

03088

1
Leje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONALES Y DE POSGRADO
PROYECTO ACADÉMICO DE ESPECIALIZACIÓN,
MAESTRIA Y DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA,
SEDE FACULTAD DE QUIMICA

INFLUENCIA DE ARQUEOBACTERIAS HALOFILAS EXTREMAS EN LA
FORMACION DE CRISTALES Y TASA DE CRISTALIZACION DEL NaCl.

Tesis sujeta en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de
Doctor en Biotecnología
por

Alejandro López Cortés

Noviembre, 1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

AGRADECIMIENTOS

No queda la menor duda de que el trabajo descrito en esta tesis pudo ser completado gracias a la contribución de mucha gente.

Deseo expresar mi reconocimiento y gratitud al Dr. José Luis Ochoa por su confianza en mí. Sin su ayuda y orientación no hubiese sido posible realizar esta investigación. Sus consejos estimularon la discusión abriendo mis ojos al significado del campo de la Bioquímica.

También fue invaluable la colaboración del Dr. Rafael Vázquez-Duhalt, por su apoyo científico y las valiosas y numerosas sugerencias.

Estoy en deuda con el Dr. Daniel Lluch Belda, Director General del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), por ofrecerme la oportunidad de realizar esta investigación, para aspirar a mi grado en la Unidad Académica de Estudios Profesionales y de Posgrado, CCH, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco la cooperación de todos los miembros de la División de Biología Experimental del CIBNOR y en particular al Sr. Ariel A. Cruz Villacorta por su ayuda en el trabajo instrumental.

Muchas gracias a los Investigadores de la Universidad Nacional Autónoma de México, Dra. Amelia Fárres, Dr. Sergio Sánchez Esquivel, y Dr. Sergio Palacios Mayorga por su orientación para desarrollar esta investigación, revisión de los avances parciales del trabajo experimental, estímulo y paciencia. Agradezco sinceramente el apoyo brindado por parte de los coordinadores del Programa de Posgrado en Biotecnología de la UACPYP-CCH-UNAM, Dra. Amelia Fárres, Dr. Sergio Sánchez Esquivel, y Dr. Alejandro Alagón por su confianza en mí. También agradezco a la Dra. Silvia Castillo Blum, Dra. Lena Ruiz Azuara y Dr. Agustín López-Munguía Canales, miembros del jurado, por la revisión y comentarios a esta tesis.

Agradezco al Dr. Morris Kates de la Universidad de Ottawa de Canadá, por sus comentarios y revisión de los resultados correspondientes al análisis de los lípidos polares de las halobacterias.

El trabajo de microscopía electrónica se realizó gracias a las facilidades ofrecidas por la Dra. Eugenia Klein, Jefa de la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto Weizmann de Ciencias en Israel y a la Sra. Marie Thérèse de Merchant del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Lynn Margulis de la Universidad de Massachusetts, E.U.A., por su ayuda y haberme formado en el campo de la Biogeoquímica y Geomicrobiología de Ambientes Hipersalinos y a la Dra. Susanne Schulze-Lam, árbitro del Geomicrobiology Journal por sus valiosas sugerencias y comentarios.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	iii
Abstract	iv
CAPITULO I.	
1. INTRODUCCION	
1.1 Bosquejo de la tesis.	1
1.2 Depósitos de sal.	2
1.3 Cristalización y formación de cristales.	3
1.4 Imperfecciones gruesas y modificaciones en el modo característico de crecimiento de los cristales de sal.	4
1.5 Biogeoquímica de los ecosistemas hipersalinos	5
1.6 Participación de los tapetes microbianos laminados y <i>Artemia salina</i> en la operación de las salinas.	7
1.7 Sistemática de arqueobacterias halófilas extremas.	9
1.8 Capas de superficie de halobacterias neutrófilas.	11
1.9 Papel de las halobacterias halófilas extremas en la producción de sal.	11
CAPITULO II.	
2. HIPOTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA	
2.1 Hipótesis.	14
2.2 Objetivos.	14
2.3 Estrategia.	14

CAPITULO III.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Parámetros fisicoquímicos de la salina de Pichilingue.	17
3.2 Microorganismos y condiciones de crecimiento.	17
3.3 Aislamiento de halobacterias.	19
3.4 Identificación de halobacterias.	19
3.5 Evaluación de las tasas de cristalización.	22
3.6 Preparación de capas de superficie (capas S) y esferoplastos de <i>Haloarcula</i> SP8807.	24
3.7 SDS-PAGE de las capas de superficie de SP8807	25
3.8 Tinción negativa de capas S para microscopía electrónica.	26
3.9 Evaluación del efecto de las bacterias, capas S y compuestos químicos sobre la forma de los cristales de NaCl.	27

CAPITULO IV.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Variaciones fisicoquímicas en las salmueras de la salina de Pichilingue, B.C.S.	29
4.2 Características del aislamiento SP8807.	32
4.3 Análisis de lípidos del aislamiento.	37
4.4 Características bioquímicas.	37
4.5 Influencia de halobacterias en la tasa de cristalización del NaCl.	41
4.6 Formación de cristales de NaCl.	47

CAPITULO V.

5. CONCLUSIONES

- 5.1 El papel de las halobacterias pigmentadas sobre el incremento de la temperatura en cristalizadores. 58
- 5.2 Aislamiento y descripción de *Haloarcula* cepa SP8807. 59
- 5.3 Influencia de las halobacterias sobre el número, tamaño y forma de los cristales de NaCl. 59

LITERATURA CITADA 61

APENDICE I Indice de figuras 65

APENDICE II Indice de tablas 67

APENDICE III Publicación 68

RESUMEN

Trabajo de campo y observaciones microscópicas de muestras de agua hipersalina y halita de la salina comercial de Pichilingue Baja California Sur, México, en 1988 a 1990, mostraron la presencia de arqueobacterias halófilas extremas, halobacterias, en los estanques cristalizadores en los cuales se forma la sal común.

Hasta el momento la literatura ha sido inespecífica acerca del papel, del por qué de la presencia de halobacterias en la sal cristalina. El término descriptivo contaminación que se ha venido usando sugiere una relación accidental y superficial.

En este trabajo se demostró que la presencia de arqueobacterias halófilas extremas en una solución de NaCl, incrementó el número y tamaño de los cristales de halita formados y produjo cristales dendríticos. Varios materiales disueltos como son: glucosa, glicerol, hidrolizado de caseína, aminoácidos, ferrocianuro y otros suspendidos, como silica gel, eubacterias, halobacterias, y capas de superficie (capas S) de *Haloarcula* cepa SP8807, fueron evaluados por su capacidad para modificar el hábito de crecimiento de los cristales de halita. Los resultados muestran que las células completas de varias cepas de halobacterias y capas de superficie de *Haloarcula* cepa SP8807 también fueron capaces de inducir la formación de cristales dendríticos. Estudios de microscopía electrónica de transmisión y análisis electroforéticos en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) sugieren que los constituyentes proteicos de las capas S de arqueobacterias halófilas extremas pueden determinar la forma de los cristales de halita favoreciendo la forma de crecimiento dendrítico.

ABSTRACT

Field work and microscopic observations of hypersaline water and crystalline salt from the saltern ponds of Pichilingue, Baja California Sur, Mexico, have shown the presence of halobacteria in the crystallizer ponds where common salt is formed. The available literature does not refer to, nor explain the actual role of the halobacteria in the crystalline salt. The descriptive term "bacterial contamination" suggests an accidental and superficial relationship.

In this work the presence of extreme halophilic archaeobacteria in a NaCl solution increased the number and size of the NaCl crystals formed, and yielded dendritic crystals. Various dissolved materials such as glucose, glycerol, casein hydrolysate, amino acids, ferrocyanide, and suspended materials such as silica gel, halobacteria, eubacteria cells, and surface layers (S-layer) of *Haloarcula* strain SP8807, were evaluated for their ability to modify the crystal habit of halite. The results show that whole cells of several strains of halobacteria and surface layers of *Haloarcula* strain SP8807 were able to induce the formation of dendritic crystals. Transmission electron microscopy and SDS-PAGE analysis suggest that the proteinaceous constituents of extreme halophilic archaeobacterial surface layers (S-layer) may modify the crystal habit of halite to favor dendritic growth.

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

1.1 Bosquejo de la tesis.

En esta tesis se estudió bajo condiciones controladas 1) la participación de células de halobacterias como semillas o moldes en la nucleación de la halita y 2) la modificación del hábito de crecimiento de los cristales de cloruro de sodio por materiales disueltos y suspendidos como son: glucosa, glicerol, hidrolizado de caseína, aminoácidos, ferrocianuro, silica gel, células de eubacterias y halobacterias y capas de superficie de *Haloarcula* cepa SP8807.

El presente trabajo es un esfuerzo más para profundizar en el entendimiento de la relación entre células de halobacterias y la halita cristalina.

Las arqueobacterias halófilas extremas producen un aspecto rojo y turbio a los cristalizadores de la salina comercial de Pichilingue B.C.S., México, coexistiendo con el proceso de precipitación del cloruro de sodio. Este hecho nos llevó a plantear la siguiente pregunta: ¿Qué relación tienen las arqueobacterias halófilas extremas en la cristalización y la forma de los cristales de cloruro de sodio?. Se sabe por ejemplo, que las salinas de Long Island, en Bahamas y Dry Creek, en Australia, han presentado problemas en la producción de sal debido a intensas lluvias que alteraron la densidad y contenido de iones, la microbiota y la materia orgánica en las salmueras,

por lo que se tuvo que implementar el uso de fertilizantes y colorantes sintéticos para restablecer la productividad primaria (Davis, 1978; Jones y col. 1981).

De los resultados obtenidos se pudo concluir que efectivamente las halobacterias determinan la forma, el número y el tamaño de los cristales de halita. Por esta razón en las salinas comerciales deben considerar el monitoreo del carbono orgánico disuelto y densidad poblacional de halobacterias, a fin de establecer los valores que resulten en sal común de alta calidad (López-Cortés y col. 1994).

1.2 Depósitos de sal.

La sal es uno de los primeros, por no decir el primer tipo de mineral fósil que fue explotado industrialmente por la humanidad (Krumbein, 1985). Por ejemplo, los depósitos de sal tipo evaporítico costero fósiles y modernos contienen principalmente minerales de importancia económica como la: halita (NaCl), silvita (KCl), carnalita ($\text{KCl} \cdot \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), polihalita ($\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot \text{MgSO}_4 \cdot 2\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cainita ($\text{KCl} \cdot \text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), varios boratos y naturalmente, yeso, anhidrita, calcita, aragonita y dolomita; dichos minerales varían en cantidad, en sus mezclas y en sus sucesiones de precipitación de un depósito a otro. Virtualmente todos los sistemas evaporíticos costeros modernos tienen un cierto número de características comunes fundamentales: (1) son ambientes cuyo sustrato sedimentario es afectado por la evaporación del agua contenida en los minerales por acción

capilar del suelo; (2) son sitios donde está bien representada la precipitación de sulfatos. Sin embargo, una interesante mezcla de factores físicos (sustrato sedimentario, dimensiones, profundidad de la columna de agua), químicos (tipo y contenido de iones) y biológicos (grupos taxónomicos y densidades poblacionales) son peculiares de cada localidad (Purser, 1985).

Aunque generalmente los geólogos de la sal han explicado la sucesión en la cristalización como resultado de factores puramente fisicoquímicos, en la última década se ha reconocido la participación de los sistemas biológicos (Jones y col. 1981; Krumbein, 1985; Javor, 1989).

1.3 Cristalización y formación de cristales.

La cristalización como proceso industrial es importante ya que proporciona un método práctico para obtener sustancias químicas concentradas en forma pura y en un estado apropiado para empacarlas, manipularlas y almacenarlas. La cristalización ha sido explicada según los tipos de cristales (metálicos, iónicos, de valencia, moleculares), formas (consecuencia de la disposición de los átomos en las redes espaciales que componen los cristales), rendimiento, y fenómenos caloríficos, mientras que la teoría sobre la formación de los cristales para su comprensión ha sido dividida en tres partes: 1) la formación de los núcleos cristalinos, 2) el crecimiento resultante de los mismos y 3) la relación entre la formación y el crecimiento (Perry, 1976).

1.4 Imperfecciones gruesas y modificaciones en el modo característico de crecimiento de los cristales de sal.

El concepto "imperfecciones gruesas" se refiere a defectos de los cristales a escalas micro y macroscópicas y no incluye aquellos defectos en la estructura interna del cristal. Las cavidades con salmuera, o inclusiones fluídas, representan un tipo de imperfección gruesa, las cuales son responsables de la agregación de la sal bajo ciertas condiciones de evaporación. Dichas cavidades pueden ser removidas por calentamiento a altas temperaturas. El efecto de las cavidades sobre la producción de sales de alta calidad no ha sido bien establecido. Naturalmente estas imperfecciones decrecen la pureza de la sal, debido a los residuos contenidos en la salmuera atrapada. Sin embargo, para la mayoría de los usos de la sal estas imperfecciones son de poca importancia (Shuman, 1965). Una serie de investigaciones relacionadas con el efecto de diversos materiales sobre las modificaciones en el modo característico de crecimiento de cristales de sal a partir de soluciones, han generado sorprendentemente pocos resultados (Ploss, 1964; Shuman, 1965). La forma característica de crecimiento de los cristales de halita puede ser alterado, de cúbico a otras formas, por una variedad de sustancias orgánicas e inorgánicas. Los cristales dendríticos de sal resultan de salmuera o soluciones de cloruro de sodio a las que se les adiciona ferrocianuro de sodio (250 ppm). Este compuesto está patentado ya que se usa tanto como agente que

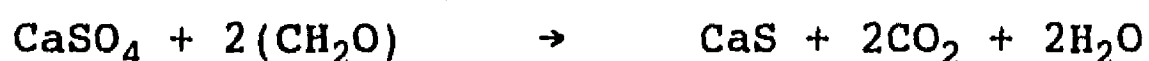
evita la agregación de la sal (anti-caking), como por su capacidad para modificar el crecimiento de los cristales (Ploss, 1964; Shuman, 1965). Sin embargo, no se explica en los trabajos Ploss (1964) y Shuman (1965) qué usos y aplicaciones tienen las formas dendríticas obtenidas, de tal manera que encontraron un incremento en las ventas al mercado. No obstante, el ferrocianuro de sodio no ha sido encontrado en los ambientes evaporíticos naturales (Javor, 1989).

1.5 Biogeoquímica de los ecosistemas hipersalinos.

Un cuerpo creciente de conocimientos biogeoquímicos sugieren que los microorganismos y sus productos han desempeñado papeles relevantes en la modificación de la precipitación y la diagénesis de los sedimentos químicos en los ambientes hipersalinos. La actividad de reducción de sulfatos por *Desulfovibrio* y otras bacterias reductoras de sulfatos y sulfuros puede alcanzar dimensiones kilométricas en un sistema hipersalino con valores altos de productividad primaria, lo que influye considerablemente en el balance geoquímico y por lo tanto en la estructura y dimensión del depósito de sal. Los procesos de formación de depósitos de carbonatos, yeso y sal común, y no sólo carbonatos y bicarbonatos, juegan un papel determinante en el retiro de grandes cantidades de sulfatos bajo condiciones anaerobias. Los sulfatos sirven como aceptor terminal de electrones en una amplia variedad de bacterias (Ecuación 1). Así, la correlación no es entre biomasa y la masa de evaporitas acumuladas, sino entre

bioenergética de la actividad de bacterias sulfato reductoras y la masa de las evaporitas (Krumbein, 1985; Ehrlich, 1990).

Ecuación 1



Por lo tanto, no sólo la cantidad y especies de sales en los depósitos de sal sino también la calidad de ésta es biológicamente controlada (Gavish y col. 1985).

El papel del carbono orgánico disuelto (COD) es mejor conocido en la precipitación de carbonato de calcio y yeso que en la formación de la halita y potasas, siendo estos últimos de mayor importancia económica. Actualmente, los efectos del COD no han sido incluidos en ningún modelo de secuencia de precipitación de evaporitas, y se ha identificado que la actividad biológica y el COD complican la predicción de la secuencia de precipitación de minerales (Javor 1989).

La ocurrencia de material orgánico, sulfuros y azufre, en los depósitos de sal, así como su sorprendente carencia de yeso y anhídrita en comparación a la gran cantidad relativa de carbonatos, indica actividades biogeoquímicas considerables durante el proceso de depósito (Krumbein, 1985).

1.6 Participación de los tapetes microbianos laminados y *Artemia salina* en la operación de las salinas.

Las plantas productoras de sal o salinas han sido manejadas por el hombre por al menos hace 2, 500 años. En la Edad Media la gente conocía acerca de los problemas biológicos en el manejo de las salinas (Krumbein, 1985), sin embargo, no conocían las razones geomicrobiológicas.

Diversas herramientas y procesos técnicos han sido adaptados para mantener un cierto equilibrio biológico en los estanques de las salinas. El fondo de los estanques artificiales de las salinas requiere de la producción y mantenimiento de tapetes microbianos bentónicos para mitigar la pérdida de salmuera por filtración, o para evitar el influjo o contacto con agua menos salina, o con salmuera de diferente composición, o el reflujo de salmueras densas. Para la columna de agua se recomienda suprimir los desarrollos masivos de *Dunaliella*, de bacterias fototróficas anoxigénicas y/o de cianobacterias, introduciendo individuos de *Artemia salina* que traen consigo la clarificación rápida de la salmuera, así la luz podrá alcanzar el fondo de los estanques estimulando el crecimiento de tapetes microbianos bentónicos (Jones y col. 1981).

Schneider y Herrmann (1980) desarrollaron un modelo fiel y detallado del comportamiento del hierro bajo las condiciones antes mencionadas, indicando claramente que el sistema biológico que se encuentra por debajo de la zona aeróbica de las

cianobacterias oxigénicas en tapetes microbianos laminados, es responsable del color final de la sal y de su pureza. De tal manera, la práctica de los salineros de agitar frecuentemente la salmuera en los cristalizadores propicia que el lodo reducido subyacente se esponga y cause un ambiente anaerobio en la salmuera con valores de potencial redox negativos E_h (-150 mV), lo cual favorece que el hierro de la salmuera se encuentre en solución como $Fe^{(II)}$ (Figura 1) evitando la coloración rojo café de la sal resultante. Después de haberse mezclado el lodo reducido con la salmuera, toda la solución con valores de E_h negativos es drenada y la sal resultante permanece blanca. El color blanco de la sal es, por tanto, causada de manera indirecta por actividad microbiana.

