J. Paleontology* 50: 1074-1082.

GOLUBIC, S. y BARGHOORN, E. 1977. Interpretation of microbial fossils with special reference to the Precambrian. En *Fossil Algae*. ed. E. Flugel, Springer New York: 1- 13.

HORODYSKI, R. J. y VON DER HAAR, S. P. 1975. Recent calcareous stromatolites from Laguna Mormona (Baja California) Mexico. *J. Sed. 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, Mexico. *J. Sed. Petr.* 47: 680-696.

- KNOLL, A. 1977. Paleomicrobiology. En CRC Handbook of microbiology. Vol. I. Bacteria. Eds. A. I. Laskin y H. Lechevalier. 2nd. ed. CRC Press, Inc., Cleveland.
- KNOLL, A. y BARGHOORN, E. 1977. Archean microfossils showing cell division from the Swaziland system of South Africa. Science 198: 396-398.
- KRUMBEIN, W. E. 1983. Stromatolites the challenge of a term in space and time. Precambrian Res. 20: 493-531.
- LOPEZ-CORTES, A., MARGULIS, L. y STOLZ, J. 1984. Las comunidades microbianas estratificadas de Baja California Norte. Ciencia y Desarrollo CONACYT # 59 año X nov-dic. 45-52.
- LOPEZ-CORTES, A. y HORNELAS, U. Y. 1985. Ecofisiología de comunidades microbianas estratificadas: Un modelo de sucesión microbiana. XVI Congreso Nacional de Microbiología. Instituto Tecnológico de Durango, Dgo., México. 21-22.
- MARGULIS, L. BARGHOORN, E., ASHENDORF, D. BANERJEE, B. CHABE, D. FRANCIS, S. GIOVANNONI, S. Y STOLZ, J. 1980. The microbial community in the layered sediments at Laguna Figueroa, Baja California Mexico: Does it have Precambrian analogues Precambrian Res. 11: 93-123.
- MARGULIS, L. y SCHWARTZ, K.W. 1982. Five kingdoms. An illustrated guide to the phyla of life on earth. W. H. Freeman y Co., San Francisco.
- MARGULIS, L., GROSOVSKY, B. D. D., STOLZ, J. F., GONG-COLLINS, E. J. LENK, S., READ, D. y LOPEZ-CORTES, A. 1983. Distinctive microbial structures and the pre-Phanerozoic fossil record. Precambrian Res. 20: 443-447.
- MARGULIS, L. y STOLZ, J. 1984. The stratified microbial community at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico. A possible model for pre-Phanerozoic laminated microbial communities preserved in cherts. Origins of Life, 14: 671-679.
- MARGULIS, L. y STOLZ, J. 1986. Comentarios a las imagenes de microscopía de las muestras de "Charco del Norte", 1984. Comunicación personal en la Universidad de Berkeley CA.
- ORTEGA, M. M. 1984. Catálogo de algas continentales recientes de México. Coordinación de la Investigación Científica, Instituto de Biología, UNAM.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M. y STANIER, R. Y. 1979. Generic assignments strains histories and propeties of pure cultures of cyanobacteria. *J. of General Microbiology* 111: 1-61.

SCHOPF, J. W. 1977. Precambrian paleobiology: Problems and perspectives. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 3: 213-249.

SCHOPF, J. W. (ed.) 1983. Earth's earliest biosphere. Its origin and evolution. Princeton University Press, New Jersey.

STANIER, R. Y., PFENNING, N. y TRUPER, H. 1981. Introduction to the phototrophic prokaryotes. En *The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification bacteria*. Eds. M. P. Starr, H. Stolp, H. Truper, A. Balows y H. Schlegel. Springer Berlin: 197-211.

STOLZ, J. F. 1983. Fine structure of the stratified communities at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico. I. Methods of in situ study of the laminated sediments. *Precambrian Res.* 20: 479-492.

STOLZ, J. F. 1984. Fine structure of the stratified communities at Laguna Figueroa. Baja California, Mexico. II Transmission microscopy as a diagnostic tool studying microbial communities in situ. En *Microbial mats: Stromatolites*, Ed. R. Alan. Liss Inc., 150 Fifth Av., New York, 10011.

TRUPER, H. y PFENNING, N. 1981. Characterization and identification of anoxygenic phototrophic bacteria. En *The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Eds. M. P. Starr, H. Stolp, H. Truper, A. Balows y H. Schlegel. Springer Verlag Berlin: 299-312.

TRUPER, H. y KRAMER, J. 1981. Principles of characterization and identification of prokaryotes. En *The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Eds. M. P. Starr y col. Springer Verlag Berlin: 176-193.

WALTER, M.N. (ed.) 1976. Stromatolites, developments in sedimentology. Elsevier. Amsterdam.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M. y STANIER, R. Y. 1979. Generic assignments strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. of General Microbiology* 111: 1-61.

SCHOPF, J. W. 1977. Precambrian paleobiology: Problems and perspectives. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 5: 213-249.

SCHOPF, J. W. (ed.) 1983. *Earth's earliest biosphere. Its origin and evolution.* Princeton University Press, New Jersey.

STANIER, R. Y., PFENNING, N. y TRUPER, H. 1981. Introduction to the phototrophic prokaryotes. En *The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification bacteria*. Eds. M. P. Starr, H. Stolp, H. Truper, A. Balows y H. Schlegel. Springer Berlin: 197-211.

STOLZ, J. F. 1983. Fine structure of the stratified communities at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico. I. Methods of in situ study of the laminated sediments. *Precambrian Res.* 20: 479-492.

STOLZ, J. F. 1984. Fine structure of the stratified communities at Laguna Figueroa. Baja California, Mexico. II Transmission microscopy as a diagnostic tool studying microbial communities in situ. En *Microbial mats: Stromatolites*, Ed. R. Alan. Liss Inc., 150 Fifth Av., New York, 10011.

TRUPER, H. y PFENNING, N. 1981. Characterization and identification of anoxygenic phototrophic bacteria. En *The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Eds. M. P. Starr, H. Stolp, H. Truper, A. Balows y H. Schlegel. Springer Verlag Berlin: 299-312.

TRUPER, H. y KRAMER, J. 1981. Principles of characterization and identification of prokaryotes. En *The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Eds. M. P. Starr y col. Springer Verlag Berlin: 176-193.

WALTER, M.N. (ed.) 1976. *Stromatolites, developments in sedimentology.* Elsevier. Amsterdam.

### Capítulo 3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE CEPAS DEL GENERO BACILLUS CAPACES DE OXIDAR MANGANESO.

#### 3.1 RESUMEN.

Se han aislado y caracterizado bacterias del género Bacillus capaces de oxidar manganeso y / o de formar estructuras coloniales singulares. Las cepas proceden de comunidades microbianas estratificadas encontradas en "Charco del Norte" y "Pentapus" Baja California Norte, México.

En este capítulo se presentan los mapas de las áreas de estudio que se hicieron en colaboración con el programa de investigación Earth Watch de los E. U. A., en el año de 1983.

Se han identificado y caracterizado nuevas cepas de la especie Bacillus licheniformis con morfologías coloniales y celulares singulares y capacidad diferencial para oxidar el manganeso divalente. Las cepas CHN-36-80-L Y CHN-36-80-B provienen de las láminas negras de la comunidad microbiana estratificada de la localidad "Charco del Norte" del verano de 1980.

También se reporta la identificación de las especies Bacillus licheniformis cepa P2-V-83-2 y Bacillus brevis cepa P-2-V-83-3 obtenidas de la salina "Pentapus" en el verano de 1983.

La caracterización morfológica, fisiológica y ecológica de las cepas antes mencionadas, pueden ser de utilidad para la reinterpretación del microfósil Eoastrion de la Formación

de Hierro Gunflint, Canadá con una edad de 2,000 millones de años, que también es similar a Warrawoonella radia del Oeste de Australia con una edad de 3,500 millones de años (Aframik col., 1983; Schopf, 1983). Las morfologías singulares y la formación de precipitados, probablemente explican la formación de los fósiles microbianos.

### 3.2 INTRODUCCION.

El manganeso constituye alrededor del 0.1% del peso de la corteza terrestre, se encuentra distribuido en rocas, suelos, agua dulce, agua de mar y sedimentos. Aunque es posible encontrar varios estados de oxidación (2+, 3+, 4+, 6+, y 7+), en la naturaleza sólo los comportamientos 2+ y 4+ son los más comunes, el estado 3+ se presenta en menor grado. Sólo el comportamiento 2+ se encuentra como un ión libre en solución, mientras que los estados 3+ y 4+ se encuentran como manganato insoluble.

El manganato 4+ ha sido conocido como depurador de varios cationes, especialmente metales tales como  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$   $\text{Cu}^{++}$  y frecuentemente se encuentran en asociación con el ión férrico. El estado 4+ también es la forma predominante en una variedad de óxidos minerales.

El manganeso es un elemento traza esencial para los microorganismos, las plantas y los animales, aunque a concentraciones altas generalmente es tóxico. Las concentraciones que van de 0 a 100 microgramos por mililitro de  $\text{Mn}^{++}$  se han estudiado en diferentes medios para cultivo del género *Bacillus* (Charney y col., 1951).

El ión manganeso divalente, activa muchas reacciones enzimáticas involucradas en el rompimiento de carbohidratos y

en el metabolismo de ácidos orgánicos, del nitrógeno y del fósforo. El manganeso se requiere en la fotosíntesis y también participa en la superóxido dismutasa de los procariontes, una enzima que protege a la célula de los efectos tóxicos del radical superóxido que se encuentra en la mayoría de las células aeróbicas. En algunas bacterias anaeróbicas facultativas que no poseen superóxido dismutasa, el  $Mn^{++}$  las protege de la toxicidad del oxígeno (Archibald y Fridovich, 1981; 1982).

Por otra parte se conoce una diversidad considerable de microorganismos que pueden transformar el manganeso (Nealson, 1978; Ehrlich, 1980; Gregory y Staley, 1982).

Se han propuesto mecanismos directos e indirectos de transformación del manganeso, de un estado de valencia a otro por microorganismos (Nealson, 1983). Los mecanismos indirectos incluyen cambios en el medio que rodea a la bacteria, como modificaciones en los valores de potencial redox o de pH, adsorción de óxidos preformados sobre la superficie celular o utilización microbiana de sustratos orgánicos. Los efectos directos son enzimáticos o mediados por matrices orgánicas que modulan la oxidación o reducción del manganeso. Se ha tomado como cierto que algunas bacterias pueden obtener energía celular de la oxidación del manganeso divalente a manganeso tetravalente durante el crecimiento autotrófico o mixotrófico (Ehrlich, 1968 a; 1968 b; 1970; 1971; 1980).

Mientras que algunas de las características bioquímicas y fisiológicas de las bacterias que usan el manganeso han sido estudiadas en cultivos de laboratorio, poco se sabe, acerca de la ecología de tales bacterias en la naturaleza. Se conoce su participación en la transformación del manganeso en suelos y agua dulce (Dubina y col., 1974; Chapnick y col., 1982; Ghiorse y Chapnick, 1983). Los ambientes marinos han sido menos estudiados y en otros ambientes como los pantanos salinos se desconoce su papel ecológico. Aunque se sabe que las bacterias que oxidan manganeso están ampliamente distribuidas en el ambiente marino (Ehrlich, 1963; 1968 a; 1971; Krumbein, 1971; Nealson, 1978) y que pueden ser ubicuas en sedimentos de este ambiente, sólo pocos estudios han documentado objetivamente la actividad de bacterias que oxidan o reducen el manganeso in situ (Tobo, 1983).

Se ha señalado que el potencial de los microorganismos para catalizar la oxidación de  $Mn^{++}$  en un ambiente dado no corresponde necesariamente a la actividad in situ de esos microorganismos. Por ejemplo, la enumeración de bacterias que oxidan manganeso no demuestra su actividad in situ. El medio artificial en el cual las bacterias son aisladas y contadas imponen un ambiente definido que no necesariamente representa el encontrado en la naturaleza. La regulación del metabolismo bacteriano en respuesta a los cambios del medio, compuestos orgánico, e inorgánicos de los medios de cultivo, complican

aún más las conclusiones. Además de que muchas bacterias que pueden ser activas en el ambiente aún no están disponibles para ser cultivadas en un medio artificial dado (Tebo, 1983).

Por otro lado, se han empleado las características estructurales de las bacterias que oxidan manganeso para la interpretación de depósitos de hierro y manganeso que contienen microfósiles del pre-Fanerozoico así como las concreciones modernas (Nealson y Tebo, 1980; Nealson, 1983; Margulis y col., 1983).