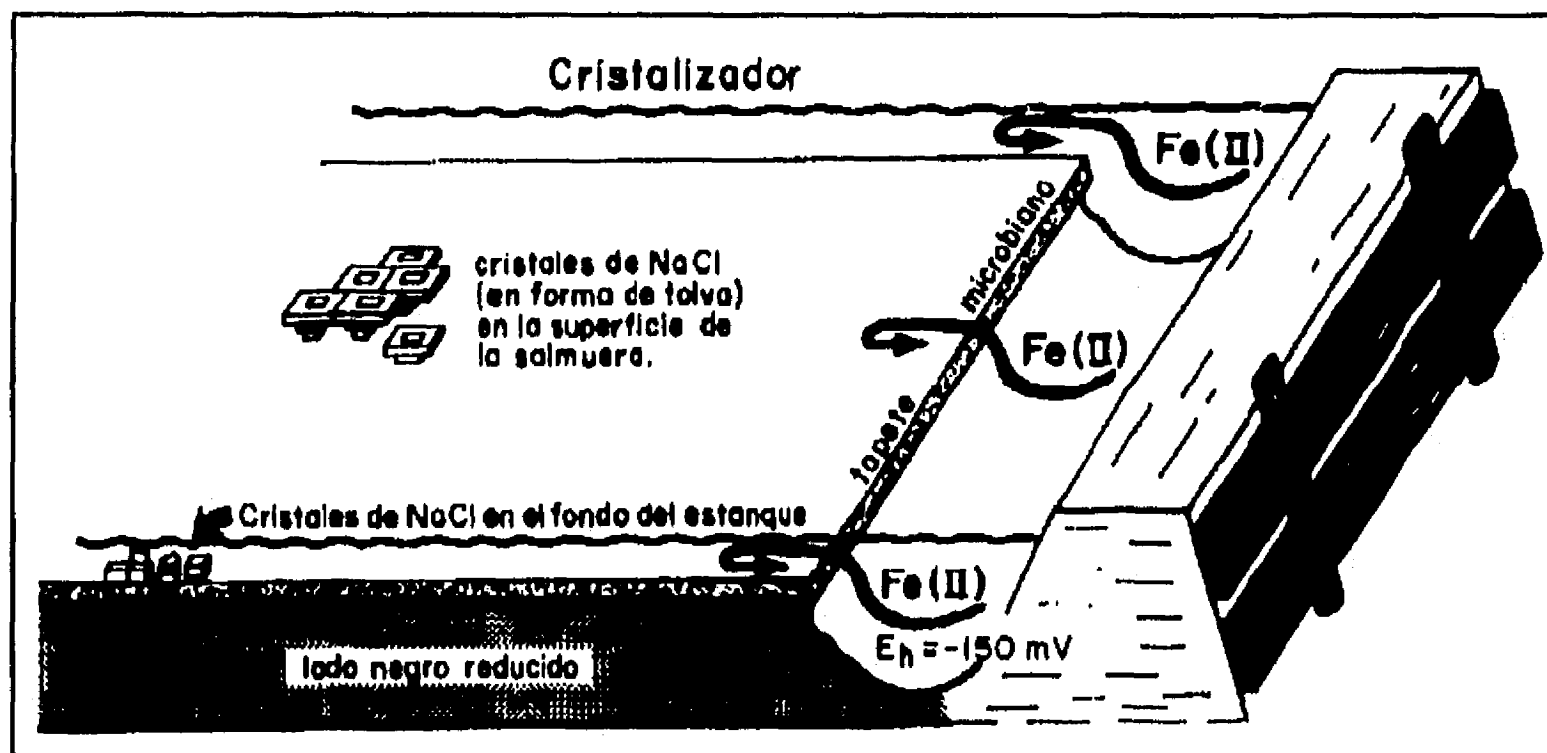


Figura 1. Cristalización del NaCl con tapetes microbianos estables por arriba del lodo reducido. En el canal de la periferia el tapete es completamente removido. Sobre la superficie de las salmueras crecen cristales de NaCl en forma de tolva; sobre el fondo crecen cristales de NaCl cúbicos bien desarrollados. Tomado de Schneider y Herrmann 1980.

1.7 Sistemática de arqueobacterias halófilas extremas.

A finales de 1970 un grupo de células procariontes, las arqueobacterias, fueron reconocidas como un Reino separado de las eubacterias y de los eucariontes (Woese 1987). Las arqueobacterias comprenden dos líneas filogenéticas principales (i) una rama que incluye a las bacterias metanógenas, a las bacterias halófilas extremas, y a los géneros *Thermococcus*, *Thermoplasma* y "*Archaeoglobus*", (ii) y la otra que incluye a representantes termófilos extremos de los grupos Sulfolobales y Thermoproteales. Este nuevo concepto en filogenia fue basado en la comparación de las secuencias de oligonucleótidos de la fracción 16 S rRNA, las que a su vez han sido confrontadas con características bioquímicas, fisiológicas y moleculares (Woese y Wolfe 1985).

Las características de diagnóstico de la Familia Halobacteriaceae son: forma celular, patrones de división celular, arreglo flagelar, metabolismo del oxígeno, necesidades fisiológicas de NaCl (3-4 M), composición de lípidos polares, producción de bacteriorodopsina, bacterioruberina, y temperatura óptima de crecimiento (Larsen 1981). Con base a su ecología, es posible reconocer dos grupos de géneros en el interior de esta Familia: los neutrófilos (*Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloferax* y *Haloarcula*), y los alcalinófilos (*Natronobacterium* y *Natronococcus*). Otras características que permiten la distinción de los géneros son: utilización de la glucosa como principal

fuente de carbono, facultatividad anaeróbica, grado de polimorfismo celular, requerimientos moderados de sales (1.5 M), producción de vacuolas de gas, y granulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB), susceptibilidad a bacitracina, polimixina y novobiocina, lisis celular a baja fuerza iónica, requerimientos de Mg^{2+} , dependencia de ciertos aminoácidos, y otras características detectadas por estudios serológicos (Torreblanca y col. 1986; De Macario y col. 1986). Los géneros forman las bases esenciales de la sistemática bacteriana pero, no hay una definición filogenética satisfactoria del taxón género. Las Familias pueden ser consistentes en términos de la quimiotaxonomía e hibridación, o con base a datos de secuencias de polímeros complejos. La definición filogenética de una especie, puede incluir cepas con aproximadamente, el 70 % de similitud o más en la relación DNA-DNA (con 5°C o menos de ΔT_m). Ambos valores deben ser considerados. Las características fenotípicas deben de estar de acuerdo con esta definición (Wayne y col. 1987). Algunas de las características fenotípicas tradicionales, señaladas y empleadas en la clasificación bacteriana no siempre correlacionan bien con grupos establecidos, particularmente cuando se consideran las relaciones de parentesco. Una vez que se conozcan aquellas características fenotípicas no tradicionales, fáciles de determinar y que además correlacionen bien con grupos filogenéticamente cercanos, ese conflicto eventualmente se resolverá por lo que mucho trabajo será necesario realizar al respecto (Krieg 1984).

Un sistema formal único de taxonomía y nomenclatura bacteriana parece ser adecuado. La filogenia podrá determinar la taxonomía, y la nomenclatura estará de acuerdo con la información del genoma y consistencia fenotípica (Wayne y col. 1987).

1.8 Capas de superficie de halobacterias neutrófilas.

Las capas de superficie (capas S) de las arqueobacterias son únicas en composición y estructura (Kandler y Konig, 1985).

Los géneros de halobacterias están representados por bacilos, cocos, células polimórficas, neutrófilas o alcalófilas, gram positivas o gram negativas (Grant y Ross, 1986). Las células gram negativas de los géneros *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax* y *Natrobacterium*, están rodeadas, por fuera de la membrana celular, por una capa de superficie, (capa S), componente exclusivo de la pared celular en este tipo de organismos procariontes (Messener y Sleytr, 1992). Estudios estructurales y biosintéticos han sido hechos con la glicoproteína de *Halobacterium halobium* y *Halobacterium salinarum* (Sumper, 1987; Lechner y Wieland, 1989). Recientemente, Sumper y col., (1990) reportaron la caracterización química parcial de la glicoproteína de la capa de superficie de *Haloferax volcanii*.

1.9 Papel de las arqueobacterias halófilas extremas en la producción de sal.

En los estanques de las salinas comerciales llamados cristalizadores, en los cuales precipita el cloruro de sodio, existe un marcado decremento en la diversidad de especies de tal suerte que los diferentes nichos ecológicos son algunas veces

ocupados por sólo una especie (Rodríguez-Valera 1988). Tales estanques casi siempre corresponden a cultivos monoespecíficos de halobacterias (Rodríguez-Valera y col. 1985). En estos ambientes las densas poblaciones de halobacterias (10^6 - 10^8 células/ml), pueden ser detectadas por el color rojo y la turbidez del agua (Rodríguez-Valera 1988).

Las halobacterias son capaces de fotosintetizar y generar una cierta productividad primaria por medio de la bacteriorodopsina (Oren 1983). La bacteriorodopsina está localizada en la membrana celular como parches discretos, ("membrana púrpura"), es fotosensible y bajo condiciones de iluminación se blanquea, acompañada por una liberación de protones hacia el medio extracelular que establece un gradiente de protones transmembranal que permite la síntesis de ATP.

Bajo las condiciones de la mayoría de los cristalizadores las halobacterias presentan tasas de crecimiento bajas, aunque esto tiene poca importancia sobre su densidad poblacional si no hay competidores presentes. Krumbein (1985), ha reportado que la presencia de halobacterias, en las salmueras reducen la formación de superficies de corteza de sal, la cual requiere ser destruida por los trabajadores de la salmuera. No obstante, los cristalizadores rojos, coloridos por las halobacterias, se calientan rápido y retienen altas temperaturas, acelerando las tasas de evaporación, en comparación con los translúcidos e incoloros (Jones y col, 1981; Javor 1989). Por otro lado, Norton y Grant, (1988), encontraron que cuando el cloruro de

sodio cristaliza en un ambiente evaporítico las halobacterias son atrapadas en inclusiones fluidas, las cuales se forman conforme el cristal se desarrolla conservando su viabilidad por un mínimo de 6 meses.

En síntesis, las arqueobacterias parecen estar estrechamente ligadas a los procesos de producción, cristalización, forma y tipo de cristales que se generan en un sistema evaporítico costero o salina, principalmente en los estanques donde precipita el cloruro de sodio denominados cristalizadores con valores de gravedad específica (g.e.) ~ 1.23, así como en la pureza de los cristales, por lo que es importante definir las concentraciones de carbono orgánico disuelto y densidades poblacionales de halobacterias en los cristalizadores. Todo esto en base a sus propiedades biológicas, como son su morfología celular plano angular, composición química y la presencia de bacterioruberina y bacteriorodopsina, las cuales pueden determinar en buena medida el éxito en el manejo de los cristalizadores y aprovechamiento de los cristales de cloruro de sodio que se producen en dichos estanques.

CAPITULO II

2. HIPOTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA

2.1 Hipótesis.

En la hipótesis propuesta se establece que el fenómeno de precipitación de la sal común, halita, está influenciado no sólo por factores físicos y geoquímicos sino también por biológicos y, en particular, por la participación de arqueobacterias halófilas extremas, las cuales están bien representadas en los cristalizadores de las salinas comerciales donde precipita el NaCl.

2.2 Objetivos.

Los propósitos de esta tesis incluyen la evaluación de dos aspectos: (1) la influencia de halobacterias en: la cosecha en gramos, el número y el tamaño de los cristales de halita; y (2) el efecto de las halobacterias sobre la modificación de los hábitos de crecimiento de los cristales de halita.

2.3 Estrategia.

Para poder cubrir los objetivos planteados se escogió a la salina comercial de Pichilingue, B.C.S., por su cercanía al laboratorio, pequeñas dimensiones y gran colorido y turbidez de sus estanques.

Una vez seleccionado el sitio de estudio se procedió al enriquecimiento, aislamiento e identificación de arqueobacterias halófilas extremas, o halobacterias. Los criterios diferenciales para la identificación fueron: (a) estructurales y ultraestructurales; (b) fisiológicos; y (c) el análisis de los lípidos polares de sus membranas celulares.

El hecho de que coexistan halobacterias en el momento en que cristaliza el cloruro de sodio condujo a implementar una serie de modelos experimentales de cristalización a partir de soluciones saturadas de esta sal.

Para valorar la influencia de las halobacterias sobre el número y tamaño de los cristales de halita se realizaron determinaciones macroscópicas, midiéndose y contándose cristales cúbicos de halita mayores a 1 mm.

Con el fin de determinar si las células angulares de halobacterias afectan el número y tamaño de los cristales formados, fue necesario observarlo a escala menor usando un microscopio electrónico de barrido.

Con respecto al papel de las halobacterias sobre el modo de crecimiento de los cristales, se evaluaron células completas y capas de superficie, así como diferentes agentes químicos comunes en los microorganismos halófilos, como son los osmoreguladores (glucosa, glicerol y aminoácidos) y, por otra parte se investigó el efecto de partículas inertes como la sílica gel, a fin de diferenciar mecanismos físicos o químicos involucrados en el proceso de cristalización. La integridad y composición química de

las capas de superficie fueron monitoreadas empleando tinción negativa para microscopía electrónica de transmisión y estudios de electroforesis (SDS-PAGE), a fin de garantizar que se evaluaron capas de superficie y sus proteínas sobre el modo de crecimiento de los cristales de halita.

CAPITULO III

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Parámetros fisicoquímicos de la salina de Pichilingue.

Una laguna de concentración de agua de mar, más una serie de 23 vasos concentradores y 60 cristalizadores constituyen la salina de Pichilingue, ubicada a 23 Km al norte de La Paz, B.C.S., México (Fig. 2). El muestreo para realizar el trabajo microbiológico y las determinaciones de la temperatura, pH, y densidad del agua de mar y de las salmueras de una serie de estanques, se llevó a cabo durante los meses de menor precipitación, junio y julio de 1988.

3.2 Microorganismos y condiciones de crecimiento.

Las cepas de referencia usadas fueron: *Halobacterium halobium* NRC 817, *Halobacterium saccharovorum* ATCC 29252, *Haloarcula vallismortis* ATCC 29715, *Haloferax mediterranei* ATCC 33500, *Haloarcula* SP8807, *Vibrio parahaemolyticus* MMF6, *Planococcus* sp. M6P2, y *Azospirillum brasilense* Cd DSM 1843. Las eubacterias *V. parahaemolyticus*, and *Planococcus* fueron aisladas de un ecosistema hipersalino (Exportadora de Sal S.A. Guerrero Negro, B.C.S., México), y *A. brasilense* es un microorganismo que no tiene relación con ambientes hipersalinos. Estas cepas de eubacterias fueron incluidas en este estudio con la finalidad de conocer sus respuestas en presencia de cristales y soluciones de sal. Las bacterias halófilas fueron cultivadas en el Medio HEC el cual contiene 25% (w/v) de las sales correspondientes al agua de mar, referida como (SW), y a la cual se le adicionó (g/l): 5.0 NH₄Cl,

0.005 FeCl_3 , 0.5 KH_2PO_4 suplementado con extracto de levadura 5.0 y casaminoácidos 1.0, ajustándose el pH a 7.3 con 1N KOH (Rodríguez-Valera y col. 1980; Torreblanca y col. 1986), e incubadas a 38°C y agitadas a 150 rpm. *A. brasilense* fue cultivado en Caldo Nutritivo (Merck, Alemania), incubado a 30°C en agitación.



Figura 2. Vista aérea de la salina comercial de Pichilingue, B.C.S., México (Secretaria de Comunicaciones y Transportes).

3.3 Aislamiento de halobacterias.

Un ml de salmuera de diversos estanques de la secuencia de concentración de sales de la salina de Pichilingue fueron inoculados en 250 ml del Medio 2 para halobacterias con la siguiente formulación: extracto de levadura 10.0 g; casaminoácidos 7.5 g; citrato trisódico 3.0 g; KCl 2.0 g; MgSO₄.7H₂O 20.0 g; FeCl₂ 2.3 mg y NaCl 250 g, en 1 l de agua, pH 7.5-7.8 (Larsen, 1981).

Después de 15 días de incubación los microorganismos fueron aislados por plaqueo directo en el Medio HEC 25% (w/v) e incubados por tres semanas a 38°C en bolsas de plástico selladas para evitar su desecación.

Las cepas fueron resembradas por estría cerrada en medio fresco y trasferidas para su almacenamiento a tubos inclinados que contenían Medio HEC 25%.

3.4 Identificación de halobacterias. La identificación de las halobacterias aisladas fue hecha de acuerdo a los criterios del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Grant y Larsen 1989a; 1989b) y aquellos propuestos por Torreblanca y col. (1986):

3.4.1 Morfología.

El tamaño y pigmentación de las colonias fue establecido después de siete días de desarrollo en el medio HEC 250 g/l. La forma, tamaño y movilidad de las células fue determinada por microscopía de contraste de fases (NIKON LABOPHOT, JAPON), y por microscopía electrónica de transmisión.

Las células se fijaron con glutaraldehído (3% v/v) en buffer de Sorensen 0.1 M pH 7.3 con 2 M de NaCl. La postfijación se hizo con tetraóxido de osmio 1% y contrastadas con acetato de uranilo por 5 min y citrato de plomo 2 min. Las observaciones se realizaron con un microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL 100 B (Mercer y Birbeck, 1972).

La presencia de flagelos fue determinada empleando criofractura, grabado (1 minuto a -100 °C) y sombreado. Estas muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión Philips 400T.

3.4.2 Fisiología.

Las necesidades fisiológicas de las cepas aisladas para el crecimiento y de sus requerimientos de sales encontradas en el agua de mar fueron determinadas empleando el medio HEC con 100 g/l, 150 g/l y 300 g/l de sales encontradas en el agua de mar (SW). El crecimiento se determinó espectrofotométricamente midiendo alícuotas de cultivo a 540 nm cada 10 horas durante 47 horas.

La demanda mínima de Mg^{2+} para el desarrollo de las cepas aisladas se determinó empleando el medio HEC con 250 g/l de sales representadas en el agua de mar, pero utilizando diversas concentraciones de Mg^{2+} (0.005 M, 0.020 M y 0.040 M) y un lote por triplicado sin fuente de magnesio. El crecimiento fue medido de igual forma que en el procedimiento arriba mencionado.

Los requerimientos de aminoácidos de las cepas aisladas se estudiaron empleando el medio basal de sales de agua de mar (SW 250 g/l) con glucosa como única fuente de carbono.

El efecto del pH (4,5,6,8) y temperatura (25°C, 50°C, 55°C y 60°C) sobre el crecimiento de las cepas aisladas fue evaluado espectrofotométricamente a 540 nm a las 48 hrs de desarrollo empleando el medio HEC que contenía 250 g/l, por triplicado. Los botones celulares que funcionaron como inóculos fueron lavados con SW 250 g/l.

3.4.3 Análisis de lípidos polares.

Se obtuvieron botones celulares de halobacterias a partir de 30 ml de cultivo en fase exponencial. Los lípidos polares de *Halobacterium saccharovorum* ATCC 29252, *Haloarcula vallismortis* ATCC 29715, *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 y de las cepas aisladas fueron extraídos con 3 ml de solvente cloroformo-metanol a 4°C durante 24 hrs, como ha sido descrito por Kates, 1972, y cromatografiados sobre rodillos de sílica gel (Chromarod S III) en un sistema de solventes con la siguiente formulación: cloroformo-metanol-ácido acético-agua (85:22.5:10:4, v/v/). Los lípidos fueron identificados y cuantificados con el sistema IATROSCAN MK-5 TLC/FID ANALYSER (JAPON).

3.4.4 Pruebas bioquímicas.

La capacidad de las cepas aisladas para crecer y producir ácido a partir de una única fuente carbono se evaluó en el medio de SW 250 g/l suplementado con varias fuentes de carbono.

La reducción de nitratos a nitritos y producción de nitrógeno molecular de las cepas fue probada en el medio SW 250 g/l suplementado con 0.1 % extracto de levadura y 0.1% (w/v) de KNO₃. Esta actividad fue detectada con los reactivos de naftilamina y ácido sulfanílico (Smibert y Krieg, 1981).

La capacidad de las cepas para hidrolizar la urea fue evaluada en el medio de Christensen (Smibert y Krieg, 1981) suplementado con las sales de SW 250 g/l. Mientras que la capacidad para hidrolizar almidón, gelatina y tween 80 fue detectada en el medio SW 250 g/l suplementado con 0.1 % extracto de levadura y 0.2 % de almidón, 4.0 % de gelatina, 1.0 % de tween 80, respectivamente.

La actividad de catalasa de las cepas fue determinada suspendiendo una asada de cultivo de medio sólido en una solución de H₂O₂ al 30 %. La producción de gas indica una reacción positiva. Así mismo, la actividad de la enzima citocromo oxidasa fue detectada tomando una colonia con un picadientes y colocándola en un papel filtro que contiene una solución acuosa de N-dimetil-p-fenilendiamina. Una coloración rojo-rosado y finalmente negra revela la presencia de la enzima.

3.4.5 Antibiogramas.

Las pruebas de susceptibilidad de las cepas aisladas a diferentes antibióticos se llevaron acabo empleando discos impregnados con el antibiótico en cuestión (DISPENSO-O-DISC, DIFCO, USA). Los siguientes antibióticos fueron usados: novobiocina 30 µg, bacitracina 10 U, polimixina B 300 U, cloranfenicol 30 µg, estreptomina 10 µg, canamicina 30 µg y gentamicina 10 µg.

3.5 Evaluación de las tasas de cristalización.

Cultivos en fase exponencial (500 ml) de *Halobacterium halobium* NRC 817, *Haloarcula vallismortis* ATCC 29715, *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 y cepas autóctonas fueron centrifugados a 16,000 g por 10 minutos, a 4°C. Por separado cada botón celular fue

resuspendido en una solución de NaCl al 30 % esterilizada previamente por filtración, y la concentración ajustada a una $D.O._{540 \text{ nm}}$ de 1.5. Muestras de 20 ml de la suspensión celular (10^6 - 10^7 células/ml) fueron colocadas en recipientes de plástico (8.5 cm de diámetro) e incubadas a $30^\circ \pm 0.4^\circ\text{C}$, a una humedad relativa del 60 %, intensidad luminosa de $170 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, sin disturbios, tratando de simular las condiciones naturales. El control consistió en una solución de NaCl al 30% esterilizada por filtración. El peso, número y tamaño de los cristales ($> 1 \text{ mm}$) formados a diferentes tiempos fue determinado después de decantar la solución de cloruro de sodio sobrante, y posterior a su secado a 60°C durante 48 horas. Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado, excepto el control, el cual se realizó en tres ocasiones por triplicado.

La cuantificación del número de cristales menores a 1 mm y la determinación de sus dimensiones se realizó de la siguiente forma: Un ml de cultivo bacteriano de la fase exponencial fue centrifugado a 16,000 g por 5 minutos, a 20°C . El botón celular fue lavado 3 veces con solución estéril de NaCl al 30% y resuspendido empleando la misma solución. A partir de esta suspensión, gotas de $5 \mu\text{l}$ fueron colocados sobre cubre objetos de vidrio, a los que se les recubrió con oro a 10 mA durante 12 min para posteriormente ser puestos en un perno de aluminio previamente cubierto con cinta adhesiva de carbono y conductora de electrones, e incubandose las gotas a una temperatura de 24°C sin disturbios. Después de 10, 20 y 30 minutos fue retirado el exceso de solución, empleando papel

filtro, secando al aire y cubriendo con oro a 20 mA durante 8 min.

El control consistió de gotas de 5 μ l de solución estéril de NaCl al 30 % tratadas bajo las mismas condiciones mencionadas arriba. Los especímenes fueron observados usando un microscopio electrónico de barrido Philips 515 a una aceleración de voltaje de 25 KeV.

Este procedimiento también permitió valorar el efecto de las células de halobacterias sobre los hábitos de crecimiento de los cristales de halita, dichos experimentos fueron correlacionados con observaciones hechas con microscopía óptica los cuales se presentan en la sección 3.9.

3.6 Preparación de capas de superficie (capas S) y esferoplastos de Haloarcula SP8807.

Con el propósito de conocer la estructura bacteriana involucrada en la modificación del hábito de crecimiento y mineralización de la halita, nosotros seleccionamos las capas de superficie (capas S) porque ellas están en contacto continuo con su ambiente. Recientemente se ha propuesto que ellas sirven como molde para la formación de granos finos de yeso y calcita (Schultze-Lam, y col. 1992).

Las capas de superficie fueron aisladas como sigue: Un ml de cultivo bacteriano de la fase exponencial fue centrifugado a 16,000 g por 5 minutos. El botón fue resuspendido en solución de esferoplastos compuesta por: solución amortiguadora 0.1 M MES [ácido sulfónico 2(N-morfolino) etanol, pH 7.0, que contiene 0.5 M sacarosa, 0.25 M NaCl y 0.01 M MgCl₂ (Jarrel and Sprott, 1984). Después de 30 minutos las células fueron convertidas en cuerpos

esféricos debido a la disminución en la concentración externa de sales de cloruro de sodio y magnesio. En estas condiciones las capas de superficie fueron removidas y disociadas de la superficie celular (Cohen y col., 1983; Hecht y col., 1986).

La suspensión fue centrifugada a 16,000 por 5 minutos a 20°C, resultando un botón con esferoplastos y el sobrenadante con subunidades disociadas de proteína de las capas de superficie. Las subunidades de las capas de superficie fueron recuperadas y dializadas (Sleytr y col 1988). a 4°C contra agua deionizada que contenía los solutos de la solución de esferoplastos excepto la sacarosa.

Después de la diálisis se promovió el reensamble de las subunidades de las capas de superficie con una solución compuesta por 4 M NaCl, 25 mM KCl, 80 mM MgSO₄ a pH 3.2 (Hecht y col., 1986). Este procedimiento produjo a) esferoplastos y b) capas de superficie purificadas. Las capas S autoensambladas estuvieron listas para estudios de electroforesis (SDS-PAGE), microscopía electrónica de transmisión (tinción negativa) y formación de cristales de halita. También fue empleada para reensamblar las capas S y observarlas por tinción negativa una solución de CaCl₂ 10 mM pH 6 (Koval y Murray 1986; Kessel y col. 1988).

3.7 SDS-PAGE de las capas de superficie de SP8807.

La electroforesis fue hecha tan pronto como los productos fueron obtenidos. Para ello se empleó Phast Gel de gradiente 4-15% con amortiguador Phast Gel SDS y corridos con un programa de separación para SDS (Pharmacia, Suecia). Los marcadores de peso

molecular fueron: albúmina bovina, 66 kDa; albúmina de huevo, 45 kDa; gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, 36 kDa; anhidrasa carbónica bovina, 24 kDa; inhibidor de tripsina, 20.1 kDa; alfa lactoalbúmina de leche bovina, 14.2 kDa (Sigma, SDS-7 Dalton Mark VII-L E.U.A.). Los geles fueron teñidos con plata para proteína con Phast Gel medio para electroforesis (Pharmacia, Suecia) y con ácido periódico-Schiff (PAS) para la detección de glicoproteínas usando el Phast System (Van-Seningen, y Davril 1992).

3.8 Tinción negativa de capas S para microscopía electrónica.

Las preparaciones para tinción negativa fueron hechas con con capas S fijadas y sin fijar. Capas S reensambladas fueron prefijadas en glutaraldehído 3 % (v/v) en solución amortiguadora 4.0 M NaCl, 25 mM KCl, 80 mM MgSO₄ pH 3.2, durante 1 hora a 4°C en la oscuridad. Después de este tiempo una vez más fueron centrifugadas a 16,000 g por 5 minutos a 20°C y el sobrenadante fue sustituido por solución fijadora nueva bajo las mismas condiciones arriba mencionadas. Las capas S reensambladas fueron lavadas con la misma solución amortiguadora.

Gotas (10 µl) de muestras fijadas que contenían fragmentos de capas S fueron colocadas en papel Parafilm y diluidas a 1:40 con solución amortiguadora 2 M NaCl, 12.5 mM KCl, 80 mM MgSO₄. Inmediatamente gotas de 10 µl de muestra fueron transferidas a rejillas de cobre previamente tratadas con descargas eléctricas brillantes. Después de 3 minutos las rejillas con muestra fueron contrastadas con 2 a 3 gotas de 2 % de acetato de uranilo acuoso por 1 minuto. El exceso fue removido con papel filtro (Sleyter y

col., 1988).

Gotas (10 μ l) de muestras no fijadas que contenían capas S ensambladas en solución de CaCl_2 10 mM pH 6 fueron colocadas en rejillas de cobre previamente expuestas a descargas eléctricas. Después de 30 minutos, cada rejilla con muestra fue teñida con 2-3 gotas de solución de acetato de uranilo al 2 % por 1 minuto. El exceso del agente de contraste fue removido con papel filtro (Sleytr y col. 1988). Ambos tipos de especímenes fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión Philips 410 a una aceleración de voltaje de 80 KeV.

3.9 Evaluación del efecto de las bacterias, capas S y compuestos químicos sobre la forma de los cristales de NaCl.

Un ml de cultivo bacteriano de la fase exponencial fue centrifugado a 16,000 g por 5 minutos, a 20°C. El botón celular fue lavado tres veces con solución estéril de NaCl al 30 % y resuspendido en la misma solución. Veinte gotas con suspensión bacteriana, de 5 μ l cada una de ellas, fueron colocadas en un portaobjetos perfectamente limpio y secadas en una estufa a 35°C. Después del secado los portaobjetos fueron observados bajo el microscopio óptico a 2.5, 10 y 20X.

Los siguientes compuestos fueron mezclados por separado con una solución de NaCl al 30 % estéril: capas S de la cepa SP8807 (20 μ g/ml), ferrocianuro de potasio, glucosa, glicerol, hidrolizado de caseína, sílica gel (63-200 μ m) y aminoácidos a concentraciones entre 200 y 2000 μ g/ml. Veinte gotas de 5 μ l de cada mezcla fueron colocadas en portaobjetos limpios para ser secados y observados.

Los productos químicos glucosa, glicerol y aminoácidos fueron seleccionados porque ellos han sido reconocidos como sustancias osmoreguladoras producidas por microorganismos halófilos. La silica gel como modelo de partículas inertes, el ferrocianuro por su habilidad para formar cristales dendríticos de halita previamente reportados por Ploss (1964) y Shuman (1965), e hidrolizado de caseína como un modelo de péptido.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Variaciones fisicoquímicas en las salmueras de la salina de Pichilingue, B.C.S.

Las salinas formadas por estanques múltiples son sistemas muy útiles para estudiar las variaciones de parámetros fisicoquímicos en función a la concentración de sales de los diversos estanques. La Figura 3 muestra la variación de la temperatura y el incremento de la densidad de las salmueras de Pichilingue y se compara con datos procedentes de una salina comercial localizada en las Bahamas (McCaffrey y col. 1987). En ambos casos, al incrementarse los valores de densidad de las salmueras, se nota una tendencia en el aumento de la temperatura, alcanzándose valores de hasta 39°C. Esta misma tendencia ha sido reportada para salinas del Mediterráneo en donde salmueras con 50% de salinidad total presentan temperaturas de 42°C (Rodríguez-Valera, 1988), lo cual se explica porque las soluciones concentradas de sales poseen bajos valores de calor específico; es decir, se requiere menor cantidad de energía para incrementar la temperatura en dichas soluciones. Otra hipótesis sostiene que la actividad microbiana también puede estar involucrada, por ejemplo los estanques rojos, donde cristaliza la halita, se caracterizan por calentarse mas rápido y retener altas temperaturas, acelerando las tasas de evaporación, en comparación con los traslúcidos e incoloros (Javor 1989).

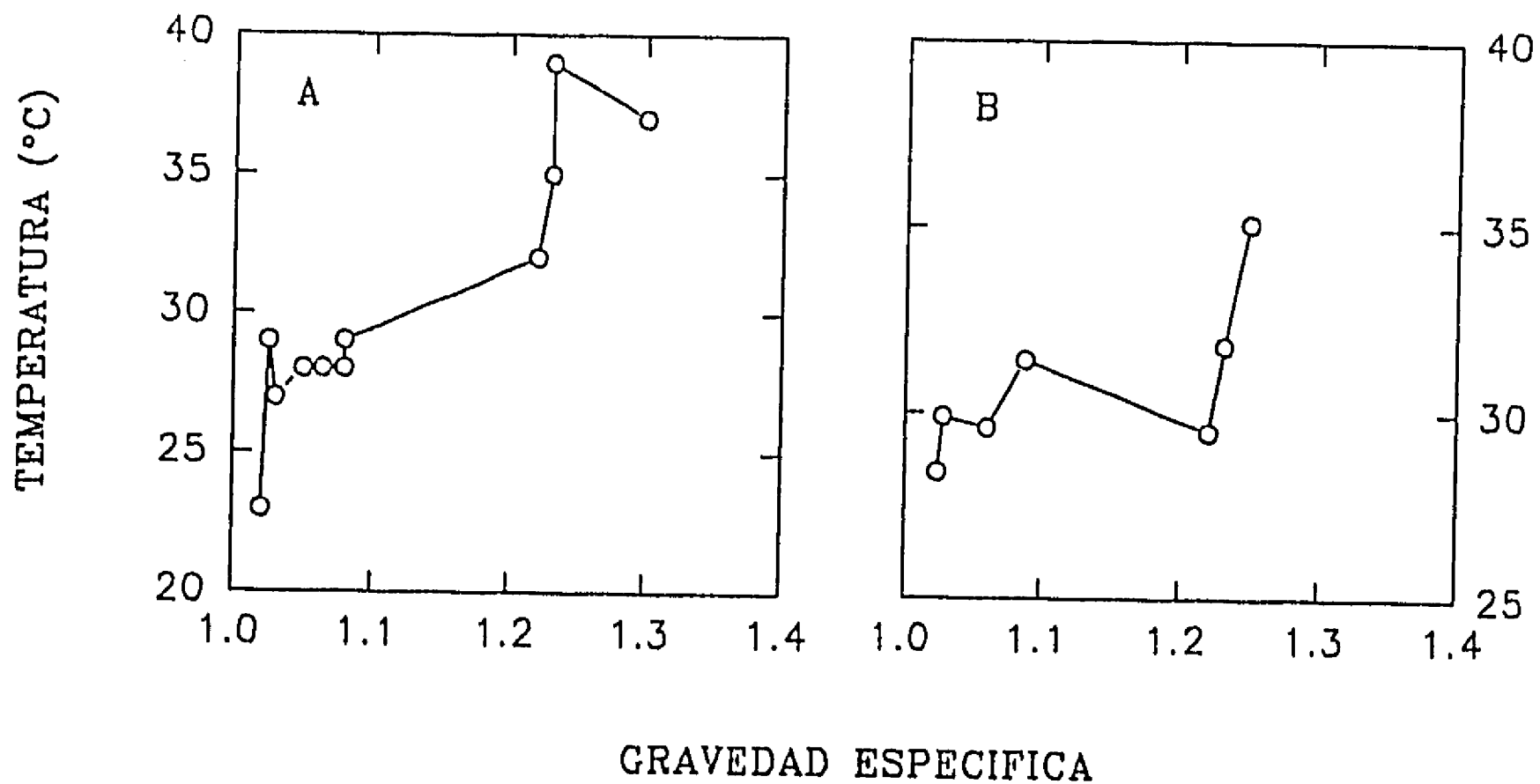


Figura 3. Variación de la temperatura y de la densidad de la salmuera en el proceso de cristalización de dos salinas comerciales. Las mediciones de temperatura de las salmueras de la salina de Pichilingue (A) fueron hechas en julio de 1988 a las 11 a.m., y las de la salina de las Bahamas (B) en mayo y junio de 1984.

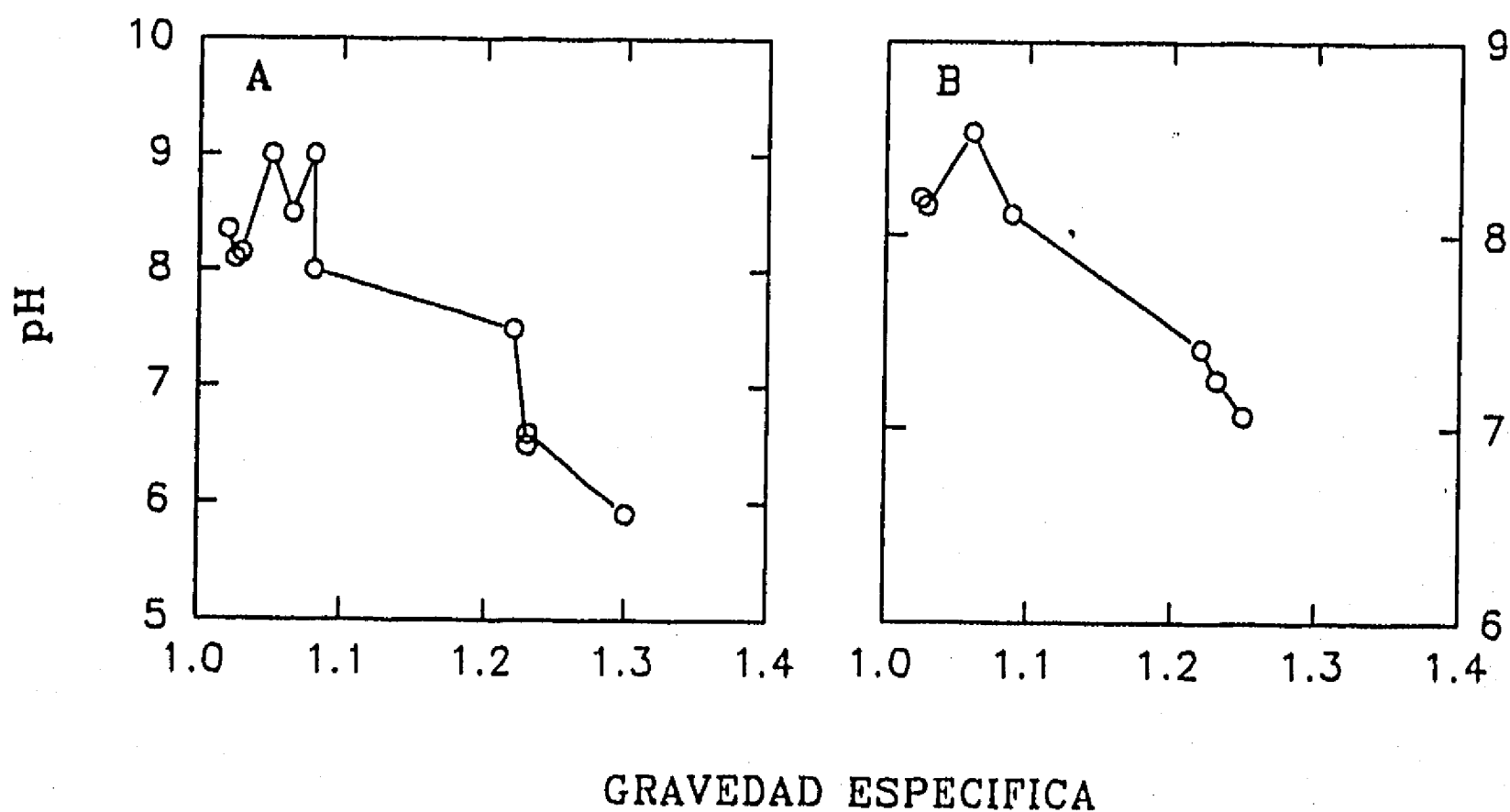
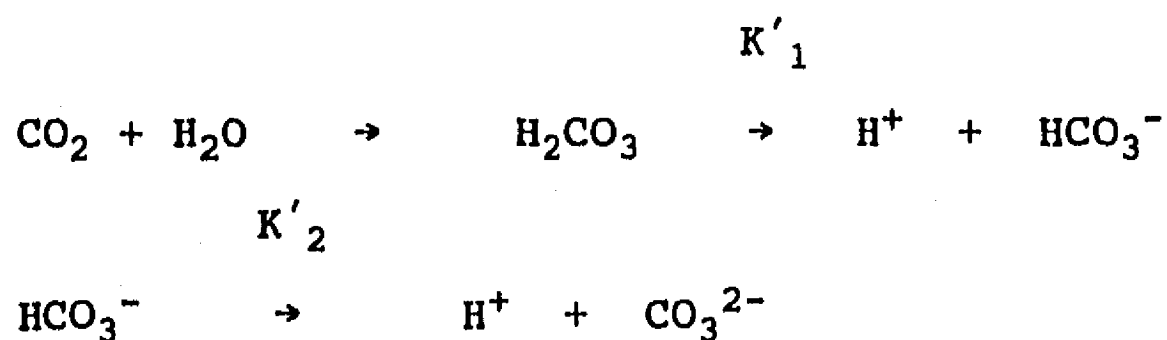


Figura 4. Variación del pH y del incremento en la densidad de las salmueras en el proceso de cristalización de dos salinas comerciales. Las mediciones de pH de las salmueras de la salina de Pichilingue (A) fueron hechas en julio de 1988 a las 11 a.m. y las de la salina de las Bahamas (B) en mayo y junio de 1984.