El aislamiento y la caracterización morfológica, bioquímica y fisiológica de cepas del género Bacillus, aisladas de comunidades microbianas estratificadas y capaces de oxidar manganeso, corresponden a las etapas iniciales de la investigación que intenta comprender la conservación diferencial que presentan las células procariontes conservadas como microfósiles en el registro del pre-Fanerozoico.

### 3.3 MATERIALES Y METODOS.

#### AISLAMIENTO

Las bacterias reportadas en este capítulo proceden de las localidades "Charco del Norte" y "Pentapus" (vease Figura 3.1).

Se identificaron y caracterizaron las cepas CHN-36-80-L y CHN-36-80-G de los aislamientos realizados de muestras del área "Charco del Norte" de 1980. Para ello se utilizó la téc-

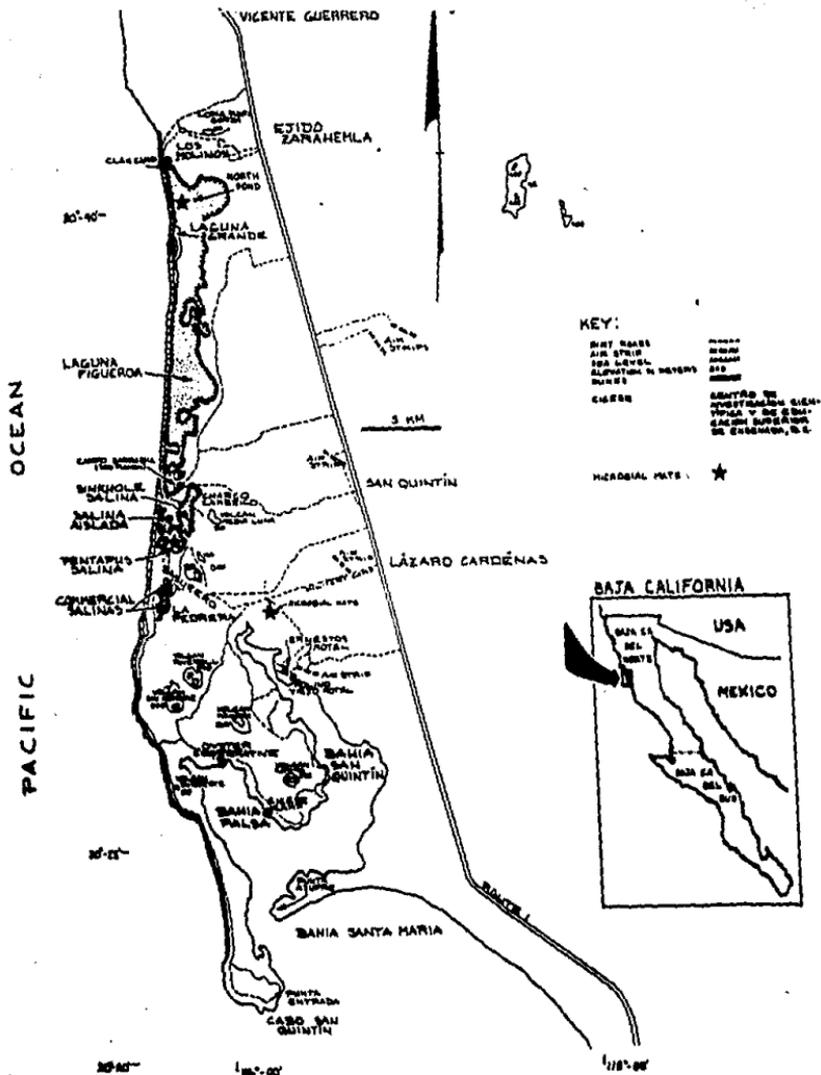


Figura 3.1. Mapa de la Laguna Figueroa, se indica con una estrella la localización de dos de los sitios, que se mencionan en el texto (cortesía del laboratorio de la Dra. Margulies).

nica de dilución combinada con un tratamiento térmico de 75 C durante 10 minutos; de cada dilución se tomo 0.1 ml para sembrar en medio K (véase Apendice) por el método de estria cerrada e incubadas a 30 C de 24 a 48 horas. Este proceso se emplea con el fin de recuperar microorganismos que desarrollan estructuras de resistencia como son las esporas de las bacterias del género Bacillus; el uso del medio selectivo "K" permite el reconocimiento de las bacterias que oxidan manganeso.

Los inóculos de las muestras de 1983 procedentes de la salina "Pentapus" fueron colocadas en medio "K" e incubadas a temperatura ambiente durante su transporte al laboratorio. A los ocho días se seleccionaron los crecimientos supuestamente positivos a la oxidación de manganeso utilizando como criterio el color de la colonia y la prueba de la mancha azul de la leucoberbelina (LBB).

Los cultivos puros se lograron a partir de la técnica antes mencionada, y se recuperaron entre otras, a las cepas P2-V-83-2 y P2-V-83-3.

#### MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES.

Las características celulares; forma, agrupación, tamaño, movilidad, forma de la espora, posición, y deformación del esporangio se determinaron a partir de los medios "K" sólido y líquido y el medio de acetato de manganeso (véase Apendice).

## CICLO DE VIDA Y FORMACION DE LA COLONIA.

La preparación de cámaras para microcultivos consiste en lo siguiente: se coloca de 0.1 a 0.3 ml de medio "K" sólido fundido en un portaobjetos libre de grasa y estéril, una vez que ha solidificado se adicionan 10 microlitros de una dilución de bacterias de un cultivo puro y se siembran en estria con la ayuda del asa bacteriológica, se coloca un cubreobjetos libre de grasa y estéril; se sella con una mezcla de parafina y petrolatum con el fin de evitar la contaminación y mantener la humedad, se coloca la cámara en una caja de Petri estéril y se incuba a 30 C. Las observaciones se llevaron a cabo con un microscopio de contraste de fases NIKON Labophot.

## IDENTIFICACION BIOQUIMICA Y FISIOLOGICA.

La identificación bioquímica y fisiológica de las cepas se basó en las siguientes pruebas: producción de ácido, gas y acetoina a partir de D-glucosa, se emplearon los medios M1, M2 y M3 respectivamente, hidrólisis del almidón, caseína, gelatina; desarrollo anaeróbico en agar, reducción de nitratos a nitritos, producción de alcali en citrato de Simmons, producción de catalasa y oxidasa, utilización de la fenilalanina, crecimiento en agar y caldo nutritivo con cloruro de sodio al 7 % y desarrollo a 50, 55 y 60 C, (Buchanan y Gibbons, 1974; Norris y col., 1981). Todas las pruebas también se realizaron con la cepa tipo Bacillus subtilis e 6051 ATCC.

#### OXIDACION DE MANGANESO.

La capacidad que poseen estas cepas para oxidar manganeso se determinó a partir de los medios "K" y acetato de manganeso al 0.002%.

La prueba de LBB evidenció la presencia de dióxido de manganeso; para ello se agregó de una a tres gotas del reactivo directamente a una colonia de 15 días de edad, incubada a 30 C, se apreciaron los precipitados azules sobre la colonia cuando la prueba de LBB fue positiva y se uso control medio "K" sin la fuente de manganeso (vease Apéndice).

#### 3.4 RESULTADOS Y DISCUSION.

Se han aislado y caracterizado cuatro cepas puras de las especies Bacillus licheniformis y Bacillus brevis.

La cepa CHN-36-80-L presenta una colonia de forma filamentososa, margen ramificado, elevación montuosa y se adhiere fuertemente a la superficie del agar cuando se cultiva en medio "K" y acetato de manganeso (vease Figuras 3.2 A).

La morfología celular corresponde a bacilos de 2.5 a 3.5 micras de largo x 0.8 micras de diámetro, móviles, Gram positivos, permanecen como células vegetativas durante las primeras 48 horas de crecimiento a 30 C en los medios antes citados. Son bacilos formadores de endosporas ovales o cilíndricas, con posición subterminal dominante y no deforman el

/ esporangio (véase Figura 3.3 ). En medio "K" líquido se muestran altamente polimórficas.

Las características bioquímicas y fisiológicas (véase Tabla 3.1) indican que esta cepa corresponde a la especie B. licheniformis. La cepa presenta capacidad diferencial para oxidar manganeso divalente determinada con base en la prueba de LBB (véase Tabla 3.3).

Las cepas CHN-36-80-G y P2-V-83-2 obtenidas de diferentes áreas geográficas son prácticamente idénticas, su colonia es filamentososa, ramificada, y montuosa, pero a diferencia de la anterior ésta se retira con facilidad del agar (véase Figura 3.2 B). La morfología celular es muy parecida a la de la cepa antes descrita; sin embargo, los filamentos son de mayor longitud cuando se desarrollan en los medios antes citados (véase Figura 3.4). Estas cepas también corresponden a la especie B. licheniformis. A nivel bioquímico tienen algunas diferencias cuando se comparan con la cepa anterior (véase Tabla 3.2).

La morfología colonial distintiva de las cepas de la especie B. licheniformis y su capacidad diferencial para oxidar el manganeso divalente, son sugestivas para comprender la conservación de las células procariontes como microfósiles del pre-Fanerozoico.

El conocimiento de los ciclos de vida, patrones de división celular y de diagénesis de estas células son necesarios

Figura 3.2. Morfología colonial de las cepas:

A) CHN-36-80-L

B) CHN-36-80-B

Crecidas en medio "K" a 30 C durante 48 horas. Aumento 16 X.

Figura 3.3. Morfología celular de la cepa CHN-36-80-L. Aumento 100 X.

Figura 3.4. Morfología celular de la cepa CHN-36-80-B. Aumento 100 X.

Figura 3.5. Morfología celular de la cepa P2-V-83-3.

A) Bacilos con endosporas. Aumento 100 X.

B) Agregados de esporas libres con óxidos de manganeso. Aumento 100 X.



Figura 3.2. A

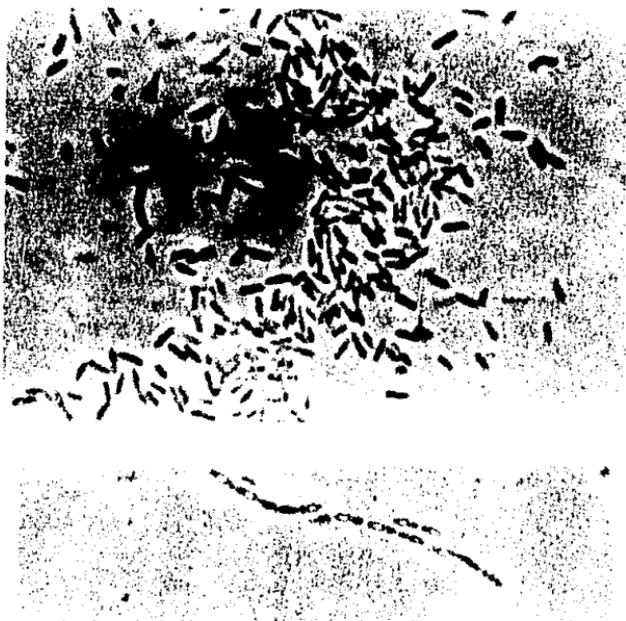


Figura 3.3



Figura 3.2 B.

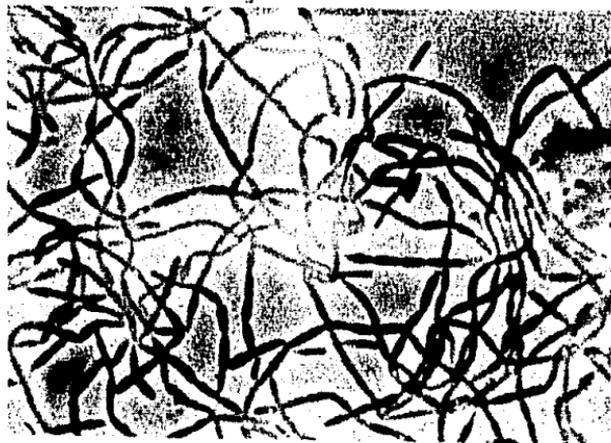


Figura 3.4



Figura 3.5 A.



Figura 3.5 B

de tomar en cuenta para la reinterpretación de los microfósiles preservados en pedernal y los estromatolitos con matrices minerales de óxido de sílice.