La Figura 4 muestra la variación del pH de las salinas de Pichilingue y las Bahamas indicando que el pH se incrementa conforme aumenta la densidad hasta alcanzar los valores 1.08 y 1.03 de gravedad específica, respectivamente. Después de haber sido rebasados estos valores de densidad el pH cae drásticamente conforme se incrementa la densidad de las salmueras (Figura 4). Esta tendencia también ha sido detectada para las salinas de Guerrero Negro B.C.S., México (Javor 1989) y las del Mediterráneo (Rodríguez-Valera, 1988). Javor (1989), ha señalado que el pH del agua de mar se incrementa con la salinidad hasta que alcanza una concentración del 5 ‰ equivalente a valores de gravedad específica (g.e.) < 1.1 (casi pH 9), y entonces decae conforme se incrementa la salinidad. Una posible explicación de este descenso en los valores de pH está relacionada con las constantes de disociación del sistema carbonato (Ecuación 2).

Ecuación 2



Los investigadores han encontrado que cuando la salinidad incrementa, el pK'_1 y pK'_2 decrecen mientras que el coeficiente de H^+ incrementa (Javor, 1989).

4.2 Características del aislamiento SP8807.

Sólo se pudieron aislar halobacterias a partir de las salmueras de dos cristalizadores, los cuales tenían altos valores de gravedad específica (g.e. 1.230). Dichos aislamientos se denominaron SP8807 1-4 (Salina de Pichilingue, 1988, Junio). Las densidades poblacionales de halobacterias pigmentadas en diferentes estanques cristalizadores de la salina de Pichilingue en Julio de 1988 variaron de 10^2 a 10^6 células /ml.

Las características morfológicas de las colonias y de las células de estos cuatro aislamientos fueron muy similares, razón por la cual se decidió trabajar sólo con una de ellas. Así la cepa SP8807 desarrolla colonias que miden entre 1-2 mm después de una semana de incubación a 38°C, presentando un color naranja-rojizo. Las células son móviles por flagelos peritricos predominantemente planas, de forma irregular y márgenes rectos dando la apariencia de ser triangulares, cuadradas, romboidales, etc. Las células procedentes de medio líquido miden típicamente de 2 a 5 μm de lado x 0.3 a 0.5 μm de espesor (Figura 5, 6 y 7).

El tiempo de generación en medio líquido HEC 150 g/l para la cepa SP8807 es de 3.7 horas. Los cultivos se desarrollan entre 15% y 30 % de sales (w/v). Pero no en 10 % de sales. Por otra parte, la concentración mínima de Mg^{2+} para su crecimiento es de 0.005 M. La capacidad de la cepa SP88097 de crecer en un intervalo de pH entre 6 y 8, pero con un óptimo de 6.5 a 7.5, y a temperaturas entre 25 a 50°C, es un reflejo de las características ambientales en las que se desarrollan estas

bacterias. Las características morfológicas y fisiológicas de esta cepa están resumidas en la Tabla 1, y corresponden a la diagnosis de la Familia Halobacteriaceae (Gibbons, 1974; Torreblanca y col. 1986; Juez y col. 1986). En base al criterio de Tindall y Truper, (1986) y de Juez y col. (1986), en relación a su crecimiento en el intervalo de pH 6-8, la baja demanda de Mg⁺⁺ e intermedia respecto a los requerimientos de sales totales, la cepa SP8807 corresponde al género Haloarcula (Tabla 1).

Tabla 1. Características morfológicas y fisiológicas de la cepa SP8807

Tamaño colonial	1-2 mm
Morfología celular	cuadradas, triangulares y planas
Necesidades fisiológicas para crecer:	
- Concentración mínima de Mg ⁺⁺	0.005 M
- Concentración mínima de sales totales en % de SW	15 %
Intervalo de temperatura para crecer	25-50°C
Intervalo de pH para crecer	6-8
Demanda de aminoácidos	negativa

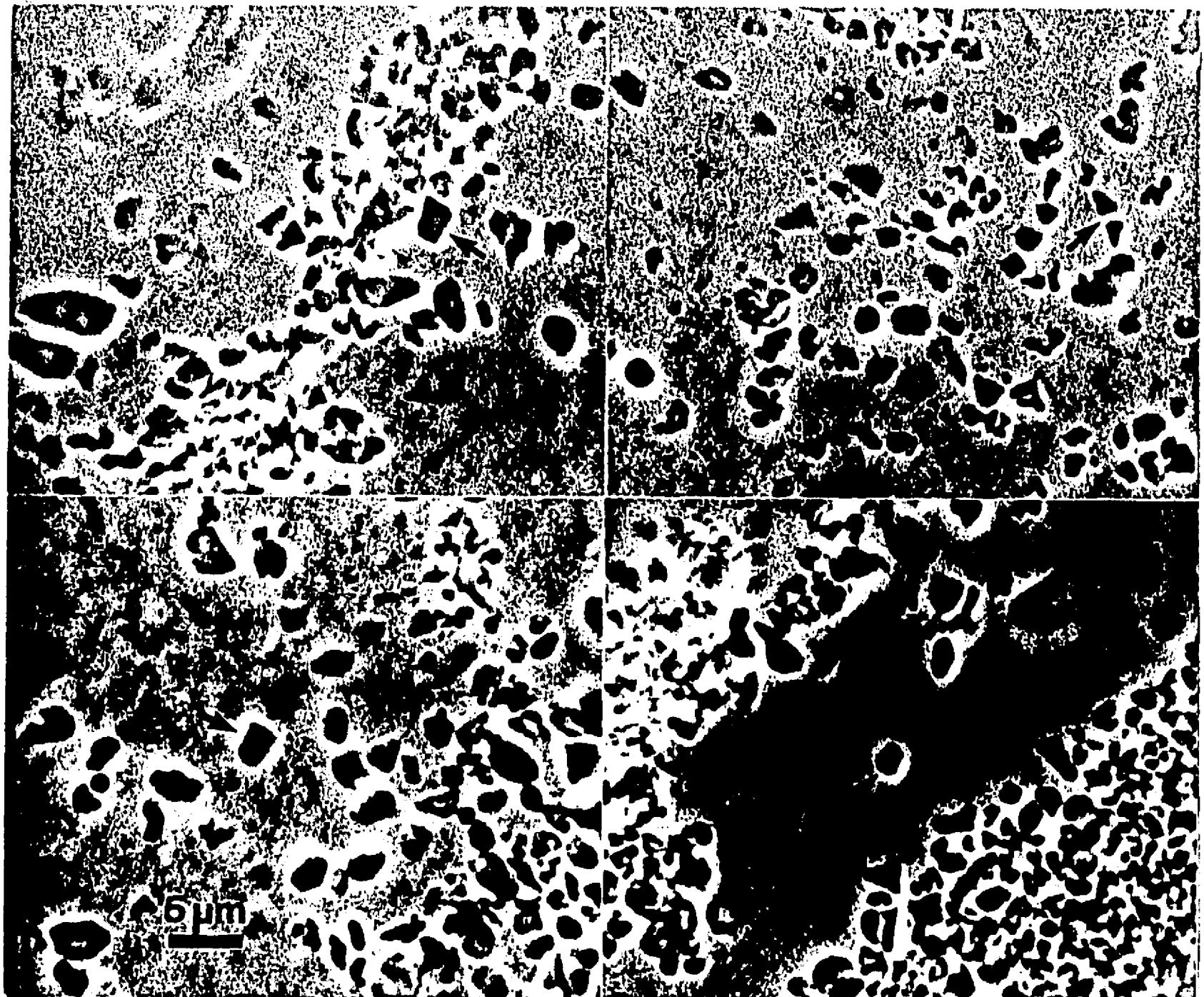


Figura 5. Fotomicrografía empleando iluminación de contraste de fases de células de *Haloarcula* SP8807. Las flechas muestran células con márgenes rectos triangulares y cuadradas algunas de ellas en división. Barra 5 μm .

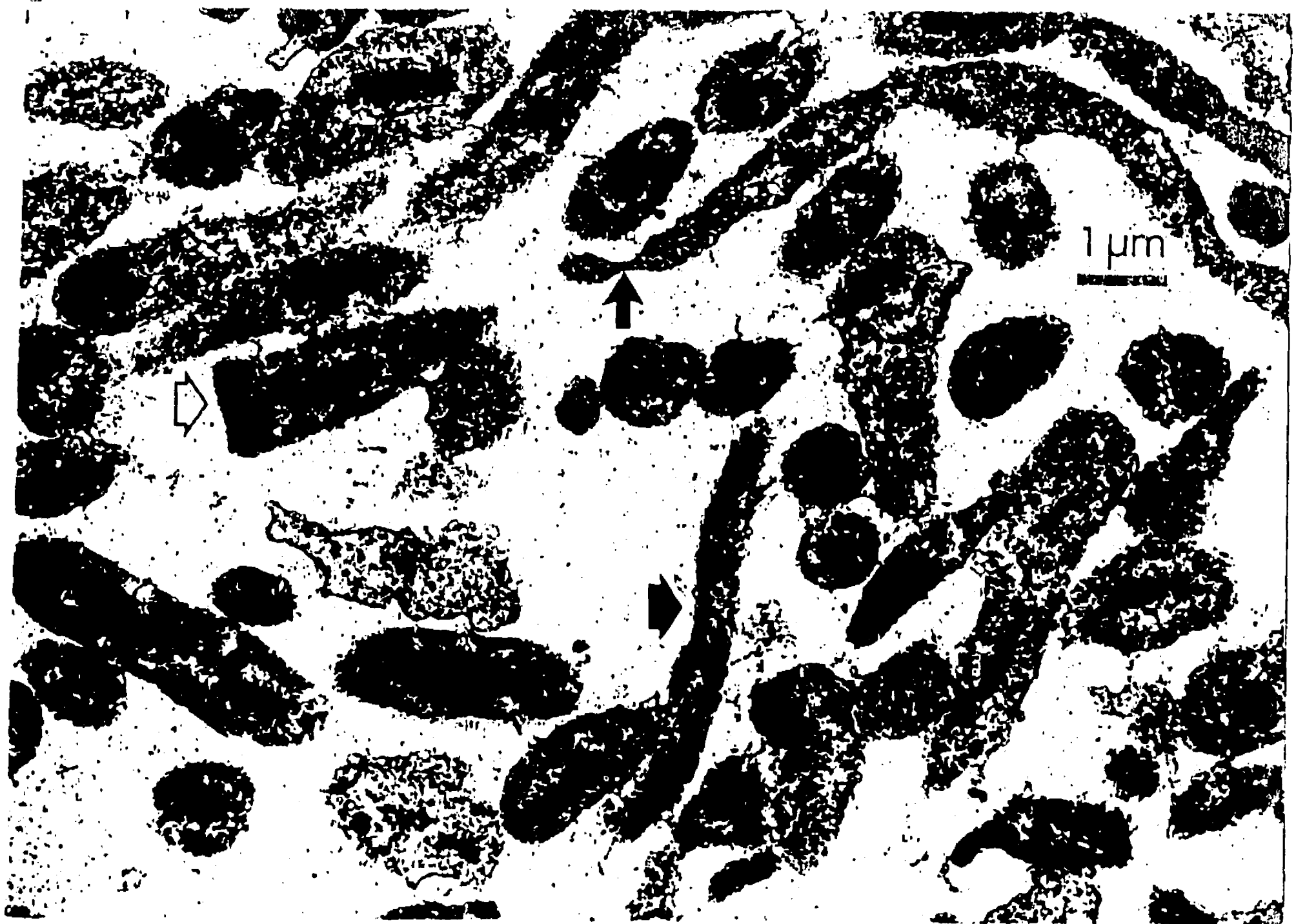


Figura 6. Micrografía electrónica de transmisión de *Haloarcula* SP8807. La flecha vacía muestra una célula triangular y la flecha llena una sección en la cual se puede notar su naturaleza plana. También se observan secciones longitudinales y transversales de células con forma de bastones. Barra 1 μ m.



Figura 7. Micrografía que muestra la presencia de flagelos peritricos individuales o en paquetes preparados por criofractura, grabado y sombreado. Barra 0.22 μm .

4.3 Análisis de lípidos del aislamiento SP8807.

Los análisis de los lípidos polares de la cepa SP8807 fueron realizados por cromatografía de capa fina equipado con un detector de ionización de flama (TLC/FID) y son mostrados en la Tabla 2. Las células de SP8807 contienen, en orden de abundancia, 54-70% de fosfatidil glicerol (PG), 16-29% de diglicosil diéter (DGD-2), 10-19% de fosfatidilglicerofosfato (PGP), 3.5-8% de triglicosil diéter (TGD-2), y 0.4-6.8% de fosfatidilglicerofosfato (PGS). Este perfil de lípidos polares es singular del género *Haloarcula* (Grant y Larsen, 1989a), lo que confirma la identificación presuntiva con criterios morfológicos y fisiológicos antes descrita.

4.4 Características bioquímicas.

Las características bioquímicas de la cepa SP8807 están descritas en la Tabla 3. Los azúcares glucosa, fructosa, manosa, arabinosa, xilosa, sacarosa, lactosa, manitol, celobiosa, glicerol, y sorbitol fueron empleados como única fuente de carbono con la concomitante producción de ácido. Para este aislamiento no se detectó la capacidad de hidrolizar la caseína, gelatina, almidón y urea. En cambio si se observó la reducción de nitratos a nitritos sin producción de nitrógeno molecular, pero

Tabla 2. Composición de lípidos polares de halobacterias por cromatografía de capa fina usando un detector de ionización de flama (% area) (n=5).

Lípidos polares	Rf	H.s.	H.m.	H.v.	SP8807
PG	0.782	69-99	43-94	50-82	54-70
DGD-2	0.690	-----	-----	20-24	16-29
PGP	0.593	5-6	0.8-3.6	10-16	10-19
TGD-2	0.438	-----	-----	13-21	3.5-8
PGS	0.305	-----	-----	22-26.7	0.4-6.8
S-DGD	0.273	-----	28-74	-----	-----
STGD-1	0.160	3-23	-----	-----	-----
S-TeGD	0.078	0.5-3	-----	-----	-----

H.s.= *Halobacterium saccharovorum* ATCC 29252; H.m.= *Haloferax mediterranei* ATCC 33500; H.v.= *Haloarcula vallismortis* ATCC 29715; SP8807= cepa autóctona de la Salina Pichilingue; PG= fosfatidil-glicerol; PGS= fosfatidilglicerosulfato; PGP= fosfatidilgrigerofosfato; S-DGD= diglicosil diétersulfato; DGD-2= diglicosil diéter desconocido; TGD-2= triglicosil diéter; S-TGD-1= triglicosil diétersulfato; S-TeGD=tetraglicosil diétersulfato.

Tabla 3. Características bioquímicas y de susceptibilidad a los antibióticos de *Haloarcula* SP8807.

Hidrólisis de la gelatina	negativo	
Hidrólisis de la caseína	negativo	
Hidrólisis del tween 80	positivo	
Hidrólisis del almidón	negativo	
Hidrólisis de la urea	negativo	
Catalasa	positivo	
Citocromo oxidasa	positivo	
Reducción de nitratos a nitritos	positivo	
Producción de N ₂	negativo	
Producción de H ₂ S de tiosulfato	negativo	
Susceptibilidad a antibióticos	Concentración	Susceptibilidad
Novobiocina	30 µg	positiva
Bacitracina	10 U	negativa
Polimixina B	300 U	negativa
Cloranfenicol	30 µg	negativa
Estreptomina	10 µg	negativa
Kanamicina	30 µg	negativa
Gentamicina	10 µg	negativa

no la producción de H₂S a partir de tiosulfato de sodio. Por otra parte presentó actividad de catalasa y citocromo oxidasa y fue resistente a todos los antibióticos excepto bacitracina 10 U (Tabla 3).

En consecuencia, la cepa SP8807 difiere de las especies del género *Haloarcula* previamente descritas por ser incapaz de hidrolizar la urea, la gelatina, y ser resistente a la bacitracina (Tabla 4).

Para establecer la ubicación taxonómica definitiva se requiere de estudios de hibridación de ácidos nucleicos y por el momento han quedado pendientes.

Tabla 4. Características diagnósticas de la cepa SP8807 comparadas con aquellas de las especies previamente descritas del género *Haloarcula*.