Ante lo antes señalado se postula, en esta tesis, que las cepas descritas son análogos modernos de los microfósiles del género Eoastrion, que se ha comparado con una asociación simbiótica de bacterias modernas del género Metallogenium (Zavarzin, 1981). También presentan una gran similitud morfológica con otro microfósil recientemente descrito (Awramik y col., 1983), referido como Warrownella radia (véase Figura 3.6).

La cepa P2-V-83-3 a las 48 horas de crecimiento presenta una colonia de forma circular, con un margen entero, es elevada y se retira con facilidad del agar, además de que estas colonias se caracterizan por desarrollar un color pardo intenso lo que indica la presencia de precipitados de dióxido de manganeso, después de quince días de crecimiento en medio "K" e incubadas a 30 C.

En medio con acetato de manganeso al 0.002% las colonias son de forma irregular, margen filamentoso, elevación montuosa y se pueden retirar con facilidad del agar.

Las colonias de 48 horas de edad en los medios antes citados, están constituidas por células en forma de bacilo, móviles, coloración al Gram variable, de 3.5 a 5.0 micras de longitud y 1.0 micra de diámetro, para este tiempo ya se ob-

TABLA 3.1. CARACTERISTICAS COMPARATIVAS DE LAS CEPAS CHN 36-80-L CHN 36-80-G, P2-Y-83-2, Bacillus licheniformis y B. subtilis e 6051 ATCC

PRUEBAS	CHN 36-80-L	CHN 36-80-G	P2-Y-83-2	<u>B. licheniformis</u>	<u>B. subtilis</u> e 6051 ATCC
Colonias adheridas	+	-	-	V	-
Forma de la espora	E	E	E	E	E
Deformación del esporangio	-	-	-	-	-
Posición de la espora	T	T	T	C	C
Acido de D-glucosa M-1	+	+	+	+	+
Gas de D-glucosa M-2	V	V	V	V	-
Producción de acetofina M-3	+	+	+	+	+
Hidrólisis de:					
almidón	+	+	+	+	+
gelatina	V	-	-	+	+
caseína	+	+	+	+	+
Desarrollo en agar anaeróbico	+	+	+	+	-
Producción de alcalí en citrato	+	-	-	+	+
Desarrollo en agar nutritivo con NaCl al 7%	+	+	+	+	+
Desarrollo a 50-55°C	+	+	+	+	+

V = variable, E = elíptica o cilíndrica, T = terminal a subterminal, C = central

Las características del B. licheniformis fueron tomadas de Buchanan y Gibbons, 1974.

TABLA 3.2. CARACTERISTICAS COMPARATIVAS DE LA CEPA P2-V-83-3 B. brevis y B. subtilis e  
6051 ATCC

PRUEBAS	P2-V-83-3	<u>B. brevis</u>	<u>B. subtilis</u> e 6051 ATCC
Forma de la espora	E	E	E
Deformación del esporángio	+	+	-
Posición de la espora	CT	CT	C
Acido de D-glucosa M-1	-	+/-	+
Producción de acetoina M-3	-	-	+
Hidrólisis:			
almidón	-	-	+
gelatina	-	-	+
caseína	-	+	+
Desarrollo en agar anaeróbico	-	-	-
Producción de alcalí en citrato	-	-	+
Desarrollo en agar nutritivo con NaCl al 7%	?	-	+
Desarrollo a 55-60°C	+	+	-

E = elíptica o cilíndrica, CT = central a terminal, ? = sin determinar.

Las características del B. brevis fueron tomadas de Morris, y col., 1981 y de Buchanan y Gibbons, 1974.

TABLA 3.3 OXIDACION DEL MANGANESO DIVALENTE EN MEDIO K POR MIEMBROS DEL

GENERO Bacillus

PRUEBAS	CHN36-80-L	CHN36-80-G	P2-V-83-2	P2-V-83-3
Intensidad del color café pardo de las colonias en: Medio sin $MnSO_4$ $H_2O$	-	-	-	-
Medio K con $MnSO_4$ $H_2O$	-/+	-/++	-/++	+++
Prueba de la mancha azul LBB	-/+	-/++	-/++	+++

- = negativo, + = "ligeramente" positivo, ++ = "medianamente" positivo, +++ = "vigorosamente" positivo, -/+, -/++, -/+++ = negativo/diferentes grados de positividad.

Figura 3.6. Microfósiles pre-Fanerozoicos y sus posibles análogos de la especie *Bacillus licheniformis*.

A) Eoastrion. Aumento 25.5 X.

B) Warrawoonella radia. Barra 10 micra.

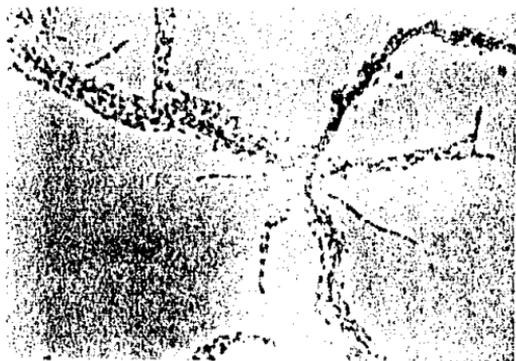
C) Cepa P2-V-83-2 i) y iii) Aumento de 40 X. ii) 20 X.



Figura 3.6. A.



Figura 3.6. C. ii



◇ Figura 3.6. C. i

Figura 3.6. R. ◇

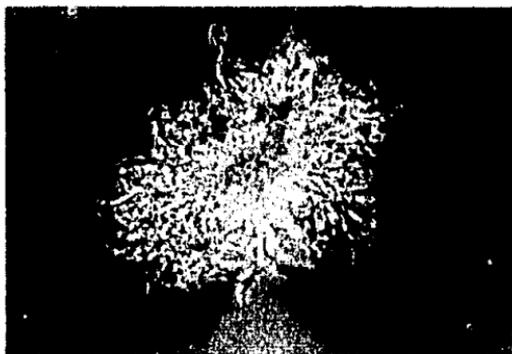
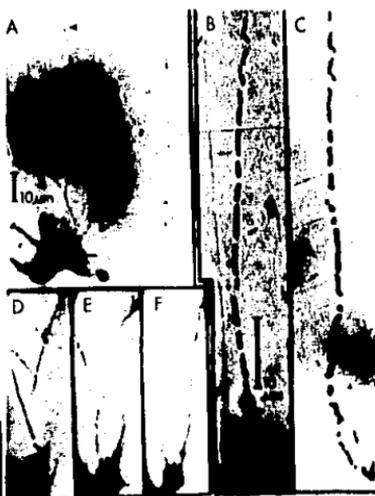


Figura 3.6. C. 111

servan bacilos con endosporas ovoides o cilíndricas, de posición central a terminal, que deforman el esporangio y que llegan a medir hasta 2.0 micras; las esporas libres tienden a formar agregados (véase Figura 3.5). En caldo "K" incubados en baño María de agitación a 30 C desarrollan su endospora a las 24 horas de crecimiento.

El resultado de las pruebas bioquímicas y fisiológicas ubican a esta cepa dentro de la especie Bacillus brevis (véase Tabla 3.2).

Esta cepa es muy vigorosa en su capacidad de oxidar manganeso y quizá esta actividad se deba a la acción de la superficie las esporas libres. La prueba de LBB es difícil de interpretar cuando las colonias presentan un exceso de dióxido de manganeso, para ello se tomó una colonia que se desintegra en un portaobjetos, se añade el reactivo LBB se evalúa bajo el microscopio, de donde se puede sugerir que son las envolturas de la spora las responsables del proceso de oxidación del manganeso divalente. Un caso semejante es el que se reporta para la cepa SG-1 (Nealson y Tebo, 1980), un bacilo de origen marino.

El encuentro de películas de óxidos de manganeso en las localidades geográficas de estudio y la capacidad de transformar in vitro el manganeso soluble en dióxido de manganeso por parte de las cepas aquí reportadas, permiten suponer que potencialmente tienen gran efecto sobre el ciclo local del

manganeso. Los estudios fisiológicos, bioquímicos y estructurales de las bacterias que oxidan manganeso son la base de los modelos a partir de los cuales se ha propuesto su papel en el ciclo biogeoquímico del manganeso.

El conocimiento de la estructura bacteriana y la tasa de producción de precipitados de óxidos de manganeso, es prerequisite para entender la acumulación de manganeso en la naturaleza, como es el caso de los fondos marinos que se localizan en el área 21 grados norte al sur de la península de Baja California, México, que es uno de los depósitos contemporáneos más importantes por su abundancia en cobre, hierro, manganeso, azufre etc. Sin embargo, la determinación del origen de los microfósiles, precipitados de manganeso fósil y depósitos minerales recientes no son fáciles de establecer.

Al respecto quedan por contestarse las siguientes preguntas:

- 1) ¿ Los precipitados de dióxido de manganeso son exclusivamente biogénicos ?
- 2) ¿ Son los precipitados de dióxido de manganeso, procedentes de bacterias, realmente singulares ?
- 3) ¿ Los precipitados que cubren a las bacterias pueden preservarse como microfósiles ?

### 3.5 APENDICE.

#### I. MEDIOS DE CULTIVO.

##### A. Agua de mar artificial (Margulis, L. y col. 1983).

CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	1.45 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	12.35 g
KCl	0.75 g
NaCl	35.10 g
Agua destilada	950.00 ml
Amortiguador Tris 1.0 M	50.00 ml

Adicione las sales en el orden dado, disolviendo cada una antes de añadir la siguiente. Dejar reposar la mezcla al menos 24 horas antes de usarse.

##### B. Amortiguador Tris 1.0 M

HCl 37 % fumante	33.3 ml
Tris hidroximetilaminometano o Trizma Base	60.55 g

Aforar a 500 ml con agua destilada, ajustar el pH = 7.5.  
Almacenar a 4 C.

##### C. Medio "K" (Krumbein) Margulis, L. y col., 1983.

MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.07 g
Bacto-peptona (Difco)	1.00 g
Extracto de levadura (Difco)	0.25 g
Bacto-Agar (Difco)	7.50 g
Agua de mar artificial	500.00 ml

##### D. Medio acetato de manganeso 0.002%.

Acetato de manganeso Mn(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	
Fisher Scientific Co.	0.01 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.01%	1.00 ml
Bacto-Agar (Difco)	7.50 g
Agua de mar artificial	500.00 ml

II. PRUEBA DE LA MANCHA AZUL DE LUCOBERBELINA LBB (Krumbein Altman, 1973), PARA LA DETECCION DE OXIDOS DE MANGANESO.

Solución madre: Disolver 4.0 g de azul de leucoberbelina I en 80.0 ml de agua destilada hervida (previo a la ebullición del agua esta es acidificada con ácido fosfórico). Añadir 0.3 ml de hidróxido de amonio concentrado y aforar a 100 ml con agua destilada. (Esta solución madre puede ser almacenada por más de un año).

Solución para la prueba de LBB: Preparar una solución de LBB al 0.4 % con una solución de ácido acético al 0.85 % v/v (pH= 4.0), para ser usada inmediatamente.

### 3.6 REFERENCIAS.

- ARCHIBALD, F. S. y FRIDDOVICH, I. 1981. Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. 145:442-451.
- ARCHIBALD, F. S. y FRIDDOVICH, I. 1982. Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. Arch. Biochem. Biophys. 215: 589-596.
- AWRAMIK, S. M. SCHOPF, J. W. y WALTER, M. R. 1983. Filamentous fossil bacteria from the Archean of West Australia. Precambrian Res. 20: 357-374.
- BUCHANAN, R. E. y GIBBONS, N. E. (Eds.) 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore, Eighth edition.
- CHAPNICK, S. D., MOORE, W. S. y NEALSON, K. H. 1982. Microbial mediate manganese oxidation in a freshwater lake. Limnol. Oceanogr. 27: 1004-1014.
- CHARNEY, J., FISHER, W. P. y HEGARTY, C. P. 1951. Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. J. Bacteriol. 62: 145-148.
- DUBINA, G. A., GORLENKO, V. M. y SULEIMANOV, Y. I. 1974. A study of microorganisms involved in circulation manganese, iron, and sulfur in Lake GekGel. Microbiology 42: 817-822.
- EHRlich, H. L. 1963. Bacteriology of manganese nodules. I. Bacterial action on manganese in nodule enrichments. Appl. Microbiol. 11: 15-19.
- EHRlich, H. L. 1968 a. Bacteriology of manganese nodules. II. Manganese oxidation by cell-free extract from a manganese nodule bacterium. Appl. Microbiol. 16: 197-202.
- EHRlich, H. L. 1968 b. Bacteriology of manganese nodules. III. Reduction MnO<sub>2</sub> by two strains of nodule bacteria. Appl. Microbiol. 16: 695-702.
- EHRlich, H. L. 1970. Bacteriology of manganese nodules. IV. Induction of an MnO<sub>2</sub> reductase system in marine *Bacillus*. Appl. Microbiol. 19: 966-972.
- EHRlich, H.L. 1971. Bacteriology of manganese nodules. V. Effect of hydrostatic pressure on bacterial oxidation of Mn<sup>++</sup> and reduction of MnO<sub>2</sub>. Appl. Microbiol. 21: 306-310.