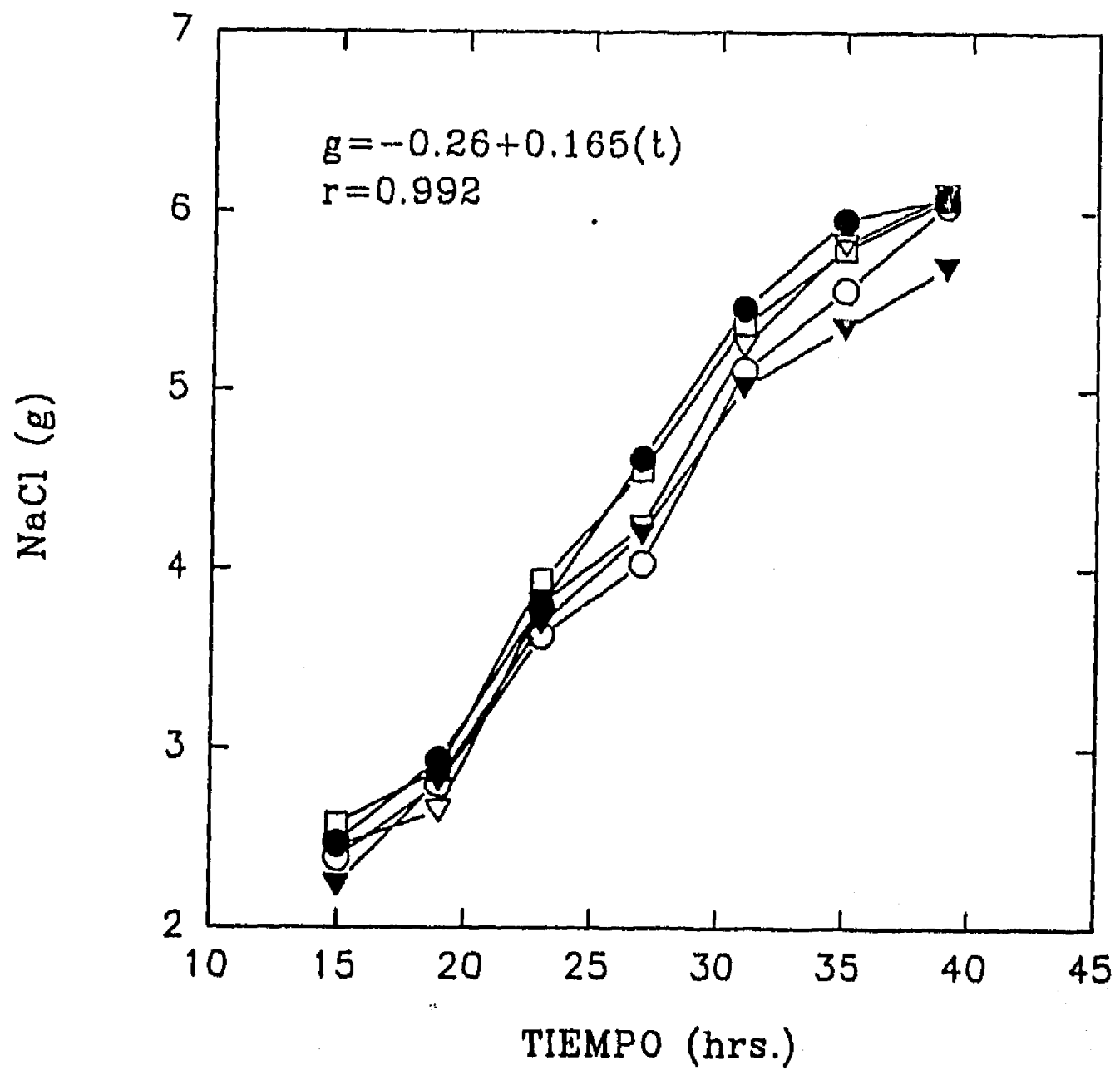
	*Hr. <i>hispanica</i>	*Hr. <i>vallismortis</i>	*Hr. <i>californiae</i>	**Hr. <i>japonica</i>	Hr. <i>SP8807</i>
Tamaño colonial	2 mm	1-2 mm	1-2 mm	1-2 mm	1-2 mm
Movilidad	+	+	n.d.	+	+
Demanda de Mg ²⁺⁺	0.005 M	0.005 M	0.005 M	0.04 M	0.005 M
Hidrólisis de:					
Almidón	+	-	-	-	-
Gelatina	+	-	-	-	-
Tween 80	+	-	-	n.d.	+
Urea	-	+	+	-	-
Resistencia a bacitracina	+	-	-	-	+

Tomado de *Juez y col. 1986; **Takashina y col. 1990.

4.5 Influencia de halobacterias en la tasa de cristalización del NaCl.

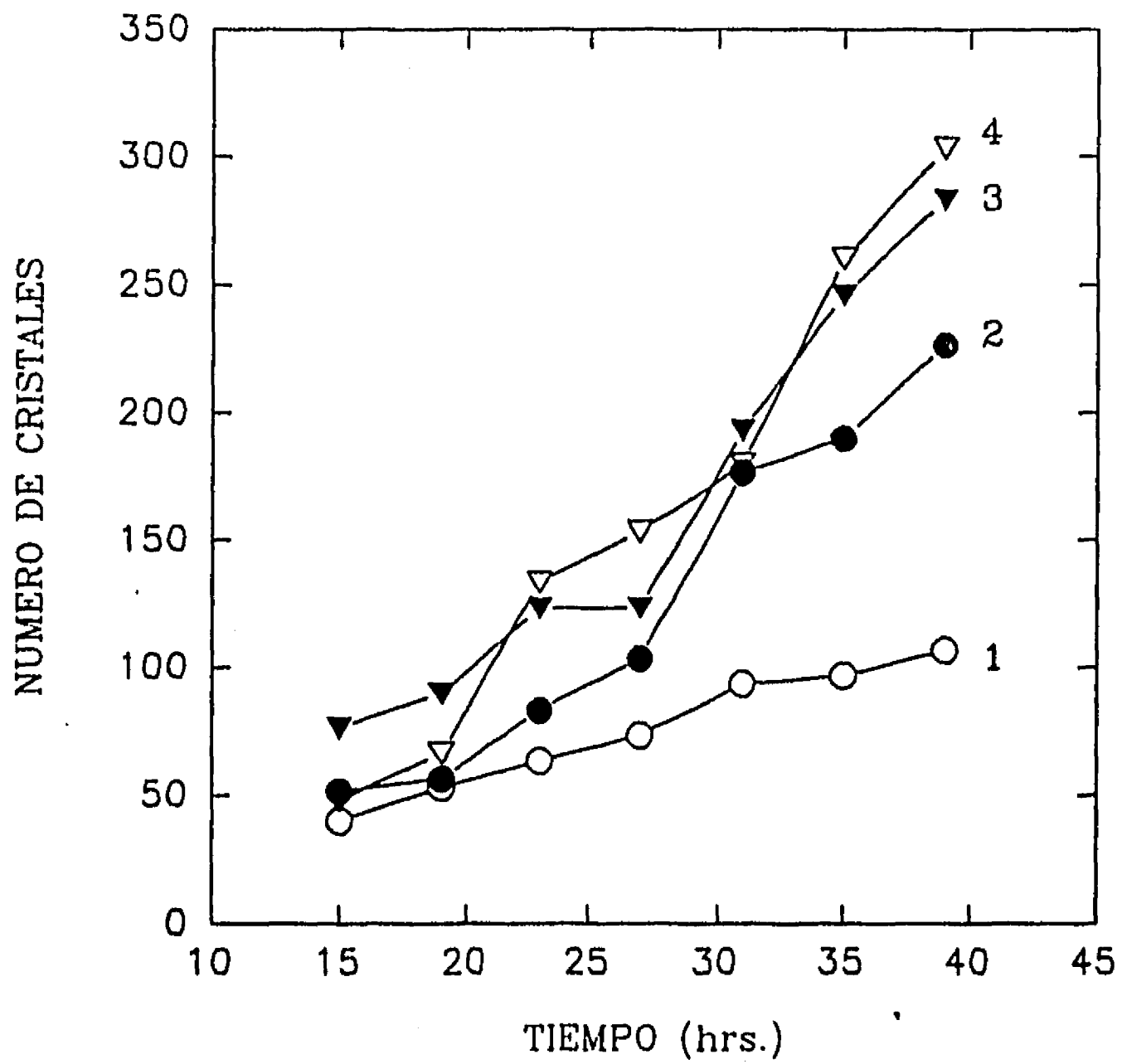
No se encontraron diferencias significativas en el peso en gramos del cloruro de sodio cosechado con o sin halobacterias (Figura 8), sin embargo, la presencia de halobacterias afectó el número y tamaño de los cristales (Figura 9), por convención para esta figura hemos omitido los cristales menores a 1 mm. En el experimento control sin halobacterias se produjeron pocos cristales cúbicos de tamaño homogéneo, mientras que en presencia de halobacterias se produjeron muchos cristales cúbicos de diferentes tamaños, algunos de ellos fueron cúbicos de gran dimensión, 25 mm por lado (Figura 9). Se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) probado con un grado de confianza de $P \leq 0.05$ para evaluar el efecto de la morfología celular de las halobacterias sobre el número y tamaño de los cúbicos de NaCl.

Cuando se midió el número de cristales formados, se observó una diferencia estadística significativa con el control, pero también el análisis estadístico mostró que las células en forma de bastón de *Halobacterium halobium* generan significativamente menos cristales cúbicos que el grupo de las cepas de bacterias



- NaCl
- *Halobacterium halobium* NRC 817
- ▽ *Haloarcula vallismortis* ATCC 29252
- *Haloarcula* SP8807
- ▼ *Haloferax mediterranei* ATCC 33500

Figura 8. Efecto de halobacterias sobre la cosecha de cloruro de sodio (en gramos), a partir de una solución de NaCl al 30%. La ecuación corresponde al control.



- 1 NaCl (1-8 mm)
- 2 *Halobacterium halobium* NRC 817 (1-25 mm)
- 3 *Haloarcua vallismortis* ATCC 29252 (1-15 mm)
- 4 *Haloarcua* SP8807 (1-15 mm)

Figure 9. Influencia de halobacterias sobre el número y tamaño de cristales de halita a partir de una solución de NaCl al 30% .

angulares *H. vallismortis* y *Haloarcula* SP8807 (Figura 9). Estas diferencias pueden ser explicadas asumiendo que las halobacterias con formas celulares plano angulares juegan un papel importante. Es decir, las halobacterias (*Haloarcula* spp.) con formas cuadradas o triangulares proporcionan un molde que puede imitar la estructura del cristal, en una forma similar a como las partículas extrañas actúan como semillas o núcleos para promover la formación de cristales en soluciones saturadas (Perry, 1964; Norton y Grant, 1988; Wolber y Warren, 1989). Los resultados que se presentan aquí sobre el incremento en el número de cristales cúbicos en presencia de halobacterias son apoyados por los reportados por Norton y Grant, 1988, quienes estudiaron la sobrevivencia de halobacterias dentro de las inclusiones fluidas en cristales de sal y colateralmente investigaron el efecto de las halobacterias en el número de cristales de NaCl de 2 a 4 mm cosechados.

La formación de un gran número de cristales cúbicos en presencia de halobacterias fue confirmado a nivel micrométrico (Tabla 5, Figura 10). En adición un fragmento de capa S sin contraste con metales pesados mostraron partículas simétricas asociadas, interpretadas como cristales de halita. Esta imagen sugiere que esta estructura bacteriana está relacionada con la formación de cristales de halita (Figura 11).

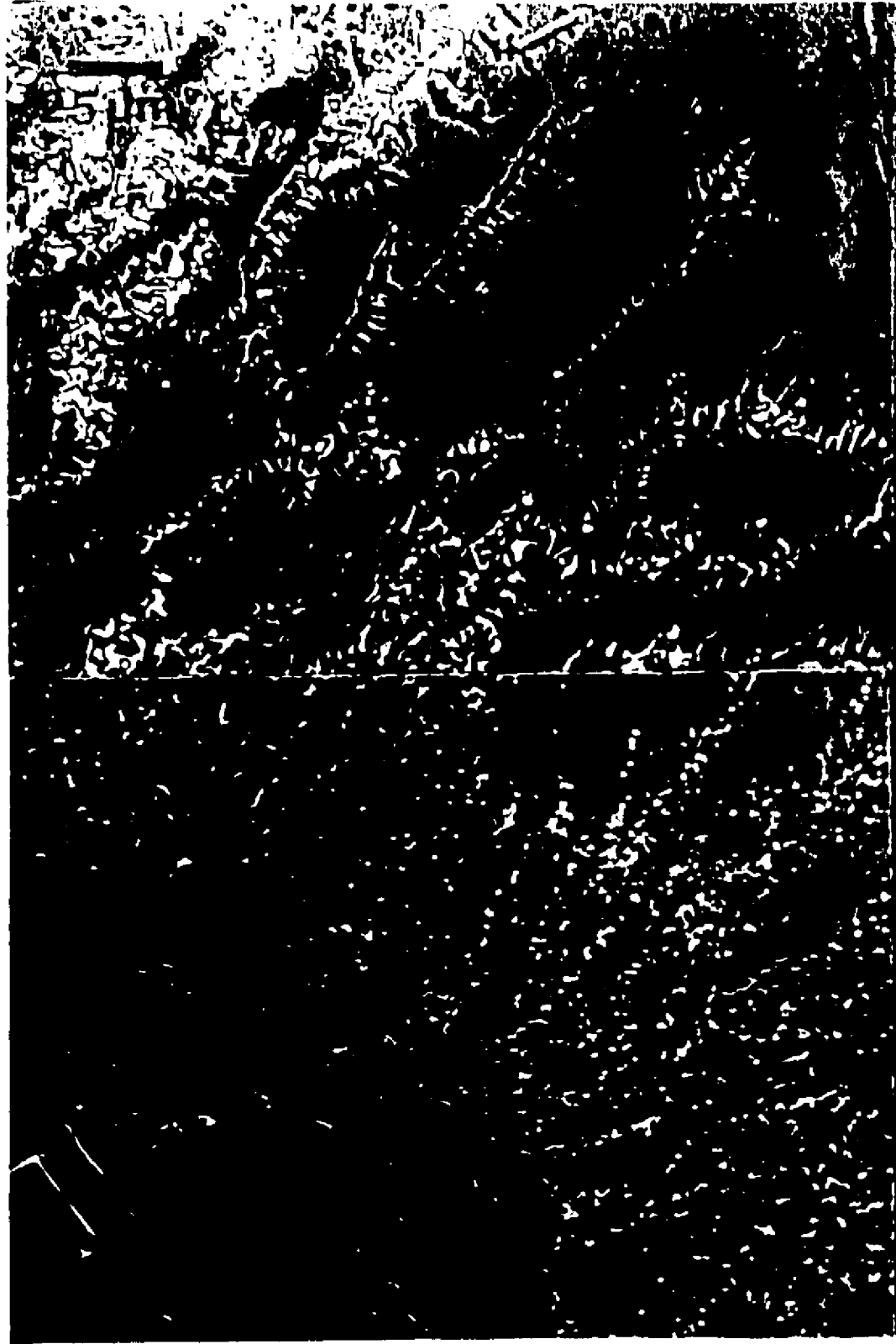


Figura 10. (A) Muestra una fotomicrografía de cristales dendríticos de cloruro de sodio producidos por la adición de células de *Haloarcula* cepa SP8807. La barra representa 25 μm . (B) Micrografía de barrido que muestra las tendencias en la formación de cristales, en presencia de halobacterias. Note el gran número de partículas, las cuales constituyen la forma del cristal dendrítico (flecha). La barra representa 0.1 mm.



Figura 11. Fragmento de capa S sin teñir de *Haloarcula cepa* SP8807. Las flechas muestran cuerpos simétricos de 50 nm de diámetro, que se interpretan como cristales de halita. La barra representa 0.5 μm .

La función de las capas de superficie de cianobacterias en la formación de granos finos de calcita propuesta por Schultze-Lam y col. (1992), pudiese ser ampliada a las capas S de las halobacterias en la formación de cristales de halita. Esta aseveración, sin embargo, requerirá estudios ulteriores.

4.6 Formación de cristales de NaCl.

La halita tiene una forma cristalina basada en una simetría cúbica. Estudios de microscopía de gotas evaporadas de salmuera con aditivos orgánicos e inorgánicos revelaron formas cristalinas de NaCl diferentes a cubos (Ploss, 1964; Shuman, 1965)). La presencia de *Haloarcula* cepa SP8807 causó la formación de cristales dendríticos de halita, por fuera y entre los cristales cúbicos (Figura 10).

La observación de cristales dendríticos a altos aumentos mostró una relación entre las halobacterias y la superficie de los cristales de halita y también confirmó que las células modifican el hábito de crecimiento de los cristales de halita resultando formas irregulares (Figura 12). Esta observación fue verificada con las cepas *Halobacterium halobium* NRC 817, *Haloarcula vallismortis* ATCC 29715, y *Haloferax mediterranei* ATCC 33500, quienes fueron capaces de inducir la formación de cristales dendríticos (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de *Haloarcula* cepa SP8807 sobre el número e intervalo de tamaño de cristales cúbicos, medidos a aumentos de 30X y 200X. Los datos provienen de cristales cosechados después de 10, 20 y 30 minutos de incubación y observados bajo un microscopio electrónico de barrido.

Número de Cristales				
Intervalos de tamaño (μm)	Solución de NaCl 30%		<u>Haloarcula</u> 1×10^7 células/ml	
	30X	200X	30X	200X
1-100	159 \pm 75	432 \pm 220	706 \pm 23	1217 \pm 421
101-200	43 \pm 4	12 \pm 4	58 \pm 29	13 \pm 7
201-300	12 \pm 3	2 \pm 1	12 \pm 5	1 \pm 1
301-400	6 \pm 1	0	5 \pm 1	0

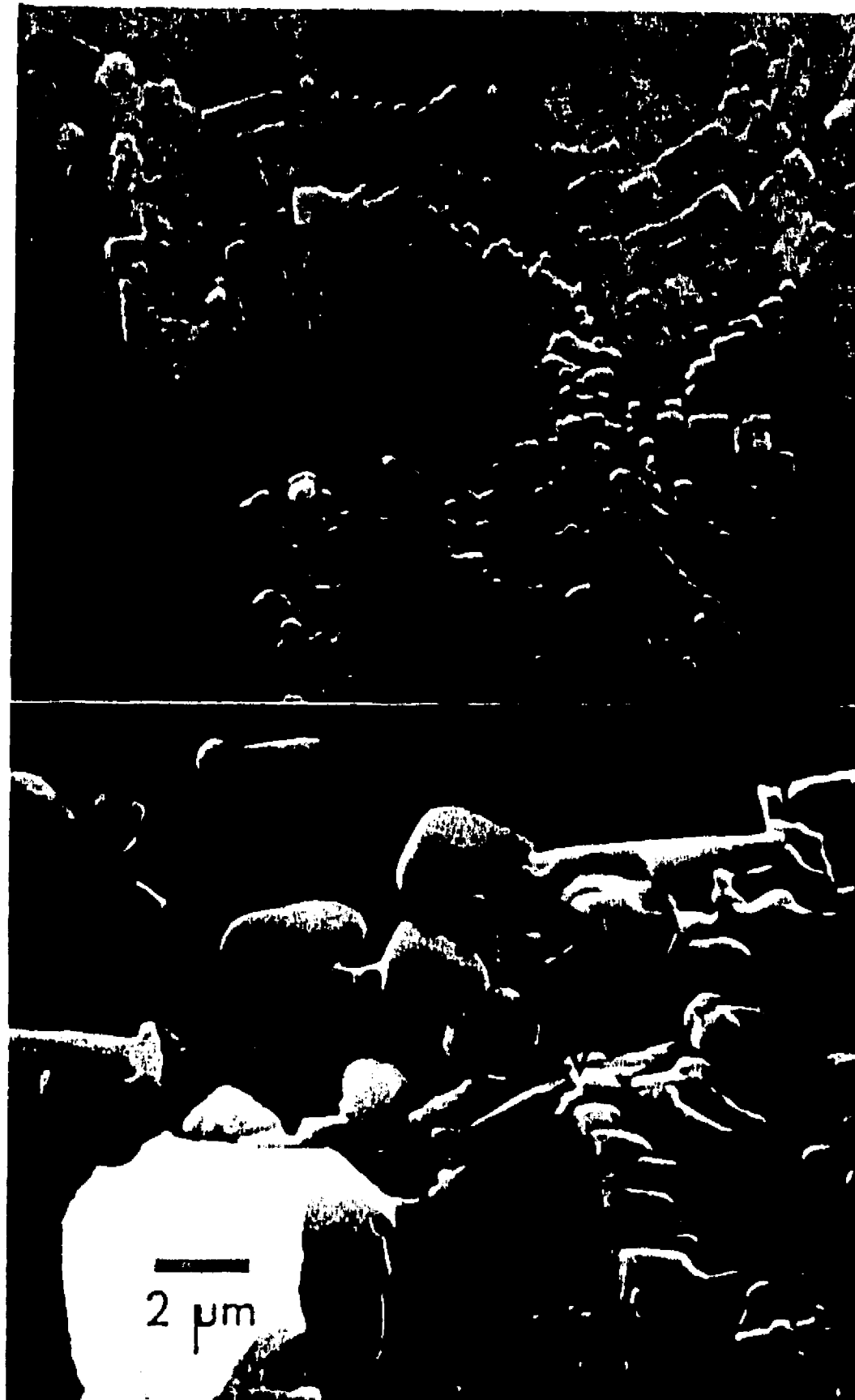


Figura 12. Detalles de la forma de los cristales dendríticos. (A) La forma dendrítica esta dada por microcristales cúbicos y planos (flechas). La barra representa 5 μm . (B) Las flechas muestran la presencia de células de halobacterias las cuales se asocian con cristales amorfos de halita (flecha vacía). La barra representa 2 μm .