EHRlich, H. L. 1980. Different forms of microbial manganese oxidation and reduction and their environmental significance. En Biochemistry of ancient and modern environments. Eds. P. A. Trudinger M. R. Walter. Springer-Verlag, Berlin: 327-322.

GHIORSE, W. C. y CHAPNICK, S. D. 1983. Metal-depositing bacteria and the distribution manganese and iron in swamp waters. En Environmental Biogeochemistry. Ed. R. Hallberg. Ecol. Bull. (Stockholm) 35: 367-376.

GREGORY, E. y STALEY, J. T. 1982. Widespread distribution of ability to oxidize manganese among freshwater bacteria. Appl. Environmental Microbiol. 44: 509-511.

KRUMBEIN, W. E. 1971. Manganese-oxidizing fungi and bacteria in recent shelf sediments of the Bay of Biscay and the North Sea. Naturwissenschaften. 58: 56-57.

KRUMBEIN, W. E. y ALTMAN A. J. 1973. A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms. Helgol. Wiss. Meeresunters., 25: 347-356. MARGULIS,

MARGULIS, L. GROSOVSKY, B. D. STOLZ, J. F. GONG COLLINS, B. J. LENK, S. y LOPEZ-CORTES, A. 1983. Distinctive microbial structures and the pre-Phanerozoic fossil record. Precambrian Res. 20: 443-447.

NEALSON, K. H. 1978. The isolation and characterization of marine bacteria which catalyze manganese oxidation. En Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology. Ed. W. E. Krumbein, Vol. 3. Ann Arbor Science. Ann Arbor, Mich. 847-858.

NEALSON, K. H. y TEBO, D. 1980. Structural features of manganese precipitating bacteria. Origins of Life. 10: 117-126.

NEALSON, K. H. 1983. The microbial manganese cycle. En Microbial geochemistry. Ed. W. E. Krumbein, Blackwell Mosby Book, St Louis, Missouri.

NORRIS, J. R., BERKELEY, R. C. W., LOGAN, N. A. y O'DONNELL, A. G. 1981. The genera Bacillus and Sporolactobacillus. En The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Eds. M. P. Starr y col. Springer-Verlag, Berlin, 1712-1734.

SCHOPF, J. W. (Ed.). 1983. Earth's earliest biosphere. Its origin and evolution. Princeton University Press, New Jersey.

TEBO, B. 1983. The ecology and ultrastructure of marine manganese oxidizing bacteria. Thesis of Ph. D. University of California, San Diego.

ZAVARZIN, G. A. 1981. The genus Metallogenium. En The Prokaryotes. Eds. M. P. Starr y col., Springer Verlag, Berlin, 524-528.

## Capítulo 4. FIJACION DE NITROGENO ASOCIADA CON COMUNIDADES MICROBIANAS ESTRATIFICADAS DE GUERRERO NEGRO, BAJA CALIFORNIA SUR, MEXICO.

### 4.1 INTRODUCCION.

El programa "Planetary Biology Intern" organizado por el Marine Biological Laboratory de Woods Hole MA de los E.U.A., ha impulsado investigaciones relacionadas con la biosfera y sistemas biogeoquímicos específicos, tales al carbono, nitrógeno, oxígeno, manganeso, cobre y otros. Dichas investigaciones no sólo tratan de aclarar la historia de los ecosistemas sino también pueden ser la clave del futuro, en cuanto a la solución de problemas relacionados con energéticos, alimentos y salud.

El objetivo general del proyecto consiste en determinar el origen, evolución y distribución de la vida en el sistema solar (NASA TM 88177).

El conocimiento de la participación de las comunidades microbianas estratificadas provenientes de ecosistemas hipersalinos en el ciclo del nitrógeno no solo responde a las necesidades de los E.U.A., en terminos de la carrera armamentista, sino también a las de nuestro país, tal es el caso de la producción de proteína unicelular de origen procarionte, la selección de cianobacterias fijadoras de nitrógeno molecular y halofílicas con el fin de desarrollar una biotecnología

basada en procariontes provenientes de ecosistemas hipersalinos, del cual México posee una de las regiones productoras de sal más importantes del mundo.

En este capítulo se dan a conocer las técnicas usuales relacionadas con la determinación indirecta de la fijación de nitrógeno por parte de comunidades microbianas estratificadas obtenidas de Guerrero Negro Baja California Sur, México. Estos ecosistemas microbianos están limitados en extensión geográfica y son biológicamente notables por la ausencia de la mayoría de los organismos que figuran prominentemente en el presente (Knoll, 1985).

Ecosistemas laminados similares se encuentran en el lago hipersalino "Solar Lake" localizado en Arabia (Jorgensen y col., 1979), "Bavish Sabkha" en Israel (Krumbein col., 1979), y la "Laguna Figueroa" en México (Horodyski y col., 1977).

Investigaciones relacionadas con estos organosedimentos laminados sugieren que estos ecosistemas probablemente representan análogos contemporáneos de litologías del pre-Fanerozoico (Margulis y col., 1980).

Las comunidades microbianas estratificadas de Guerrero Negro, fueron inicialmente descritas por Javor (1979); esta localidad está situada en la costa oeste de Baja California como una gran planicie evaporítica cuya morfología es muy semejante a las de Sabkha Faishakh (oeste de Qatar), Medio Oriente, de igual manera que a las de el Golfo Arabe-Persa,

los sedimentos que se forman en el margen de la playa en estas salinas mexicanas son esencialmente calcáreos y en ellos se encuentran tapetes microbianos bien desarrollados (Pursen, 1985). El yeso, proviene de las salinas, resultado de la alta salinidad intersticial que es consecuencia de la evaporación capilar.

Las comunidades microbianas estratificadas de las salinas de trabajo de Guerrero Negro alcanzan concentraciones de sales que oscilan entre 5.0 y 13.0 %. Los principales productores primarios que constituyen el tapete de la localidad denominada "Charco # 5" son cianobacterias del tipo Microcoleus y Oscillatoria, con una salinidad del 5.0 al 7.0 % y Aphanot-  
hece, una cianobacteria, del "Charco # 8" con una salinidad del 9.0 al 13.0% (Des Marais, 1986).

Solo están disponibles unos pocos reportes sobre fijación de nitrógeno atmosférico asociada a tapetes microbianos (Potts y col., 1978; Stal y col., 1984; 1985).

La validez del ensayo de la técnica de reducción de acetileno puede ser puesta en duda cuando se estudian ciertos ambientes anaerobios, particularmente aquellos cuyas comunidades bacterianas usan metano y otros hidrocarburos de cadena corta (Drenland y Taylor, 1975; de Bont y Mulder, 1976). Sin embargo, en el presente estudio se cuantificó la tasa de reducción de acetileno bajo condiciones de luz y oscuridad, con la intención de conocer cuál es el efecto de los fotones en la actividad de la nitrogenasa.

La actividad de la nitrogenasa depende de un sistema de control que no es general en todos los procariontes fijadores de nitrógeno atmosférico. Resultados concernientes a la inhibición de la nitrogenasa por retroalimentación con amoníaco han sido conflictivos. La adición de amoníaco no provoca una inhibición por retroalimentación sobre la actividad de reducción del acetileno por Clostridium pasteurianum. (Daesch y Mortenson, 1972). Sin embargo, la adición de amoníaco a cultivos de Rhodospirillum rubrum causa un decremento rápido de la actividad de reducción del acetileno en etileno (Neilson y Nordlund, 1975). En los ecosistemas microbianos estratificados es común encontrar una gran diversidad de células procariontes fijadores de nitrógeno atmosférico, razón por la cual se evaluó la actividad de nitrogenasa y su inhibición.

Finalmente se analizó las concentraciones de amoníaco, nitritos y nitratos del agua de los "Charcos # 5 y # 8".

#### 4.2 MATERIALES Y METODOS.

##### ACTIVIDAD DE LA NITROGENASA.

Esta actividad fue medida por medio de la prueba de reducción del acetileno (Gordon, 1981). Las muestras de comunidades microbianas estratificadas fueron colocadas en botellas de 485 ml de capacidad. Se adicionó un volumen de 200 ml de agua a cada botella procedente de los "Charcos # 5 y # 8". En unos frascos se añadió 20 ml de acetileno obtenido a par-

tir de carburo de calcio (Fisher Sci. Co. C-57). Otros frascos fueron complementados con 2.0 ml de etileno y finalmente otros de control sin acetileno ni etileno.

Las determinaciones de la actividad de nitrogenasa se llevaron al cabo bajo diferentes condiciones de incubación: 10% de acetileno/luz, 1% de etileno/luz, sin acetileno/luz, 10% de acetileno/obscuridad, 1% de etileno/obscuridad y sin acetileno/obscuridad. Las botellas fueron incubadas en el invernadero bajo un ciclo natural de iluminación a 24 C y otras botellas permanecieron cubiertas con papel aluminio. Para evaluar el efecto del amoniaco sobre la reducción del acetileno, se adicionó 400 microlitros de una solución de sulfato de amonio 0.0005 M a un lote de botellas que contenían 10% de acetileno, que fueron incubadas en la luz y la obscuridad. Otros frascos contenían 10% de acetileno sin sulfato de amonio, los que funcionaron como controles.

#### CROMATOGRAFIA DE GASES.

La producción de etileno a partir de acetileno fue evaluada con la ayuda de un cromatografo de gases modelo Perkin Elmer Sigma 3, que posee un detector de ionización de flama de hidrógeno y un sistema de proceso de datos Shimadzu C-R3A. Se usó una columna de acero de 6 pies de longitud, empacada con Poropak N intervalo de abertura 80/100. El equipo mantenía constante su temperatura (isoterma de 100 C) a lo largo del inyector, columna y detector. El helio fue usado como el gas acarreador a una tasa de flujo de 30 ml/min. La tasa de

flujo del hidrógeno y del aire en el detector fue de 60 ml/min y 450 ml/min respectivamente. El cromatografo de gases fue calibrado con el gas estándar de etileno de 984.4 y 106.3 ppm (Scott Specialty Gases, E.U.A.). Para llevar a cabo los análisis se empleó 1.0 ml de muestra proveniente de los gases estándar y de las botellas.

#### ANALISIS COLORIMETRICO DEL AGUA.

Para remover los cationes que interfieren en el análisis de las muestras de agua de los "Charcos # 5 y # 8" se empleó la técnica modificada de Nessler (Hanson y Phillips, 1981). Se cuantificó la concentración de amoniaco por el método colorimétrico reportado por Verdow y col., (1978) y para nitratos y nitritos se uso una modificación de la técnica de Nicholas y Nanson, (1957).

#### 4.3 RESULTADOS Y DISCUSION.

##### ACTIVIDAD DE NITROGENASA.

A partir de los cromatogramas se obtuvieron los datos que se emplearon para elaborar las Figuras 1.1 a 1.8 y 2.1 a 2.10, que corresponden a la acumulación de etileno con respecto al tiempo en horas.

La tasa promedio de producción de etileno en ppm/cm<sup>2</sup>/hr de los "Charcos # 5 y # 8" se estableció tomando en cuenta el comportamiento lineal de cada una de las gráficas, (véase Figuras 1.1 a 1.8 y 2.1 a 2.10), obteniéndose así los resulta-

dos que se muestran en la Tabla 4.1.

Con el fin de transformar los valores de la tasa promedio de producción de etileno en unidades de fijación de nitrógeno atmosférico se usó un factor numérico de conversión (vease Figura 4.1).

Se requieren de dos electrones para reducir el acetileno en etileno y seis para la reducción del nitrógeno molecular en amoníaco. Esta relación ha persuadido a muchos autores para adoptar el factor de conversión teórico de un tercio de nitrógeno molecular reducido por acetileno reducido. Sin embargo, la determinación experimental de los factores parecen variar entre diferentes sistemas experimentales de donde ha resultado un intervalo de factores entre 2 y 25.

Para medir la tasa de fijación de nitrógeno atmosférico se adoptó el factor numérico de conversión de 5.4 empleado en trabajos previos para comunidades microbianas estratificadas.

Una vez obtenidos los valores promedio de la fijación de nitrógeno molecular, se procedió a la conversión de unidades en ppm/cm<sup>2</sup>/hr por g/Ha/año (vease Tabla 4.2).

La comparación de los valores de fijación biológica de nitrógeno atmosférico de este trabajo (1.22 a 23.30 g N/Ha/año) con los reportados por Stal y col., 1984, (8,000 a 1,300 g N/Ha/año), indican que las comunidades microbianas de Guerrero Negro llevan a cabo fijación de nitrógeno dos órdenes de magnitud menos que lo reportado para los tapetes microbianos del Mar del Norte.

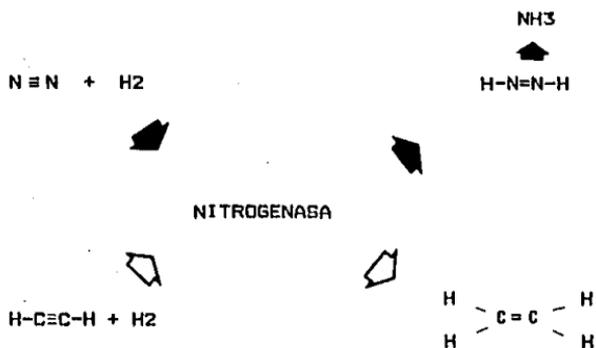
TABLA 4.1. TASA PROMEDIO DE PRODUCCION DE ETILENO ppm/cm2/hr.

---

CONDICIONES DE INCUBACION	"Charco # 5"	"Charco # 8"
10 % acetileno-luz	0.0627	0.0315
10 % acetileno-obscuridad	0.0510	0.0240

---

### FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO



REDUCCION DEL ACETILENO PARA EVALUAR  
LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO

Figura 4.1. Diagrama de la actividad de la nitrogenasa sobre nitrógeno molecular y acetileno.

TABLA 4.2. TASA PROMEDIO DE FIJACION DE N<sub>2</sub> g/Ha/año.

CONDICIONES DE INCUBACION	"Charco # 5"	"Charco # 8"
10 % acetileno-luz	3.69	1.86
10 % acetileno-obscuridad	3.00	1.40

Como se ha discutido en trabajos previos, existen varias fuentes de error en el uso de los factores de conversión directos o teóricos empleados en la transformación de los datos de la reducción del acetileno en valores que corresponden a la fijación de nitrógeno atmosférico. Esta inconveniencia se incrementa aún más en sedimentos que presentan potenciales de oxidación-reducción menores que cero y quizá son algunas de las explicaciones referentes a los bajos valores de fijación de nitrógeno reportados en esta tesis.

Los resultados de las Tablas 4.2 y 4.4 indican que el "Charco 5" es más eficiente que el "Charco 8" en relación a la actividad de la nitrogenasa y parece ser debido al contenido microbiano. El principal productor primario en el "Charco 5" es una cianobacteria sin heterocistos del género Oscillatoria, que se sabe es capaz de fijar nitrógeno atmosférico, mientras que en el "Charco 8" no existen productores primarios oxigénicos abundantes fijadores de nitrógeno de donde se supone que la actividad de la nitrogenasa no se limita a la capa superficial también esta representada por bacterias fototróficas anoxigénicas, quimiolitioautotróficas y heterótrofas de las capas inferiores en ambas localidades. Este planteamiento se ve apoyado por los experimentos de luz-obscuridad, sin embargo puede notarse que la luz estimula favorablemente la actividad de la nitrogenasa, esta última afirmación coincide con los resultados reportados por Stal y col., 1984.

TABLA 4.3. TASA PROMEDIO DE PRODUCCION DE ETILENO ppm/cm<sup>2</sup>/hr.  
 Efecto de 100 nanomoles de amoniaco.

CONDICIONES DE INCUBACION	"Charco # 5"	"Charco # 8"
Control: sin amoniaco	0.340	0.044
10 % acetileno-luz	0.395	0.043
10 % acetileno-obscuridad	0.130	0.021

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 4.4. TASA PROMEDIO DE FIJACION DE N<sub>2</sub> g/Ha/año.

Efecto de 100 nanomoles de amoniaco.

CONDICIONES DE INCUBACION	"Charco # 5"	"Charco # 8"
Control-sin amoniaco	20.00	2.60
10 % acetileno-luz	23.30	2.40
10 % acetileno-obscuridad	7.60	1.22

Los resultados de este trabajo evidencian las interferencias debidas a la presencia bacterias que oxidan hidrocarburos. Por esta razón la actividad de la nitrogenasa no debe ser medida a partir de la prueba de reducción del acetileno cuando se trabaja con muestras que proceden de sedimentos semi-aeróbicos o anaeróbicos, debido a que el acetileno modifica otras actividades metabólicas del sistema en estudio; un caso particular es el bloqueo de la oxidación de metano, la cual provee de energía y poder de reducción necesarios para la actividad de la nitrogenasa (de Bont y Mulder, 1976), por otra parte, el acetileno presenta una gran solubilidad en agua y reprime la producción de hidrógeno (Hardy y col., 1971). El etileno puede ser inestable durante la investigación debido a la presencia bacterias que oxidan este hidrocarburo (de Bont y Mulder, 1976). Por estas razones la actividad de la nitrogenasa debe ser medida con nitrógeno molecular radioactivo. En particular, es conveniente emplear simultáneamente las pruebas de reducción de nitrógeno molecular radioactivo a amoníaco y del acetileno a etileno (Potts y col., 1978; Stal y col., 1984).

La prueba de reducción del acetileno en muestras de comunidades microbianas estableció que la actividad de reducción del acetileno no fue afectada por la presencia 100 nanomoles de sulfato de amonio (vease Tablas 3 y 4); estos resul-

tados pueden ser debidos a la gran diversidad de procariontes fijadores de nitrógeno atmosférico presentes en el tapete microbiano; tal es el caso de las cianobacterias, bacterias fototróficas anoxigénicas, quimiolitautotróficas y heterótrofas, en otras palabras, los sistemas de fijación de nitrógeno molecular de cada uno de los grupos de microorganismos mencionados arriba, operan bajo diferentes sistemas de regulación (Daesch y Mortenson, 1972; Neilson Norlund, 1975).

El hecho de que existan fijadores de nitrógeno atmosférico diferentes a las cianobacterias y de que la actividad de la nitrogenasa sea más eficiente en ambientes anaerobios permiten suponer que durante el pre-Fanerozoico esta vía metabólica no solo estuvo representada en las cianobacterias con heterocistos, donde aquellos procariontes ancestrales capaces de llevar a cabo este proceso tuvieron una ventaja ecológica distintiva sobre sus competidores.

El conocimiento de las tasas de fijación biológica de nitrógeno molecular han permitido suponer que el nitrógeno de la atmósfera podría ser agotado en menos de 100 millones de años, así quizá la fijación de nitrógeno y la desnitrificación posiblemente evolucionaron durante el Arqueano.

#### ANALISIS COLORIMETRICO DEL AGUA.

El estudio colorimétrico del agua de las salinas mostró que contiene solo cantidades traza de los compuestos del nitrógeno. La concentración de amoníaco del "Charco # 5" fue de

2.0 g N/lit y de 4.1 g N/lit para el "Charco # 8". La concentración de nitratos y nitritos estuvo cinco y siete veces por debajo de la concentración de amoníaco por lo que no fue posible su cuantificación precisa.

Así el amoníaco es la forma dominante de los compuestos del nitrógeno en el agua de las salinas y posiblemente es el resultado de la actividad desnitrificante y de la nitrogenasa.

Estampas concientes de que este trabajo corresponde a una etapa inicial en el conocimiento de los estromatolitos potenciales, sugiriéndose para el futuro lo siguiente:

- 1) Para evaluar la actividad de la nitrogenasa en comunidades microbianas estratificadas deben emplearse simultáneamente los ensayos de reducción del nitrógeno molecular radioactivo y del acetileno (Potts y col., 1978; Stal y col., 1984).
- 2) Llevar a cabo el aislamiento de la mayoría de los microorganismos involucrados en la fijación de nitrógeno atmosférico para más tarde someterlos a las pruebas simultáneas antes mencionadas y compararlos con los valores aquí reportados.
- 3) Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de amoníaco sobre la actividad de la nitrogenasa empleando muestras de tapetes microbianos y cultivos puros.