Tabla 6. Efecto de diferentes eubacterias y arqueobacterias halófilas sobre la formación de cristales de NaCl.

Organismos	Forma	Frecuencia (%)
Eubacteria		
<i>A. brasilense</i> Cd DSM 1843	cúbica	100
Eubacterias halófilas		
<i>V. parahaemolyticus</i> MMF6	cúbica	100
<i>Planococcus</i> sp. M6P2	cúbica	100
Arqueobacterias halófilas		
<i>H. halobium</i> NRC 817	cúbica	50
	dendrítica	50
<i>H. vallismortis</i> ATCC 29715	cúbica	50
	dendrítica	50
<i>H. mediterranei</i> ATCC 33500	cúbica	50
	dendrítica	50
<i>Haloarcula</i> sp. SP8807	cúbica	50
	dendrítica	50

En contraste las eubacterias probadas no produjeron cristales dendríticos, lo que podría ser explicado por las diferencias químicas y estructurales de sus superficies celulares (Tabla 6).

Las modificaciones en la forma de los cristales de NaCl inducidos por aditivos, células o macromoléculas de halobacterias han sido atribuidas a la participación de monocapas de macromoléculas y envolturas celulares en los fenómenos de superficie asociados a la precipitación de minerales, señalándose que las tasas de difusión de los iones pueden ser cambiadas hasta por un factor de 10,000 y alterar por esta causa el curso de la cristalización (Krumbein 1985). Para intentar explicar estos fenómenos se consideró importante determinar el papel de las proteínas de las envolturas celulares de SP8807 sobre la formación de cristales dendríticos.

Los estudios electroforéticos (SDS-PAGE) de la capa S purificada de *Haloarcula* SP8807 mostró una banda única fuertemente impregnada con plata y un peso molecular de 66 kDa (Figura 13). Sin embargo, geles teñidos para detectar glicoproteínas no mostraron bandas.

Está bien establecido que las capas S de la mayoría de la halobacterias están compuestas por glicoproteínas (Messner y Sleytr, 1991). Reportes sobre la estructura química detallada de las glicoproteínas (Sumper, 1987) y de su estructura primaria en *Halobacterium halobium* (Lechner y Sumper 1987) han confirmado la mayoría de los datos producidos previamente. La glicoproteína de

la capa S de *H. halobium* tiene un peso molecular de casi 120 kDa (núcleo de la proteína= 87 kDa). Recientemente, Sumper y col., (1990) reportaron una caracterización química parcial de la glicoproteína de la capa S de *Haloferax volcanii* en las cuales el péptido maduro contiene 794 residuos de aminoácidos con un peso molecular calculado de 81 kDa. Aunque la glicosilación no es un paso obligatorio en la biosíntesis de la capa S, éste representa una importante modificación de la proteína la cual puede adicionar un gran potencial a la diversificación de las propiedades de las superficies celulares bacterianas (Messner y Sleytr, 1992). En este contexto, es interesante indicar que bajo condiciones óptimas de cultivo continuo, algunas cepas bacterianas han perdido su capacidad para glicosilar proteínas de la capa S (Messner y Sleytr, 1991).

Los resultados de SDS-PAGE fueron correlacionados con tinciones negativas que fueron observadas por microscopía electrónica de transmisión las cuales mostraron trasas de periodicidad y regiones con apariencia de panal de abejas de las unidades morfológicas de proteínas de la capa S autoensambladas (Figura 14). La capa S de *Haloarcula* SP8807 (20 µg/ml) produjo cristales dendríticos en lugar de cristales cúbicos de halita (Figura 15). Estos resultados sugieren que la capa S de *Haloarcula* SP8807 es la responsable de la modificación de los hábitos de crecimiento de los cristales de halita.

Empleando bajas concentraciones de sales de cloruro de sodio y de magnesio los esferoplastos son extremadamente frágiles

(Jarrel y Sprott, 1984) y algo de lisis ocurrió, lo que se reflejó en los experimentos de electroforesis al aparecer muchas bandas de proteínas en el SDS-PAGE. Sin embargo, una banda tenue a 66 kDa en la muestra de esferoplastos fue detectada (Figura 13). Jarrel y Sprott (1984) reportaron cuerpos esféricos producidos de células de la fase logarítmica, que resultaron ser esferoplastos que también tenían capa S, aunque aparentemente más delgada que la de las células originales de halobacterias con formas de bastón.

El efecto de diferentes compuestos en la inducción de cristales dendríticos de halita se muestra en la Tabla 7. Como previamente se publicó (Ploss, 1964; Shuman, 1965) y reportamos en la Tabla 7, el ferrocianuro fue capaz de inducir la formación de cristales dendríticos, pero interesantemente, las sales de ferrocianuro a 250 $\mu\text{g/ml}$ causaron el crecimiento de cristales de cloruro de sodio con formas dendríticas dentro del cristal cúbico.

La formación despreciable de cristales dendríticos de halita por el hidrolizado de caseína (1200 a 2000 $\mu\text{g/ml}$) sugiere que algunos péptidos fueron responsables de este fenómeno. Sin embargo, los residuos de aminoácidos probados no formaron cristales dendríticos (Tabla 7). La ausencia de la formación de cristales dendríticos en la presencia de silica gel demostró que este fenómeno no es resultado del efecto de partícula. Además, nuestros resultados mostraron que las células y/o la capa S de halobacterias comunes en los ecosistemas hipersalinos, son

capaces de inducir la formación de cristales dendríticos de cloruro de sodio.

Observaciones con el microscopio electrónico de barrido de estos cristales dendríticos de halita y de sus ramas mostraron que esas formas son el producto de cristales cúbicos planos, combinados con cristales amorfos y células de halobacterias (Figura 12). La conservación y defectos de la estructura interna de esos cristales de cloruro de sodio deberán ser estudiados en el futuro.

Estos resultados muestran que las células de halobacterias, y/o el carbón orgánico representado por las proteínas de las capas de superficie de las halobacterias, podrían ser capaces de inducir la formación de cristales dendríticos de NaCl en los ecosistemas hipersalinos.

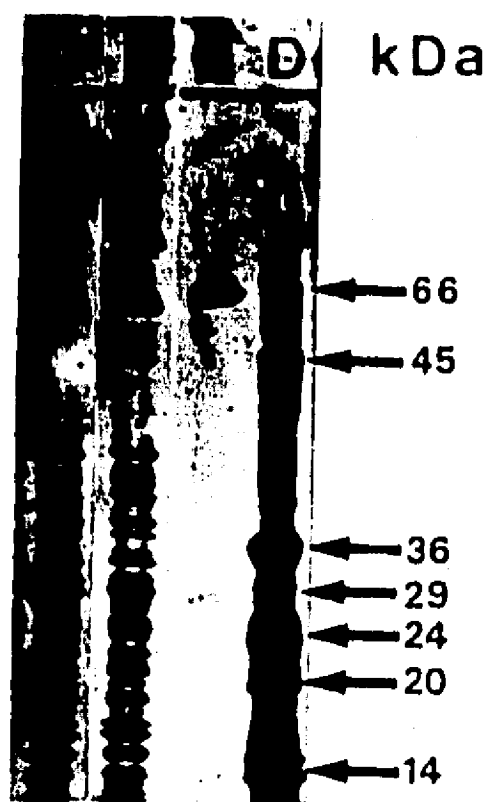


Figura 13. Gel de poliacrilamida en gradiente 4-15% para electroforesis, desnaturalizado con SDS (SDS-PAGE) y teñido con plata. Carril (A) perfil de los esferoplastos de *Haloarcula* cepa SP8807; B, perfil de proteínas de la totalidad de las células de SP8807; C, subunidades de proteína de la capa S de la cepa SP8807; D, perfil de marcadores de peso molecular.

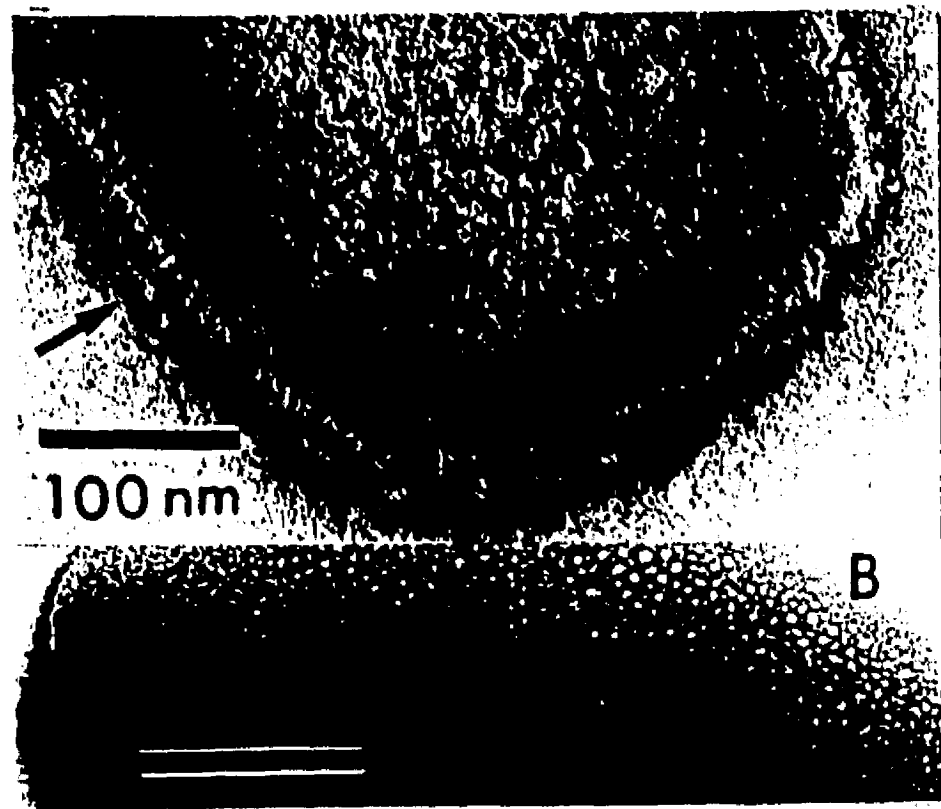


Figura 14. Tinciones negativas (2% acetato de uranilo) de la capa S autoensamblada de *Haloarcula* cepa SP8807. (A) Capa S sin fijar y reensamblada con CaCl_2 10 mM, pH 6, las flechas muestran un área con trasas de periodicidad en una dimensión. La barra representa 100 nm. (B) Fragmento de capa S parecido a una hoja plana, la cual parece a un panal de abejas. El círculo muestra el arreglo hexagonal de sus unidades morfológicas. La tinción se realizó en presencia de solución compuesta por 2 M NaCl, 12.5 mM KCl, 40 mM MgSO_4 pH 3.2. La barra representa 200 nm.

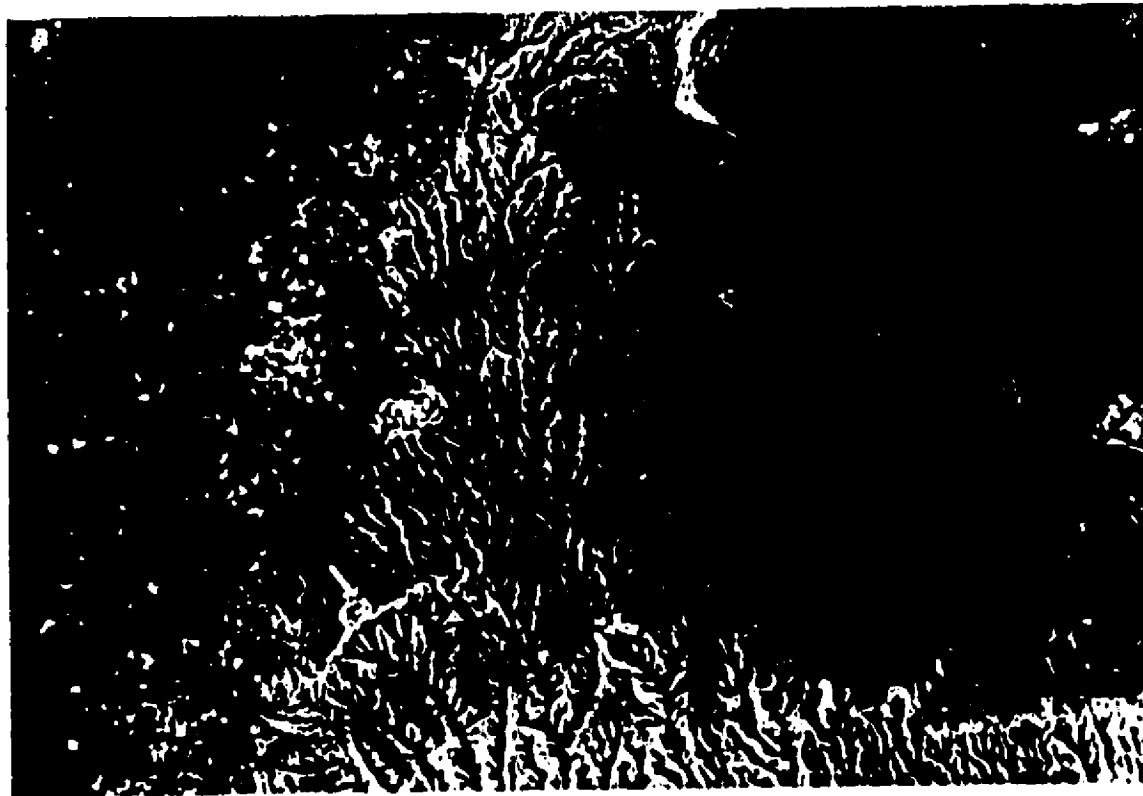


Figura 15. Cristales dendríticos de halita causados por la presencia de la capa S ($20 \mu\text{g/ml}$) de *Haloarcula* cepa SP8807. La barra representa $50 \mu\text{m}$.

Tabla 7. Efecto de materiales disueltos y suspendidos sobre la formación de cristales de halita.

Agente	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Forma	Abundancia relativa ^a	Frecuencia (%) ^b
Ferrocianuro	250	dendrítica ^c	(+++)	100
Glucosa	250	cúbica	(+++)	100
Glicerol	250	cúbica	(+++)	100
Aminoácidos ^e	200-2000	cúbica	(+++)	100
Casaminoácidos	200-600	cúbica	(+++)	100
		dendrítica ^d	(++)	15
	1200	"	(+)	55
		cúbica	(++)	30
		dendríticad	(+++)	10
		"	(+)	40
2000	"	(+)	40	
	cúbica	(++)	10	
	cúbica	(+++)	100	
	cúbica	(+++)	100	
Silica gel	100-2000	cúbica	(+++)	100
Células de				
Halobacteria	200 ^f	dendrítica ^d	(+++)	50
Capa S	20 (eq)g	cúbica	(++)	50
		dendríticad	(+++)	50
		cúbica	(++)	50

a= (+++) abundantes; (++)= comunes; (+)= presentes.

b= Frecuencia encontrada en 60 experimentos.

c= Dentro de los cristales cúbicos (50 μm diámetro promedio de las ramas).

d= Entre los cristales cúbicos (10 μm diámetro promedio de las ramas).

e= D-L alanina, L(-) prolina, glicina, D-L serina, L cisteína, D-L treonina, L(-) tirosina, L histidina, L(+) lisina y L ácido glutámico.

f= En base al peso seco.

g= En base a la determinación de proteínas con azul de Coomasie.

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este documento permitieron afirmar que las células de halobacterias modifican in vitro los eventos de la mineralización del cloruro de sodio. La confirmación de la hipótesis de trabajo planteada y respuestas a la pregunta que resultan de la misma, se presentan a continuación y su publicación formal aparece en el Geomicrobiology Journal (López-Cortés y col. 1994). Una copia de este artículo se localiza en el Apéndice III de esta tesis.

5.1 El papel de las halobacterias pigmentadas sobre el incremento de la temperatura en cristalizadores.

Los cristalizadores más turbios y coloridos de la salina de Pichilingue se caracterizan por poseer los valores más altos de temperatura (39°C). Esta observación apoya la hipótesis que postula que los cristalizadores turbios y coloridos por la actividad de halobacterias, pueden calentarse más rápido acelerando así las tasas de evaporación (Jones y col. 1981; Javor, 1989). Por tanto, la presencia de halobacterias parece favorecer la tasa de cristalización de halita. De estas observaciones se podría recomendar favorecer el desarrollo moderado (10^3 - 10^4 células/ml) de halobacterias que posean bacterioruberina y bacteriorodopsina para que los cristalizadores sean coloridos y puedan alcanzar temperaturas que favorezcan la evaporación y en consecuencia la producción de sal.

5.2 Aislamiento y descripción de *Haloarcula* cepa SP8807.

Los cristalizadores de la salina de Pichilingue de 1988 a 1991 se caracterizaron por contener halobacterias. En particular el aislamiento SP8807 resultó ser miembro del género *Haloarcula* caracterizado por contener triglicosil-diéter (TGD-2) en su membrana celular. Los rasgos fenotípicos diagnósticos de las especies conocidas para el género *Haloarcula* no concordaron con aquellos encontrados en la cepa SP8807, por lo cual se puede presumir que se trata de una especie nueva. Sin embargo, para poder aclarar su ubicación taxonómica a nivel de especie serán necesarios estudios genéticos sobre la hibridación de sus ácidos nucleicos (DNA-DNA, DNA-RNA) para compararse con los de especies ya descritas y así complementar la identificación fenotípica.