FIGURA 1.1 "CHARCO No.5"  
10% DE ACETILENO-LUZ A

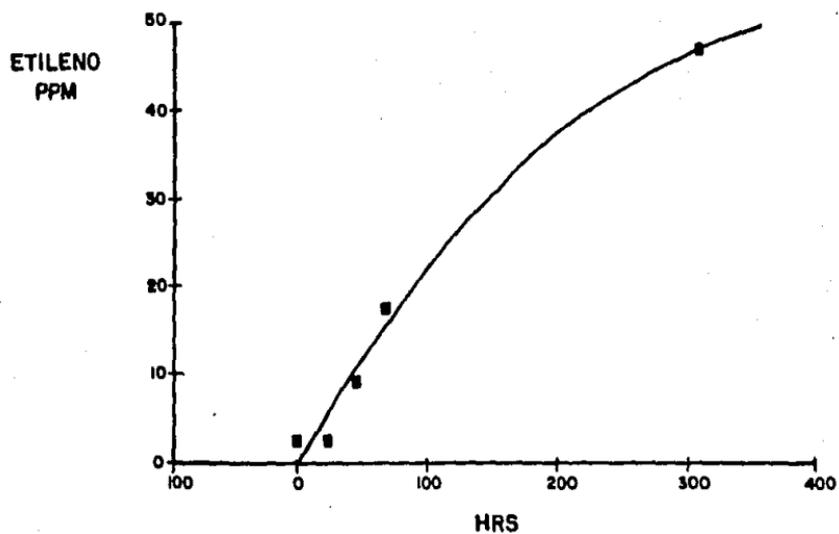


FIGURA 1.2 "CHARCO No.5"  
10% DE ACETILENO-LUZ B

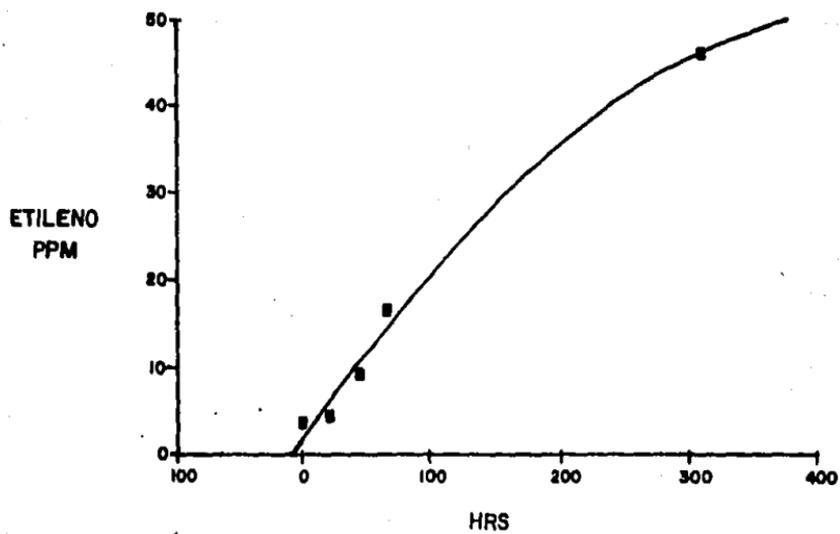


FIGURA 1.3 "CHARCO N.º 5"  
10% DE ACETILENO-OBSCURIDAD A

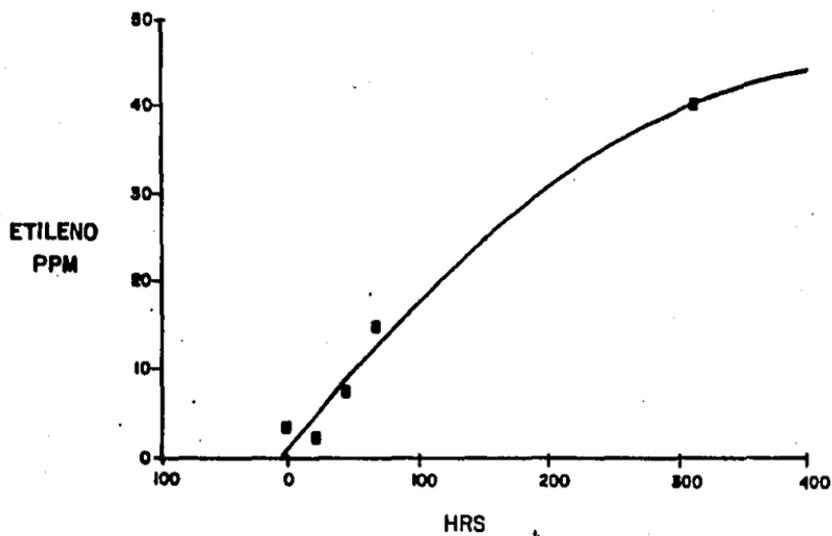


FIGURA 1.4 "CHARCO No. 5"  
10% DE ACETILENO-OBSCURIDAD B

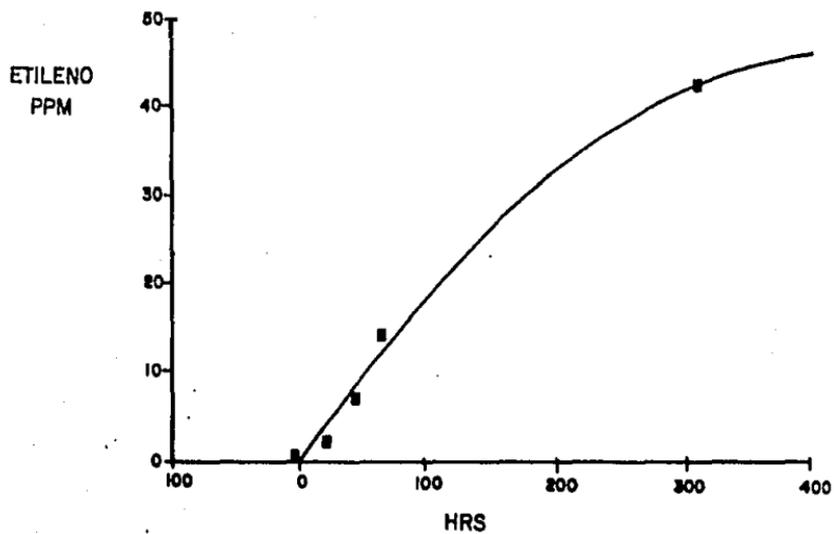


FIGURA 1.5 "CHARCO No.8"  
10% DE ACETILENO-LUZ A

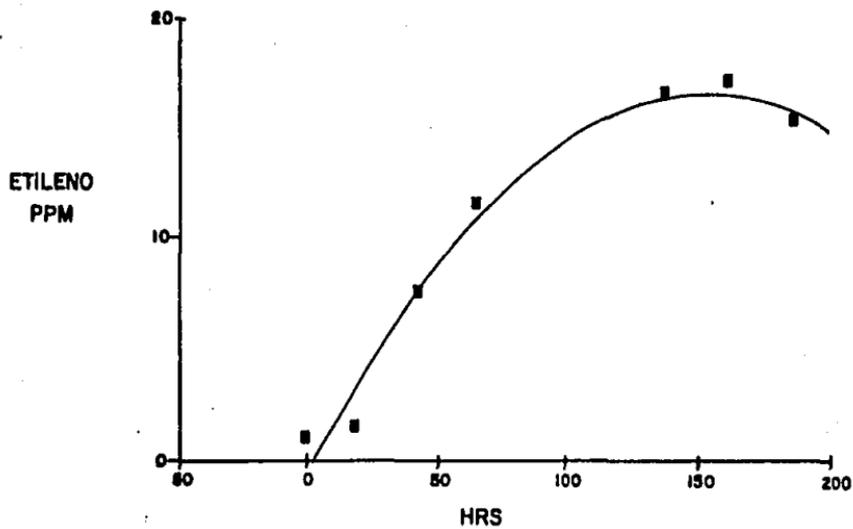


FIGURA 1.6 "CHARCO No. 8"  
10% DE ACETILENO-LUZ B

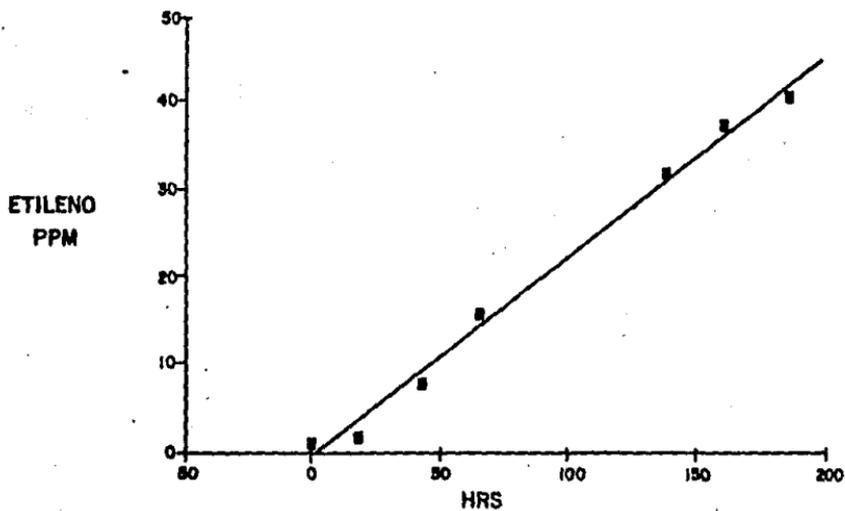


FIGURA 1.7 "CHARCO No.8"  
10% DE ACETILENO-OBSCURIDAD A

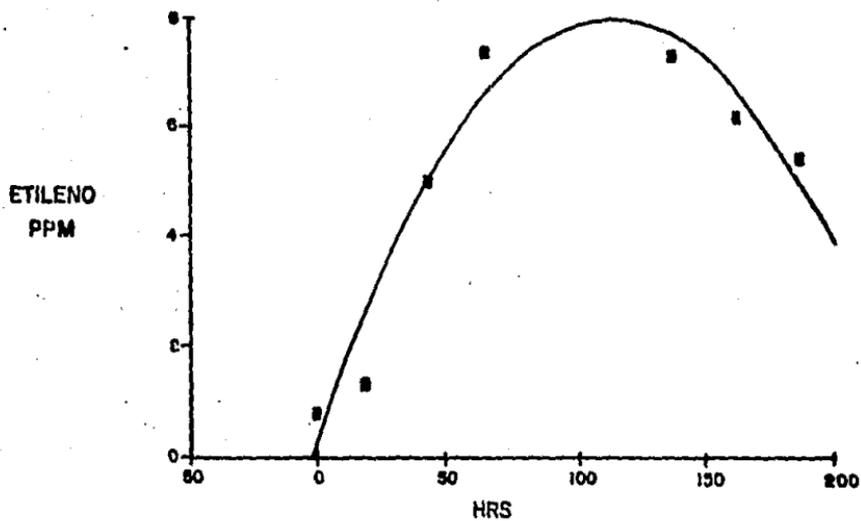


FIGURA 1.8 "CHARCO No. 8"  
10% DE ACETILENO-OBSCURIDAD 8

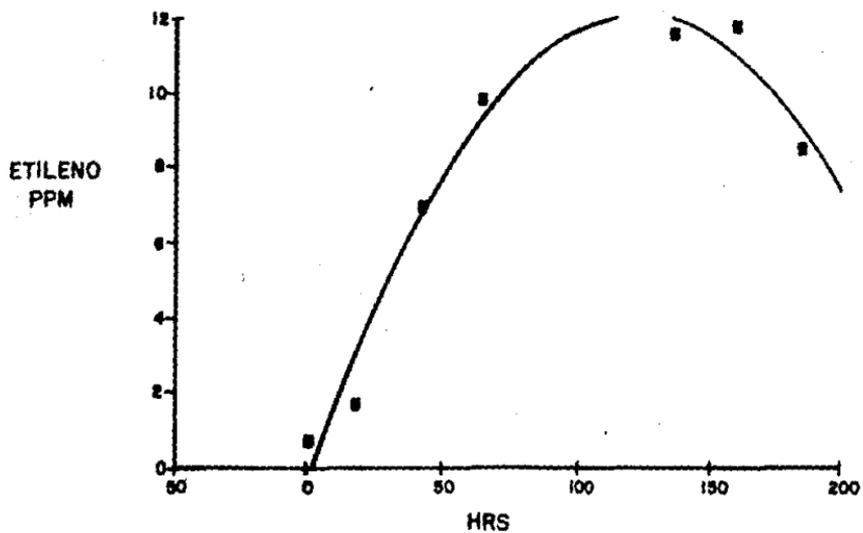


FIGURA 2.1 "CHARCO No.5"  
CONTROL-SIN AMONIACO-LUZ

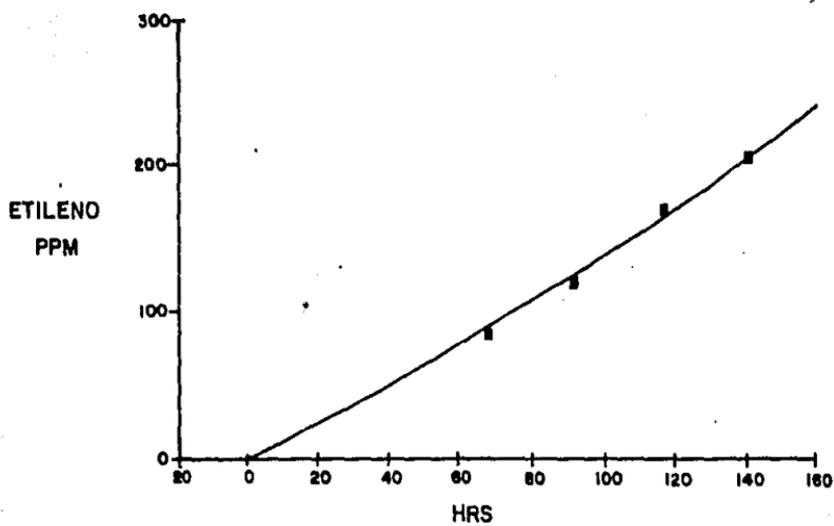


FIGURA 2.2 "CHARCO No.8"  
CONTROL-SIN AMONIACO-LUZ

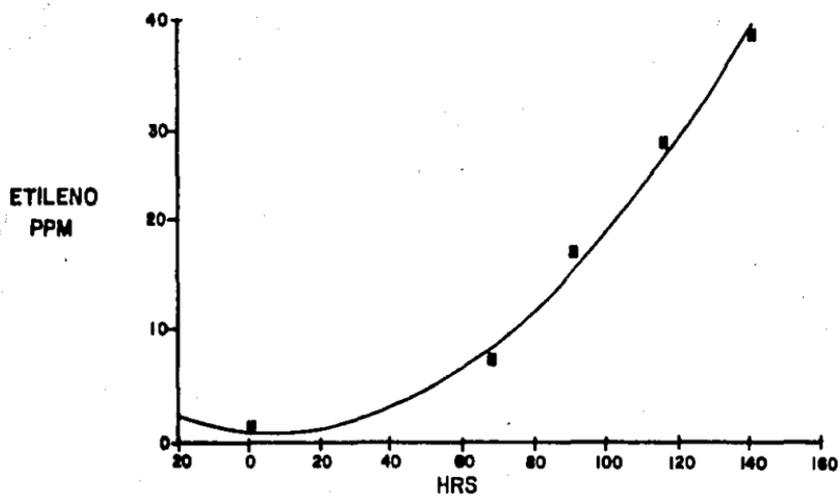


FIGURA 2.3 "CHARCO No.5"  
10% DE ACETILENO-LUZ A

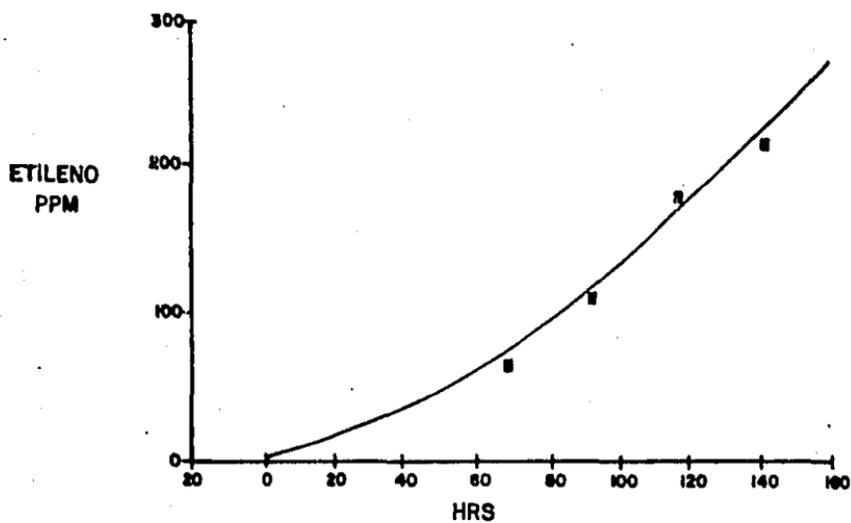


FIGURA 2.4 "CHARCO No.5"  
10% DE ACETILENO-LUZ B

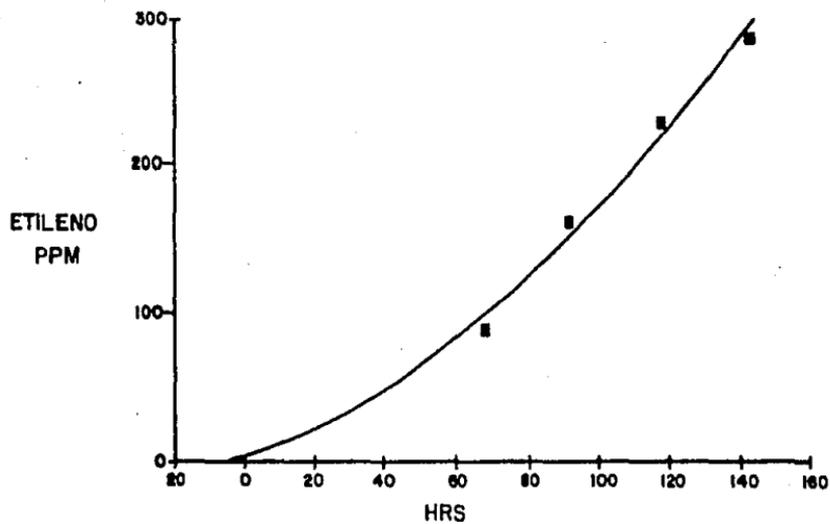


FIGURA 2.5 "CHARCO No. 8"  
10% DE ACETILENO-LUZ A

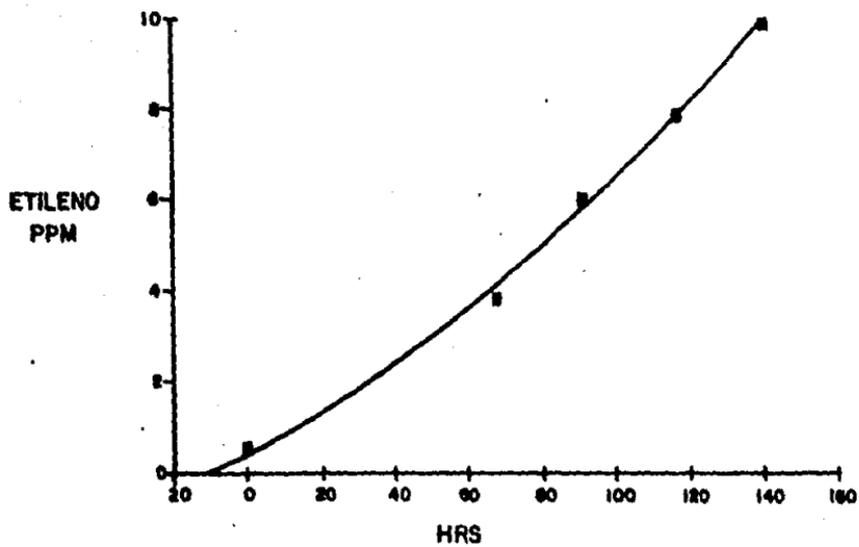


FIGURA 2.6 "CHARCO No.8"  
10% DE ACETILENO-LUZ B

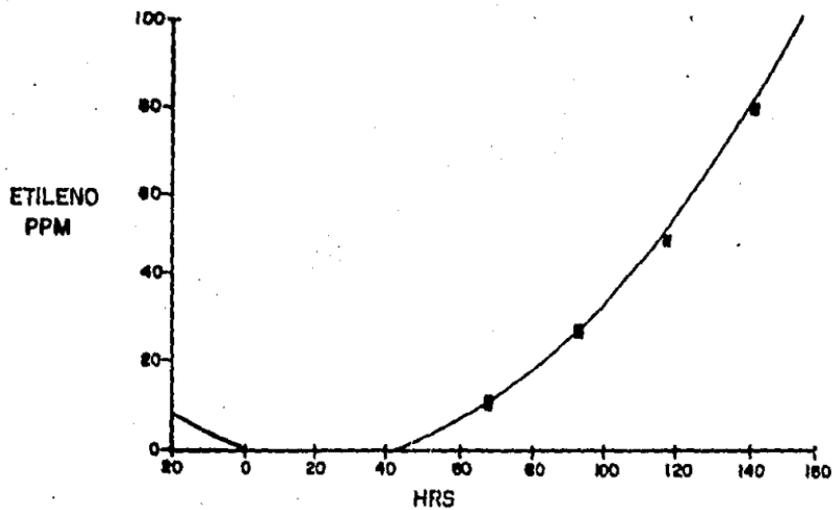


FIGURA 2.7 "CHARCO No.5"  
10% DE ACETILENO-OBSCURIDAD A

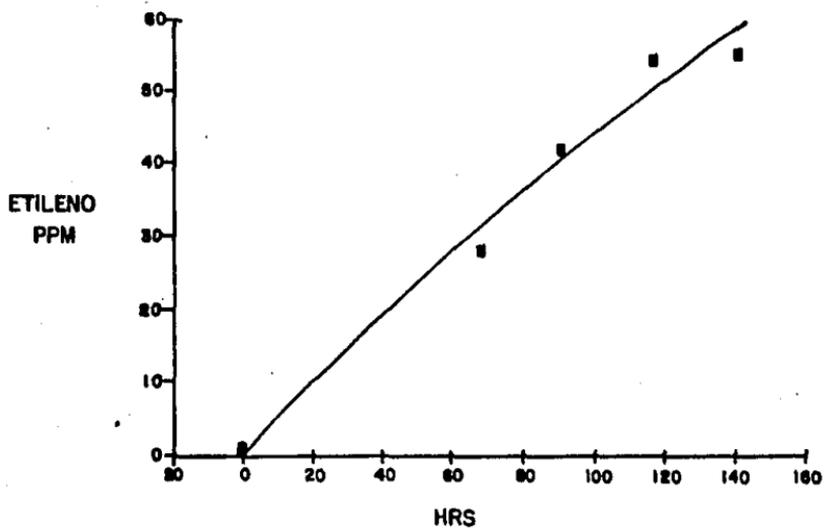


FIGURA 2.8 "CHARCO No.5"  
10% DE ACETILENO—OBSCURIDAD B

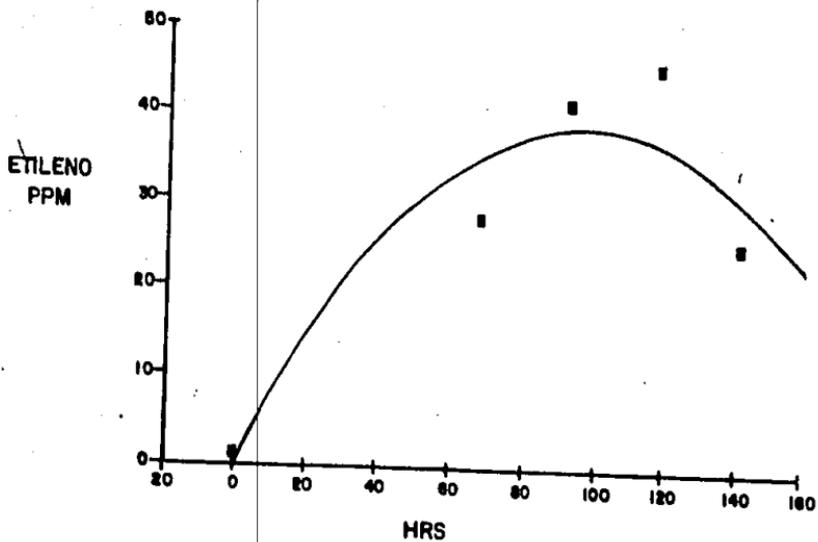


FIGURA 2.9 "CHARCO No. 8"  
10% DE ACETILENO—OSCURIDAD A

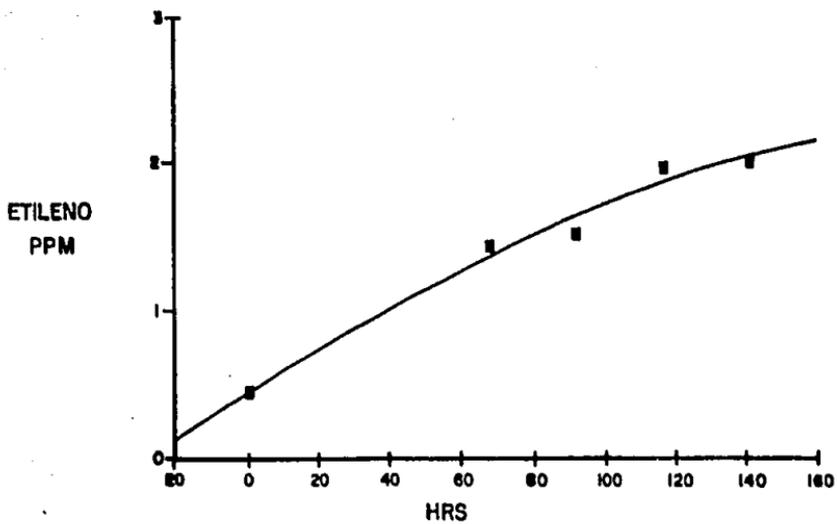
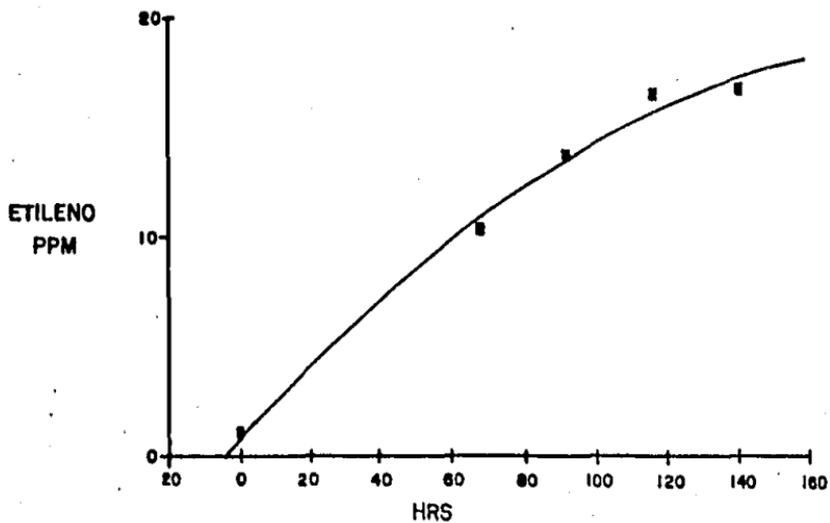


FIGURA 2.10 "CHARCO No.8"  
10% DE ACETILENO—OBSCURIDAD B



#### 4.5 REFERENCIAS.

- DAESCH, G. y MORTENSON, L. E. 1972. Effect of ammonia on synthesis and function of the N<sub>2</sub> fixing enzyme system in Clostridium pasteurianum. J. Bacteriology. 110 (1): 103-109.
- DE BONT, J. A. M. y MULDER, E. G. 1976. Invalidity of the acetylene reduction assay in alkane utilizing, nitrogen-fixing bacteria. Appl. Environm. Microbiol. 31 (5): 640-647.
- DES MARAIS, D. 1986. Carbon isotopic studies of microbial mats and stromatolites. The fifth ISSOL Meeting and The Eighth International Conference The Origin of Life. Abstracts. Berkeley, California.
- GORDON, J. K. 1981. Introduction to the nitrogen fixing prokaryotes. En The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. (Eds.). H. Starr y col., Springer-Verlag, Berlin.
- HANSON, R. S. y PHILLIPS, J. A. 1981. Chemical composition. En Manual of methods for general bacteriology. (Ed.). P. Gerhardt. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 20006.
- HARDY, R. W. F., BURNS, R. C. y PARSHALL, G. W. 1971. The biochemistry of nitrogen fixation. Adv. Chem. 100: 219-247.
- HORDYSKI, R. J., BLOESER, B. y VAN DER HAAR, S. P. 1977. Laminated algal mats from a coastal lagoon, Laguna Mormona, Baja California, Mexico. J. Sed. Petr. 47: 680-696.
- JAVOR, B. J. 1979. Ecology, physiology, and carbonate chemistry of blue-green algal mats, Laguna Guerrero Negro, Mexico, Ph D. Tesis, University of Oregon.
- JORGENSEN, B., RUSBECH, N. P., BLACKBURN, T. H. y COHEN, Y. 1979. Diurnal cycle of oxygen and sulfide microgradients and microbial photosynthesis in cyanobacterial mat sediment. Environ. Microbiol. 38: 46-58.
- KNOLL, A. 1985. A paleobiological perspectives on Sabkhas. En Hypersaline ecosystems. The Gavish Sabkha. (Eds.). G. M. Friedman y W. E. Krumbein, Springer-Verlag. Berlin.
- KRUMBEIN, W. E. 1979. Photolithotrophic and chemoorganotrophic activity of bacteria and algae as related to beach rock formation and degradation (Gulf of Agaba, Sinai). Geomicrobiol. J. 1: 139-203.