5.3 Influencia de las halobacterias en el número, tamaño y forma de los cristales de NaCl.

En general la presencia de arqueobacterias halófilas extremas, *in vitro*, no parece afectar la cosecha de cloruro de sodio. No obstante, la producción de un mayor número de cristales cúbicos de tamaño heterogéneo, de cristales cúbicos grandes, y de la formación de cristales dendríticos en presencia de halobacterias y/o el carbón orgánico representado por las proteínas de la capa de superficie celular de halobacterias, confirman la hipótesis de trabajo que atribuye a las halobacterias un papel importante en la disminución de la calidad de la sal de cloruro de sodio. La formación de un mayor número de cristales cúbicos, de cristales

cúbicos grandes y de cristales dendríticos, es de importancia comercial, y está económicamente asociada a la demanda en el mercado. Perry, (1976) apunta la necesidad de que los cristales sean de tamaño uniforme para que su aspecto sea satisfactorio, e impedir la formación de terrones, así como para facilitar su lavado y de que su comportamiento sea uniforme al utilizarlos. Sin embargo, para fines industriales a veces se exige que el material se encuentre en forma de grandes cristales, lo que en general no está justificado por ninguna ventaja real de los cristales grandes en relación con los pequeños. En algunos casos se exige también una forma determinada (por ejemplo, en agujas, en lugar de escamas o cubos), a pesar de no existir una propiedad específica que signifique ventaja alguna.

En conclusión se sugiere para las salinas comerciales investigaciones y estudios de monitoreo sobre los tipos y concentraciones de halobacterias y carbono orgánico disuelto en estanques cristalizadores, correlacionadas con la calidad de la sal cosechada, lo cual podría ser una herramienta biotecnológica importante (López-Cortés y col. 1994). No obstante será necesario comprobar esta hipótesis a escala del cristalizador y establecer qué carga de halobacterias y concentración de carbono orgánico disuelto son aceptables para la producción de sal de alta calidad.

LITERATURA CITADA

1. **Davis, J.S.** 1978. Biological communities of a nutrient enriched salina. *Aquat. Bot.* 4: 23-42.
2. **De Macario, E.C., H. König y A. J. L. Macario.** 1986. Immunologic distinctiveness of archaebacteria that grow in high salt. *J. Bacteriol.* 168: 425-427.
3. **Ehrlich, H.L.** 1990. *Geomicrobiology*. Marcel Dekker, Inc., New York. 646 pp.
4. **Gavish, E., W.E. Krumbein y J. Halevy.** 1985. Geomorphology, mineralogy and groundwater geochemistry as a factor of the hydrodynamics system of the gavish sabkha. Páginas 186-217. in G.M. Friedman and W.E. Krumbein, eds. *Hypersaline ecosystems*. Springer-Verlag, New York.
5. **Gibbons, N.E.** 1974. Family V. Halobacteriaceae fam. nov. Páginas 269-273. in R.E. Buchanan and N.E. Gibbons, eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th edition, Williams and Wilkins, Baltimore.
6. **Grant, W.D. y H. Larsen.** 1989a. Halobacteriales. Páginas 2216-2233. in J.T. Stanley, ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th edición. Vol 3. Williams and Wilkins, Baltimore.
7. **Grant, W.D. y H. Larsen.** 1989b. The genus Haloarcula. Páginas 2224- 2226. in J.T. Stanley, ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th edición. Vol. 3. Williams and Wilkins, Baltimore.
8. **Hecht, K., F. Wieland, and R. Jaenicke.** 1986. The cell surface glycoprotein of Halobacterium halobium. *Biol. Chem.* 367: 33-38.
9. **Javor, B.** 1989. *Hypersaline environments*. Springer-Verlag, New York. 328 pp.
10. **Jarrell, K.F., and G.D. Sprotl.** 1984. Formation and regeneration of Halobacterium spheroplasts. *Curr. Microbiol.* 10: 147-152.
11. **Jones, A.G., C.M. Ewing, and M.V. Melvin.** 1981. *Biotechnology of solar saltfields*. *Hydrobiol.* 82: 391-406.

12. **Juez, G., F. Rodríguez-Valera, A. Ventosa y D.J. Kushner.** 1986. Haloarcula hispanica spec. nov. and Haloferx gibbonsii spec. nov., two new species of extremely halophilic archaeobacteria. *System. Appl. Microbiol.* **8**: 75-79.
13. **Kates, M.** 1972. *Techniques of Lipidology*. North Holland American Elsevier, New York. 351 pp.
14. **Krieg, N.R.** (ed.) 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. I*, Williams and Wilkins, Baltimore. 964 pp.
15. **Krumbein, W.E.** 1985. Applied and economic aspects of sabkha systems-genesis of salt, ore and hydrocarbon deposits and biotechnology. Páginas 426-436. in G.M. Friedman y W.E. Krumbein, eds. *Hypersaline Ecosystems*. Springer-Verlag, New York.
16. **Koning, H.** 1988. Archaeobacterial cell envelopes. *Can. J. Microbiol.* **34**: 395-406.
17. **Larsen, H.** 1981. The Family Halobacteriaceae. Páginas 985-994. in M.P. Starr y col., eds. *The Prokaryotes*. Vol. 1. Springer-Verlag, New York.
18. **López-Cortés, A., J.L. Ochoa, and R. Vázquez-Duhalt.** 1994. Participation of halobacteria on the crystal formation and crystallization rate of NaCl. *Geomicrobiology Journal* **12**:(2) 69-80.
19. **McCaffrey, M.A., B. Lazar y H.D. Holland.** 1987. The evaporation path of seawater and the coprecipitation of Br⁻ and K⁺ with halite. *J. Sed. Petrol.* **57**: 938-939.
20. **Mercer, E.H. y M.S.C. Birbeck.** 1972. *Electron microscopy*. Blackwell Scientific Publications, New York. 134 pp.
21. **Mescher, M.F., J.L. Strominger, y S.W. Watson.** 1974. Protein and carbohydrate composition of the cell envelope of Halobacterium salinarum. *J. Bacteriol.* **120**: 945-954.
22. **Mescher, M.F. and J.L. Strominger.** 1976. Purification and characterization of a procaryotic glycoproteins from cell envelope of Halobacterium salinarum. *J. Biol. Chem.* **251**: 2005-2014.

23. **Norton ,C. and W.D. Grant.** 1988. Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt crystals. *J. Gen. Microbiol.* **134:** 1365-1373.
24. **Norton, C.F.** 1992. Rediscovering the ecology of halobacteria. *ASM news* **58:** 363-367.
25. **Perry, J.H.** 1976. *Manual del Ingeniero Químico.* Unión Tipográfica Hispano-Americana, México.
26. **Floss, R.S.** 1964. Sodium chloride: modification of crystal habit chemical agents. *Science* **144:** 143-144.
27. **Pursen, B.H.** 1985. Coastal evaporite systems. Pages 72-102. in G.M. Friedman y W.E. Krumbein, eds. *Hypersaline Ecosystems.* Springer-Verlag. New York.
28. **Oren, A.** 1983. Bacteriorhodopsin-mediated CO₂ photoassimilation in the Dead Sea. *Limnol. Oceanogr.* **28:** 33-41.
29. **Rodríguez-Valera, F., A. Ventosa, G. Juez y J. F. Imhoff.** 1985. Variations of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multipond saltern. *Microb. Ecol.* **11:** 107-115.
30. **Rodríguez-Valera, F., F. Ruiz-Berraquero, y A. Ramos-Cormenzana.** 1980. Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. *J. Gen. Microbiol.* **119:** 535-538.
31. **Rodríguez-Valera, F. (ed.)** 1988. *Halophilic bacteria.* CRC Press, Florida. Vol. I y II. 290 pp.
32. **Schneider, J. y A.G. Herrmann.** 1980. Saltworks-natural laboratories for microbiological and geochemical investigations during the evaporation of seawater. Páginas 371-381 in A.H. Coogan and L. Hauder eds., 5th Symp. Salt 2. North Ohio Geol. Soc. Ohio.
33. **Shuman, A.C.** 1965. Gross imperfections and habit modification in salt crystals. Páginas 246-253 in J.L. Rau ed., 2th Symp. Salt 12. North Ohio Geol. Soc. Ohio.
34. **Smibert, R.M., N. R. Krieg.** 1985. General characterization. Páginas 409-442 in P. Gerhardt y col. eds. *Manual of methods for general bacteriology.* American Society for Microbiology, Washington.

35. **Takashina, T., T. Hamamoto, T. K. Otozai, W.D. Grant, y K. Horikoshi.** 1990. *Haloarcula japonica* sp. nov. a new triangular halophilic Archaeobacterium. *System. Appl. Microbiol.* 13: 177- 181.
36. **Tindall B.J. y H.G. Trüper.** 1986. Ecophysiology of the aerobic halophilic archaeobacteria. *System. Appl. Microbiol.* 7: 202-212.
37. **Torreblanca, M., F. Rodriguez-Valera, G. Juez, A. Ventosa, M. Kamekura and M. Kates.** 1986. Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. *System. Appl. Microbiol.* 8: 89-99.
38. **Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A. D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.P. Starr y H. G. Truper.** 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 463-464.
39. **Wolber, P. y G. Warren.** 1989. Bacterial ice-nucleation proteins. *TIBS* May: 179-182.
40. **Wose, C. y R. S. Wolf (Eds.).** 1985. *The bacteria*, vol. 8. Archaeobacteria. Academic Press, Inc., New York. 491 pp.
41. **Wose, C.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.

APENDICE I

Indice de figuras

Página

- Figura 1. Cristalización del NaCl con tapetes microbianos estables por arriba del lodo reducido. En el canal de la periferia el tapete es completamente removido. Sobre la superficie de las salmueras crecen cristales de NaCl en forma de tolva; sobre el fondo crecen cristales de NaCl cúbicos bien desarrollados. Tomado de Schneider y Herrmann 1980.....8
- Figura 2. Vista aérea de la salina comercial de Pichilingue, B.C.S., México (Secretaria de Comunicaciones y Transportes).....18
- Figura 3. Variación de la temperatura y de la densidad de la salmuera en el proceso de cristalización de dos salinas comerciales. Las mediciones de temperatura de las salmueras de la de la salina de Pichilingue (A) fueron hechas en julio de 1988 a las 11 a.m., y las de la salina de las Bahamas (B) en mayo y junio de 1984.....30
- Figura 4. Variación del pH y del incremento en la densidad de las salmueras en el proceso de cristalización de dos salinas comerciales. Las mediciones de pH de las salmueras de la salina de Pichilingue (A) fueron hechas en julio de 1988 a las 11 a.m. y las de la salina de las Bahamas (B) en mayo y junio de 1984....30
- Figura 5. Fotomicrografía empleando iluminación de contraste de fases de células de Haloarcula SP8807. Las flechas muestran células con márgenes rectos triangulares y cuadradas algunas de ellas en división. Barra 5 μm34
- Figura 6. Micrografía electrónica de transmisión de Haloarcula SP8807. La flecha vacía muestra una célula triangular y la flecha llena una sección en la cual se puede notar su naturaleza plana. También se observan secciones longitudinales y transversales de células con forma de bastones. Barra 1 μm35
- Figura 7. Micrografía que muestra la presencia de flagelos peritricos individuales o en paquetes preparados por criofractura, grabado y sombreado. Barra 0.22 μm36

- Figura 8. Efecto de halobacterias sobre la cosecha de cloruro de sodio (en gramos), a partir de una solución de NaCl al 30% . La ecuación corresponde al control.....42
- Figure 9. Influencia de halobacterias sobre el número y tamaño de cristales de halita a partir de una solución de NaCl al 30%43
- Figura 10. (A) Muestra una fotomicrografía de cristales dendríticos de cloruro de sodio producidos por la adición de células de *Haloarcula* cepa SP8807. La barra representa 25 μm . (B) Micrografía de barrido que muestra las tendencias en la formación de cristales, en presencia de halobacterias. Note el gran número de partículas, las cuales constituyen la forma del cristal dendrítico (flecha). La barra representa 0.1 mm.....45
- Figura 11. Fragmento de capa S sin teñir de *Haloarcula* cepa SP8807. Las flechas muestran cuerpos simétricos que se interpretan como cristales de halita. La barra representa 0.5 μm46
- Figura 12. Detalles de la forma de los cristales dendríticos. (A) La forma dendrítica está dada por microcristales cúbicos y planos (flechas). La barra representa 5 μm . (B) Las flechas muestran la presencia de células de halobacterias las cuales se asocian con cristales amorfos de halita (flecha vacía). La barra representa 2 μm49
- Figura 13. Gel de poliacrilamida en gradiente 4-15% para electroforesis, desnaturalizado con SDS (SDS-PAGE) y teñido con plata. Carril (A) perfil de los esferoplastos de *Haloarcula* cepa SP8807; B, perfil de proteínas de la totalidad de las células de SP8807; C, subunidades de proteína de la capa S de la cepa SP8807; D, perfil de marcadores de peso molecular.....54
- Figura 14. Tinciones negativas (2% acetato de uranilo) de la capa S autoensamblada de *Haloarcula* cepa SP8807. (A) Capa S sin fijar y reensamblada con CaCl_2 10 mM, pH 6, las flechas muestran un área con trasas de periodicidad en una dimensión. La barra representa 100 nm. (B) Fragmento de capa S parecido a una hoja plana, la cual parece a un panal de abejas. La flecha muestra el arreglo hexagonal de sus unidades morfológicas. La tinción se realizó en presencia de solución compuesta por 2 M NaCl, 12.5 mM KCl, 40 mM MgSO_4 pH 3.2. La barra representa 200 nm.....55
- Figura 15. Cristales dendríticos de halita causados por la presencia de la capa S (20 $\mu\text{g/ml}$) de *Haloarcula* cepa SP8807. La barra representa 50 μm56

APENDICE II

Indice de tablas

	Página
Tabla 1. Características morfológicas y fisiológicas de la cepa SP8807.....	33
Tabla 2. Composición de lípidos polares de halobacterias por cromatografía de capa fina usando un detector de ionización de flama (% area) (n=5).....	38
Tabla 3. Características bioquímicas y de susceptibilidad a los antibióticos de <u>Haloarcula</u> SP8807.....	39
Tabla 4. Características diagnósticas de la cepa SP8807 comparadas con aquellas de las especies previamente descritas del género <u>Haloarcula</u>	40
Tabla 5. Efecto de <u>Haloarcula</u> cepa SP8807 sobre el número e intervalo de tamaño de cristales cúbicos, medidos a aumentos de 30X y 200X. Los datos provienen de cristales cosechados después de 10, 20 y 30 minutos de incubación y observados bajo un microscopio electrónico de barrido.....	48
Tabla 6. Efecto de diferentes eubacterias y arqueobacterias halófilas sobre la formación de cristales de NaCl.....	50
Tabla 7. Efecto de materiales disueltos y suspendidos sobre la formación de cristales de halita.....	57

APENDICE III

Publicación

Participation of Halobacteria in Crystal Formation and the Crystallization Rate of NaCl

ALEJANDRO LOPEZ-CORTES
JOSE-LUIS OCHOA
RAFAEL VAZQUEZ-DUHALT

Division of Experimental Biology
Center for Biological Research (CIB)
Baja California Sur, Mexico

The presence of extremely halophilic archaeobacteria in an NaCl solution increased the number and size of cubic crystals of halite formed and also yielded dendritic crystals. Various dissolved and suspended materials such as glucose, glycerol, casein hydrolysate, amino acids, ferrocyanide, silica gel, eubacteria, halobacteria, and surface layers (S-layers) of Haloarcula strain SP8807 were evaluated for their ability to modify the crystal habit of halite. The results showed that whole cells and surface layers (S-layers) of Haloarcula strain SP8807 were able to induce the formation of dendritic crystals. Negative staining and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) analysis suggest that the proteinaceous constituents of extremely halophilic archaeobacterial S-layers may determine the crystal form of halite.

Keywords crystal habit, crystallization rate, halobacteria, sodium chloride, surface layers (S-layers)

The participation of microorganisms in the physicochemical development of brine has been recognized in recent years (Davis, 1978; Schneider & Herrmann, 1980; Jones et al., 1981; Javor, 1989). Ironically, the role that dissolved organic carbon plays in calcium carbonate and gypsum precipitation is much better known than its role in the formation of more economically important halite and potash minerals (Javor, 1989).

In salterns, the crystallizer ponds often appear red because of the presence of aerobic halobacteria. These microorganisms cause the ponds to heat faster and attain higher temperatures, thus accelerating their evaporation rate (Jones et al., 1981; Javor, 1989). It has been observed, however, that square halobacteria may actually hinder evaporation by inducing the formation of a salt crust on the brine surface (Krumbein, 1985). In addition, the crystals that form in solutions heavily loaded with halobacterial cells generally contain many more and larger fluid inclusions than crystals formed in sterile salt solutions (Norton & Grant, 1988).

Received 17 August 1993; accepted 31 May 1994.

This research is part of the doctoral thesis of A. Lopez-Cortes at the CCH-UNAM Biotechnology Program. The authors thank Dr. Sergio Sánchez-Esquivel and Dr. Amelia Farres for their encouragement and support during these studies; Dr. Susanne Schultze-Lam for valuable suggestions and comments; Dr. Eugenia Klein from the Weizmann Institute of Science for electron microscopy facilities; Ariel Cruz Villacorta for technical assistance; and Roy Bowers for English corrections.

Address correspondence to Dr. Alejandro Lopez-Cortes, Division of Experimental Biology, Center for Biological Research (CIB), Baja California Sur, P.O. Box 128, La Paz, B.C.S., 23000 Mexico.

The halobacterial genera are represented by neutrophilic or alkalophilic, gram-positive or gram-negative rods, cocci, and irregular plates (Grant & Ross, 1986). The gram-negative cells of the prokaryotic genera *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, and *Natronobacterium* are surrounded outside the plasma membrane by surface layers (S-layers) as the exclusive cell-wall component (Messner & Sleytr, 1992). The most detailed structural and biosynthetic studies were done on the S-layer glycoprotein from *Halobacterium halobium* and *H. salinarum* (Sumper, 1987; Lechner & Wieland, 1989). Recently, Sumper et al. (1990) reported a partial chemical characterization of the S-layer glycoprotein of *Haloferax volcanii*.

There is a lack of experimental data on the influence of halobacterial S-layers on the modification of crystal habit and mineralization of halite crystals. It is known that organic and inorganic substances can modify the crystal shape of halite from cubic to other forms. For example, dendritic crystals were formed when NaCl solutions were mixed with ferrocyanide (Ploss, 1964; Shuman, 1965), but this compound is not found in natural evaporite environments (Javor, 1989). Here, we studied (1) the participation of halobacterial cells as seeds in the nucleation of halite and (2) the crystal formation of the halite as affected by the dissolved and suspended materials, glucose, glycerol, casein hydrolysate, amino acids, ferrocyanide, silica gel, halobacterial cells, and S-layers of extreme halophilic archaeobacteria, to increase the understanding of the relationships between halobacterial cells and crystalline halite.