MARGULIS, L., BARGHOORN, E. S., ASHENDORF, D., BANERJEE, S., CHASE, D., FRANCIS, S., GIOVANNONI, S. y STOLZ, J. F. 1980. The microbial community in the layered sediments at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico: Does it have Precambrian analogues. *Precambrian Res.* 11: 93-123.

NASA. 1985. Life sciences accomplishments. National Aeronautics and Space Administration. Washington, D. C. 20546. Report # NASA TM- 88177.

NEILSON, A. H. y NORDLUND, B. 1975. Regulation of nitrogenase synthesis in intact cells of Rhodospirillum rubrum: Inactivation of nitrogen fixation by ammonia, L-glutamine and L-asparagine. *J. General Microbiol.* 91: 53-62.

NICHOLAS, D. J. D. y NANSON, A. 1957. Determination of nitrate and nitrite. En *Methods in enzymology*. (Eds.). S. P. Colowick y N. O. Kaplan. Vol. III. Academic Press Inc. Pub. New York.

DREMLAND, R. S. y TAYLOR, B. F. 1975. Inhibition of methanogenesis in marine sediments by acetylene: Validity of the acetylene reduction assay for anaerobic microcosms. *Appl. Microbiol.* 30: 707-709.

POTTS, M., KRUMBEIN, W. E. y METZGER, J. 1978. Nitrogen fixation rates in anaerobic sediments determined by acetylene reduction a new  $^{15}\text{N}$  field assay, and simultaneous total  $^{15}\text{N}$  determination. En *Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology. Methods, metal and assessment*. (Ed.). W. E. Krumbein, Vol. 3. Ann Arbor Science Pub. Inc. Ann Arbor, Mich.

PURSEN, D. H. 1985. Coastal evaporitic systems. En *Hypersaline ecosystems. The Gavish Sabkha*. (Eds.). G. M. Friedman y W. E. Krumbein. Springer-Verlag. Berlin.

STAL, L. J. GROSSBERG, S. y KRUMBEIN, W. E. 1984. Nitrogen fixation associated with the cyanobacterial mats of a marine laminated microbial ecosystems. *Mar. Biol.* 82: 217-224.

STAL, L. J., VAN GEMERDEN, H. y KRUMBEIN, W. E. 1985. Structure and development of a benthic microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31 (2): 11-126.

VERDOUW, H., VAN ECHTELD, C. J. A. y DEKKERS, E. M. J. 1978. Ammonia determination on indophenol formation sodium salicylate. *Water. Res.* 12: 399-402.

Una de las inquietudes de esta tesis fue discutir la validez de la hipótesis propuesta originalmente por Margulis y col. en 1980 (véase Capítulo 1). Al respecto y con base en la interpretación de los resultados de esta tesis considero que la hipótesis es válida en la medida de que son buenos modelos análogos y no homólogos de litologías del pre-Fanerozoico, debido a la existencia de algunos representantes de organismos multicelulares y de su desarrollo en una atmósfera actual oxidante, la que seguramente no existía en el Arqueano.

La microscopía confirma que las comunidades microbianas estratificadas reúnen las características del "síndrome de construcción del estromatolito", como son:

- a) El movimiento por deslizamiento de algunos procariontes, generalmente esta asociado a la presencia vainas, determinado en miembros de los géneros: Oscillatoria (puntas curvas), Microcoleus, Phormidium y Beggiatoa.
- b) La producción de vainas pigmentadas se detectó en cianobacterias por microscopía de contraste de fases.
- c) La producción de viscosidad por diferentes componentes de la comunidad microbiana fue demostrada por microscopía electrónica de barrido.
- d) En cuanto a la orientación de los filamentos, las observaciones de microscopía indican ser postrados sin haberse establecido para la comunidad microbiana su relación con los ciclos día-noche, estacionales, o quizá por aerotaxis.

e) La fototaxis no se pudo establecer por microscopía pero se conoce la existencia de dicha actividad en miembros procariontes reportados en esta tesis (López-Cortés, 1986 a).

Otro aspecto paleobiológico de la tesis se relaciona con los mecanismos que garantizan la preservación de las células procariontes como microfósiles.

Se pudo conocer la presencia estrategias adaptativas como son: la capacidad de moverse por deslizamiento, poseer vainas o glicocálix y de recubrirse de sales minerales diversas, que en comparación con las poblaciones que las carecen, hipotéticamente les confiere a las primeras la ventaja de preservarse como microfósiles.

Insistiendo con el tema de la preservación, se aislaron nuevas cepas del género Bacillus, capaces de oxidar manganeso y de acumularlo en la superficie las células vegetativas o esporas, es necesario estudiar las propiedades de los precipitados, ya que otros trabajos sugieren una posible correlación específica entre la naturaleza del precipitado y el grupo al que pertenece el microorganismo, por lo que se considera a los precipitados como una fuente de información biológica.

La tesis también verso sobre diseños experimentales que permitieron establecer los patrones de división celular y de formación de la colonia, así como los patrones de degradación celular.

Este conocimiento permite reinterpretar las microbiotas del pre-Fanerozoico que durante mucho tiempo se ha limitado a las algas y cianobacterias y hasta esta decada el resto de la diversidad procarionte ha sido considerada con base a sus agrupaciones celulares típicas.

Debido a las alteraciones que han sufrido las rocas que poseen microfósiles del pre-Fanerozoico las determinaciones microbiológicas que se realizaron al inicio, en la decada de los 50 s, no consideraron las distorsiones de las microbiotas. Al respecto se observó la existencia de patrones típicos de degradación celular, quedando vainas vacías, tricomas de cianobacterias fragmentados, o células con aumentos en tamaño, que pueden confundirse con heterocistos y otras estructuras celulares.

Aunque a primera vista parecen esotéricos los estudios ecológicos y geoquímicos de los sistemas costeros evaporíticos, la presente discusión incluye algunos aspectos económicos y aplicados de dichos sistemas.

En diferentes reuniones científicas nacionales se ha dado a conocer los avances de esta investigación (López-Cortés, 1984; López-Cortés y Hornelas, 1985; López-Cortés y Hernández, 1985; López-Cortés, 1986 a; 1986 b) y en todas ellas se ha planteado una pregunta común: Cuáles son las aplicaciones que pueden resultar de los estudios realizados con comunidades microbianas estratificadas que se localizan en ecosistemas hipersalinos .

A continuación se enlistan solo algunas de las razones por las cuales tiene sentido la ecología microbiana de los sistemas costeros evaporíticos y similares.

1. Los ecosistemas hipersalinos, de Baja California que se estudiaron, presentan diversos tipos de comunidades microbianas que se desarrollan a diferentes concentraciones de sales minerales, al respecto se ha establecido la pregunta de si las células procariontes participan en los procesos de precipitación de los iones disueltos (véase Figura 5.1). En otros laboratorios se han diseñado modelos de precipitación de 27 iones de los cuales al menos 19 de ellos están controlados por procesos biológicos, que provocan cambios en la secuencia de evaporación y por lo tanto en la precipitación de sales minerales.

Diferentes tipos de células procariontes de las comunidades microbianas estratificadas son el factor más importante en la producción de grandes cristales evaporíticos limpios como la halita, aragonita y yeso.

2. En las columnas de agua de los ecosistemas hipersalinos está bien representada el alga Dunaliella que ha desarrollado sistemas osmoreguladores de interés en biotecnología como son el glicerol, aminoácidos, carbohidratos y alcoholes polihídricos, que le permiten sobrevivir en estos ambientes extremos.

3. Los sistemas costeros evaporíticos muestran una ventaja energética obvia, relacionada con la radiación luminosa, que está en cantidades ilimitadas.



Figura 5.1. Cristales de yeso, por debajo se observa un filamento de cianobacteria 1,800 X.

Las bacterias fototróficas anoxigénicas y cianobacterias producen bitúmenes a través de su actividad fotosintética, además de que son organismos que están bien representados en estos ambientes.

4. Se pueden implementar cultivos masivos de cianobacterias que no poseen heterocistos y ser fijadoras de nitrógeno molecular, útil en la producción de grandes cantidades de proteína específica para la alimentación de pollos y peces.

5. La agricultura en Baja California se ve limitada, por un lado, debido a sus suelos salinos y por otra parte a la falta de agua para riego. Sin embargo, la ingeniería genética ofrece el desarrollo de la agricultura en ambientes moderadamente salinos, empleando vegetales halotolerantes del tipo de las gramíneas y solanáceas. La metodología del ADN recombinante permitirá posiblemente la adaptación doméstica de vegetales de un ambiente de agua dulce a suelos salinos.

6. Los depósitos fósiles de sal están relacionados con estratos ígneos y reservorios de petróleo.

7. Los ambientes del tipo salina son auxiliares en la comprensión de depósitos de fosfatos del pre-Fanerozoico.

8. Los geólogos petroleros y geoquímicos especialistas en orgánica han concluido que mucho, sino la mayoría de los hidrocarburo y sistemas generadores de gas, en el pasado, estuvieron relacionados a los márgenes oceánicos evaporíticos tipo salina.

Las cercanas relaciones entre las biotas microbianas de tapetes modernos y fósiles proporcionan numerosas oportunidades para la colaboración en investigaciones sinérgicas entre paleontólogos, microbiólogos, sedimentólogos y geoquímicos.

Espero que los puntos de esta discusión conviertan más atractiva esta línea de investigación a la sensibilidad de las instituciones nacionales que patrocinan la investigación científica, sin olvidar que serán necesarios más estudios en esta dirección, considerando el hecho de que el hambre y las carencias de tecnologías e industrias apropiadas y simples, son típicas de los países en los que se localizan los mejores sistemas costeros evaporíticos que contienen comunidades microbianas estratificadas y que en la actualidad se encuentran en estudio por diversas instituciones extranjeras y no nacionales.

## 5.1 REFERENCIAS.

KRUMBEIN, W. E. 1985. Applied and economic aspects of Sabkha systems-genesis of salt, ore and hydrocarbon and biotechnology. En *Hypersaline ecosystems. The Gavish Sabkha*. Eds. G. M. Friedman y W. E. Krumbein, Springer-Verlag. Berlin.

LOPEZ-CORTES, A. 1984. Procariontes de comunidades microbianas estratificadas. IV Memorias del Coloquio Interno de Investigación ENEP-UNAM 26-30 de noviembre, 157.

LOPEZ-CORTES, A. y HORNELAS, U. Y. 1985. Ecofisiología de comunidades microbianas estratificadas: Un modelo de sucesión microbiana. XVI Congreso Nacional de Microbiología. Instituto Tecnológico de Durango, Dgo. México. 21-22.

LOPEZ-CORTES, A. y HERNANDEZ, H. F. 1985. Estudio de dos cepas de *Bacillus licheniformis* de comunidades microbianas estratificadas capaces de oxidar manganeso. XVI Congreso Nacional de Microbiología. Instituto Tecnológico de Durango, Dgo. México. 39.

LOPEZ-CORTES, A. 1986 a. Aislamiento de bacterias fototróficas anoxigénicas de comunidades microbianas estratificadas, Baja California Norte, México. XVII Congreso Nacional de Microbiología. Universidad Autónoma de Puebla, Pue., México. 15.

LOPEZ-CORTES, A. 1986 b. Historia natural de nuevas localidades con comunidades microbianas en el complejo Laguna Figue-roa, Baja California, México. XVII Congreso Nacional de Microbiología. Universidad Autónoma de Puebla, Pue., México. 15.