Materials and Methods

Strains and Growth Conditions

The bacterial strains used were *Halobacterium halobium* NRC 817, *Haloarcula vallismortis* ATCC 29252, *Haloferax mediterranei* ATCC 33500, *Haloarcula* SP8807, *Vibrio parahaemolyticus* MMF6, *Planococcus* sp. M6P2, and *Azospirillum brasilense* Cd DSM 1843. The eubacteria *V. parahaemolyticus* and *Planococcus* were isolated from a hypersaline ecosystem (Guerrero Negro, B.C.S., Mexico), and *A. brasilense* is unrelated to hypersaline environment. These widespread eubacteria strains were included in this study to determine if they affect salt crystal formation. The halophilic bacteria were cultivated in HEC medium formulated in 25% seawater as follows (g/L): NaCl, 195; MgCl₂·H₂O, 16.25; MgSO₄·7H₂O, 25; CaCl₂·2H₂O, 0.6; KCl, 5; NaHCO₃, 0.2; NaBr, 0.6; NH₄Cl, 2.5; FeCl₃·6H₂O, 0.0062; KH₂PO₄, 0.62. The carbon and nitrogen sources were 5 g/L yeast extract and 1.0 g/L casein hydrolysate (Torreblanca et al., 1986). The cultures were incubated at 38°C and agitated at 150 rpm. *Azospirillum brasilense* was cultivated in nutrient broth (Merck, Germany) and incubated at 30°C under agitation.

Evaluation of Crystallization Rates

Cultures in the exponential phase (200 ml) were centrifuged for 10 min, 16,000g at 4°C. The pellet was resuspended in 20 ml filter-sterilized 30% NaCl solution to OD_{540 nm} of 1.5. Samples of the cell suspension were adjusted to densities between 10⁶ to 10⁷ cells/ml, comparable to those reported from natural evaporitic habitats (Norton & Grant, 1988), transferred to a plastic dish (8.5 cm diameter), and placed in an environmental chamber at 30 ± 0.4°C, 55% relative humidity, and light intensity of 170 μE m⁻² s⁻¹ without disturbance. The control consisted of 20 ml filter-sterilized 30% NaCl solution. The weight, number, and size (>1 mm) of formed crystals was determined every 4 h beginning at 15

h, after decanting the sodium chloride solution and drying at 60°C for 48 h. All experiments were carried out in triplicate.

Determination of the Number and Size of Halite Cubic Crystals with Scanning Electron Microscopy

In order to assess whether halobacterial cells affect the number and size of crystals formed, it was necessary to look on a much smaller scale using scanning electron microscopy.

One milliliter of exponential-phase bacterial culture was centrifuged for 5 min, 16,000g at 20°C. The pellet was washed 3 times with filter-sterilized 30% NaCl solution and resuspended in the same solution. From this suspension, 5- μ l drops were placed on a glass coverslip that had been given a gold coating at 10 mA during 12 min, positioned on an aluminum pin-type mount previously coated with carbon-conductive, double-sided tape. The drops were incubated at a temperature of 24°C without disturbance. After 10, 20, and 30 min, excess brine was eliminated with filter paper. The specimens were air-dried and gold-coated at 20 mA during 8 min. The blank consisted of 5- μ l drops of sterile 30% NaCl solution treated under the same conditions. The specimens were viewed using a Philips 515 scanning electron microscope at an accelerating voltage of 25 kV.

Evaluation of Effect of Strains, S-Layers, and Chemical Materials on the Crystal Form of NaCl

One milliliter of bacterial suspension from an exponential-phase culture was centrifuged for 5 min, 16,000g at 20°C. The pellet was washed 3 times with filter-sterilized 30% NaCl solution and resuspended in 1.0 ml of the same solution. From this suspension, 20 5- μ l drops were placed on a clean microscope slide and kept in a chamber for 24 h at 35°C and 40% relative humidity. The slides were observed with a phase-contrast microscope (Nikon Labophot, Japan) at low magnifications of 2.5x, 10x, and 20x.

The following samples were mixed with filter-sterilized 30% NaCl solution: S-layers from strain SP8807 (20 μ g/ml); potassium ferrocyanide, glucose, glycerol, casein hydrolysate, and silica gel (63–200 μ m) from Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO; and amino acids from Merck, Germany (8003–8004), at concentrations between 200 and 2000 μ g/ml. Twenty 5- μ l drops of each mixture were placed on clean microscope slides, dried, and observed as described earlier. The chemicals glucose, glycerol, and amino acids were chosen because they have been recognized as osmoregulators produced by halophilic microorganisms. The silica gel was chosen as an example of inert particles. The ferrocyanide was chosen for its ability to form dendritic crystals of halite previously reported by Ploss (1964) and Shuman (1965), and casein hydrolysate as an example of a peptide.

Preparation of S-Layers and Spheroplast of Haloarcula SP8807

In order to know the bacterial structure involved in the modification of mineralization and the crystal habit of halite, we chose the S-layers because they are in continual contact with their environment. Recently it was proposed that the S-layer serves as a template for fine-grained gypsum and calcite formation (Schultze-Lam et al., 1992).

The surface layers were isolated as follows: One milliliter of culture in exponential phase was centrifuged for 5 min, 16,000g at 20°C. The pellet was resuspended in sphero-

plating solution composed of 0.1 M MES [2(*N*-morpholino)ethane sulfonic acid] buffer, pH 7.0, plus 0.5 M sucrose, 0.25 M NaCl, and 0.01 M MgCl₂ (Jarrell & Sprott, 1984). After 30 min of resuspension, the cells were converted into spherical bodies by a decrease in external sodium chloride and magnesium salt concentration. In this condition, the S-layers were removed and dissociated from the cell surface (Cohen et al., 1983; Hecht et al., 1986). The suspension was centrifuged for 5 min, 16,000g at 20°C, resulting in a spheroplast pellet and dissociated S-layer subunits in the supernatant.

The S-layer subunits were recovered and dialyzed (Sleytr et al., 1988) at 4°C against distilled deionized water with the solutes of the spheroplasting solution except sucrose. After dialysis, the S-layer subunits were reassembled in a salts solution composed of 4 M NaCl, 25 mM KCl, 80 mM MgSO₄, pH 3.2 (Hecht et al., 1986). This procedure yielded spheroplasts and purified S-layers. The self-assembled S-layers were examined by SDS-PAGE and transmission electron microscopy and tested in mineral formation studies. For negative staining preparations, we also used a solution of 10 mM CaCl₂ at pH 6 to promote the reassembly of the S-layer subunits (Koval & Murray, 1986; Kessel et al., 1988).

SDS-PAGE

Electrophoresis was done using PhastGels gradient 4–15% with PhastGel SDS buffer strips (Pharmacia, Sweden). The molecular mass markers were bovine albumin, 66 kD; egg albumin, 45 kD; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 kD; bovine carbonic anhydrase, 29 kD; bovine trypsinogen, 24 kD; soybean trypsin inhibitor, 20.1 kD; and α -lactalbumin from bovine milk, 14.2 kD (Sigma, SDS-7 Dalton Mark VII-L, USA). The gels were stained for protein by the silver impregnation method with PhastGel electrophoresis media (Pharmacia, Sweden) and periodic acid-Schiff (PAS) staining procedure for the detection of glycoproteins using the PhastSystem (Van-Seuningen & Davril, 1992).

Negative Staining for Electron Microscopy

Negative staining preparations were done with fixed and unfixed self-assembled S-layers. Reassembled S-layers were prefixed in 3% (v/v) glutaraldehyde in buffer solution of 4 M NaCl, 25 mM KCl, 80 mM MgSO₄, pH 3.2, for 1 h at 4°C in the dark. After this time the structures were centrifuged for 5 min, 10,000g at 20°C, and the supernatant was replaced by clean fixing solution under the same conditions. The fixed S-layers were washed and preserved at 4°C with the same buffer solution.

Drops (10 μ l) of fixed samples containing S-layer fragments were placed on a small sheet of Parafilm and diluted 1 : 40 with a buffer solution of 2 M NaCl, 12.5 mM KCl, 40 mM MgSO₄, pH 3.2. Ten-microliter drops of sample were transferred immediately to copper grid previously exposed to glow discharge. After 3 min, each grid with sample was stained with 2–3 drops of 2% aqueous uranyl acetate for 1 min. Excess stain was removed by blotting with filter paper (Sleytr et al., 1988). Drops (10 μ l) of unfixed samples containing reassembled S-layer in solution of CaCl₂ (10 mM, pH 6) were also placed on copper grids previously exposed to glow discharge. After 3 min, each grid with sample was stained with 2–3 drops of 2% aqueous uranyl acetate for 1 min. Excess stain was removed by blotting with filter paper (Sleytr et al., 1988). All specimens were viewed in a Philips 410 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 80 kV.

AU: St. Louis,
MO?

Results and Discussion

Crystallization Rates

We found no significant differences in the weight of sodium chloride crystals harvested with or without halobacteria (Figure 1); however, the halobacteria affected the number and size of the sodium chloride crystals (Figure 2). In Figure 2 we disregarded crystals smaller than 1 mm. We analyzed our data by a one-way analysis of variance (ANOVA) test to evaluate the effect of halobacterial cell morphology on crystallization rates. The number of crystals formed in the presence of the three bacterial strains differed significantly from the control (Figure 2). While the control produced few but homogeneously sized crystals, the presence of halobacteria produced many cubic crystals of different size, some of them large, 25 mm per side (Figure 2). The one-way analysis of variance showed two types of response to halobacteria: one to cells of *H. vallismortis* and *Haloarcula* strain SP8807 that have an angular shape, and the other to cells of *H. halobium*, which are rod-shaped (Grant & Ross, 1986). This difference in response could be explained by the cell shape: that is, bacteria with triangular or square shapes (*Haloarcula* spp.) provide a template that mimics the crystal structure and thus serves as a means of mechanical nucleation, similar to the way foreign particles act as seeds or nuclei to promote crystal formation in saturated solutions (Norton & Grant, 1988).

The formation of a greater number of cubic crystals in the presence of halophilic archaeobacteria was confirmed at the micrometer level (Table 1 and Figure 3).

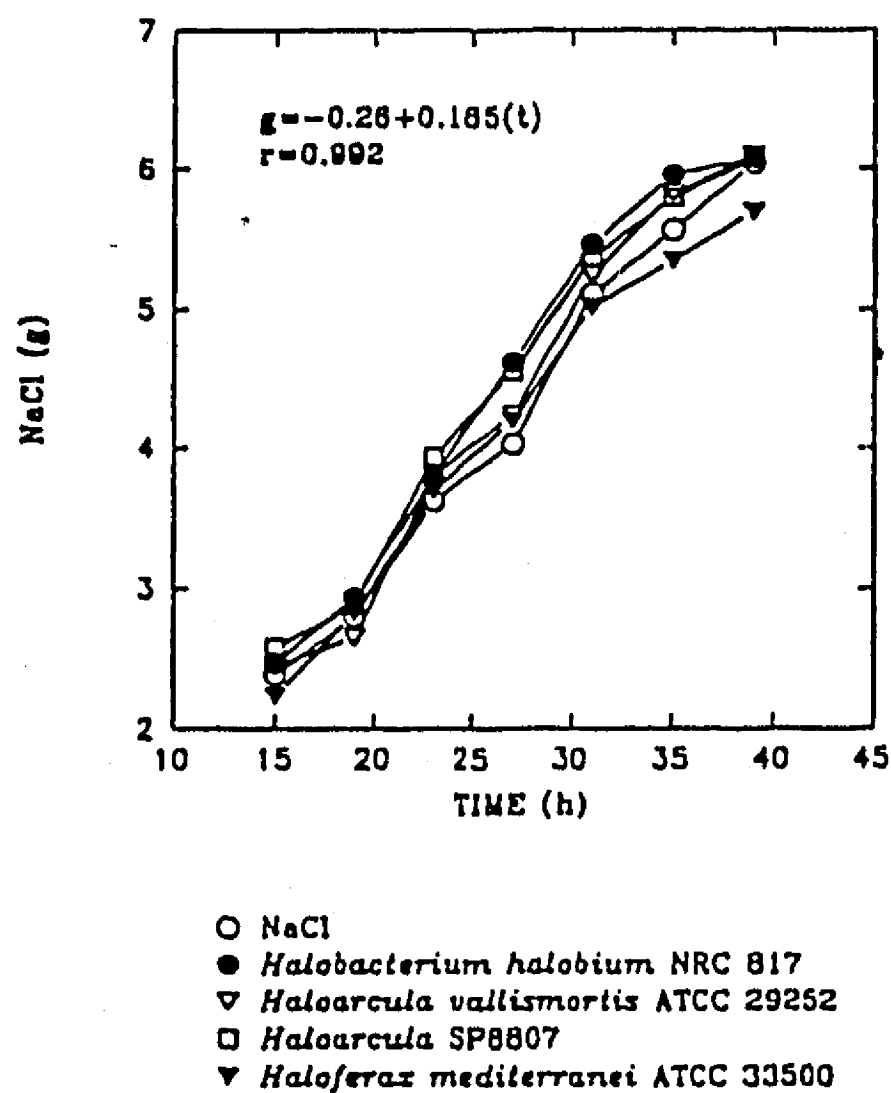
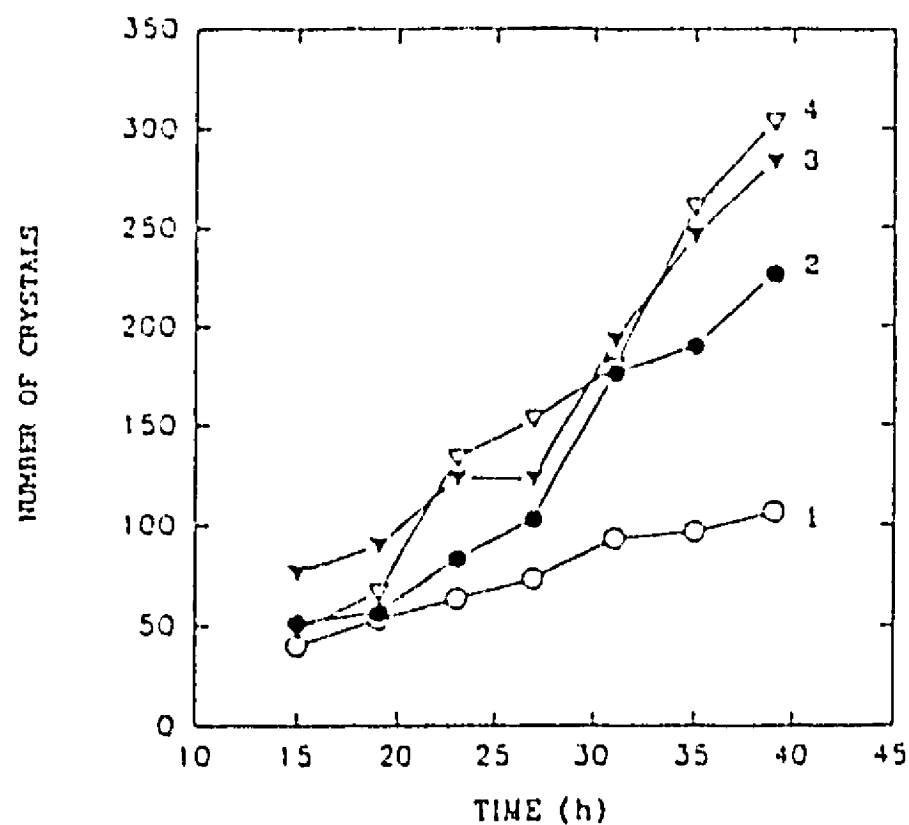


Figure 1. Effect of halobacteria on sodium chloride harvested from 30% NaCl solution (in grams). The equation corresponds to the control.



- 1 NaCl (1-8 mm)
- 2 *Halobacterium halobium* NRC 817 (1-25 mm)
- 3 *Haloarcula vallismortis* ATCC 29252 (1-15 mm)
- 4 *Haloarcula* SP8807 (1-15 mm)

Figure 2. Influence of halobacteria on the number and size of halite crystals. To facilitate our study, we only considered crystals larger than 1 mm. The data were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) test with a confidence of $p \leq .05$.



Figure 3. Overall crystal formation trends in the presence of *Haloarcula* strain SP8807 cells. The bar represents 0.1 μm . Note the great number of particles that make up the dendritic shape (arrow). The inset shows a photomicrograph of dendritic sodium chloride crystals produced by the addition of cells of *Haloarcula* strain SP8807. The bar represents 25 μm .

Crystal Formation of NaCl

Halite has a crystalline form based on cubic symmetry. Microscopy of evaporating drops of brine, however, has revealed crystal forms of sodium chloride other than cubes (Ploss, 1964; Shuman, 1965).

The presence of *Haloarcula* strain SP8807 caused the formation of dendritic crystals of halite (inset, Figure 3). The scanning electron microscopy (SEM) micrograph of Figure 3 shows overall crystal formation trends in which dendritic crystals are outside and between cubic crystals. Examination of dendritic crystals at high magnification showed a relationship between the halobacteria and the surface of halite crystals, and also confirmed that these cells modified the crystal habit, resulting irregular shapes of halite (Figure 4). Other strains of halobacteria were also capable of inducing formation of dendritic crystals. Although the halophilic eubacteria *V. parahaemolyticus* and *Planococcus* that we tested were isolated from hypersaline environments, they did not produce dendritic crystals, which suggests that not all microbes present in crystallizer ponds are involved in the modification of crystal habit. The specific influence of halobacteria in the modification of crystal habit was also confirmed by the inability of *A. brasilense*, an organism that does not occur in hypersaline environments, to form dendritic crystals, which may be explained by the different chemical composition and structure of its cell surface.

SDS-PAGE analyses of purified S-layer of *Haloarcula* SP8807 showed a single band of protein with molecular mass of 66 kD (Figure 5). However, the staining procedure for the detection of glycoproteins did not show bands.

It is well known that the S-layers of most halophilic archaeobacteria appear to be composed of glycoproteins (Messner & Sleytr, 1991). A report on the detailed chemical structure of glycopeptide of *H. salinarum* (Sumper, 1987) and the primary structure of the cell surface glycoprotein of *H. halobium* (Lechner & Sumper, 1987) has confirmed the original data (Mescher et al., 1974; Mescher & Strominger, 1976). The cell surface glycoprotein of *H. halobium* has a molecular mass of about 120 kD (core protein = 87 kD). Recently, Sumper et al. (1990) reported a partial chemical characterization of the S-layer glycoprotein of *Haloferax volcanii* in which the mature polypeptide contains 794 amino acids with a calculated molecular mass of 81 kD. Although glycosylation is not an

Table 1
Effect of *Haloarcula* strain SP8807 on the number and size ranges of cubic crystals formed

Size ranges (μm)	Number of crystals from 30% solution of NaCl (control)		Number of crystals from <i>Haloarcula</i> , 1×10^7 cells/ml	
	30 \times	200 \times	30 \times	200 \times
1-100	159 \pm 75	432 \pm 220	706 \pm 23	1217 \pm 421
101-200	43 \pm 4	12 \pm 4	58 \pm 29	13 \pm 7
201-300	12 \pm 3	2 \pm 1	12 \pm 5	1 \pm 1
301-400	6 \pm 1	0	5 \pm 1	0

Note. The numbers of crystals listed are the sum of the counts at 30 \times and 200 \times magnification, respectively, from 10-, 20-, and 30-min incubations, determined by scanning electron microscopy.

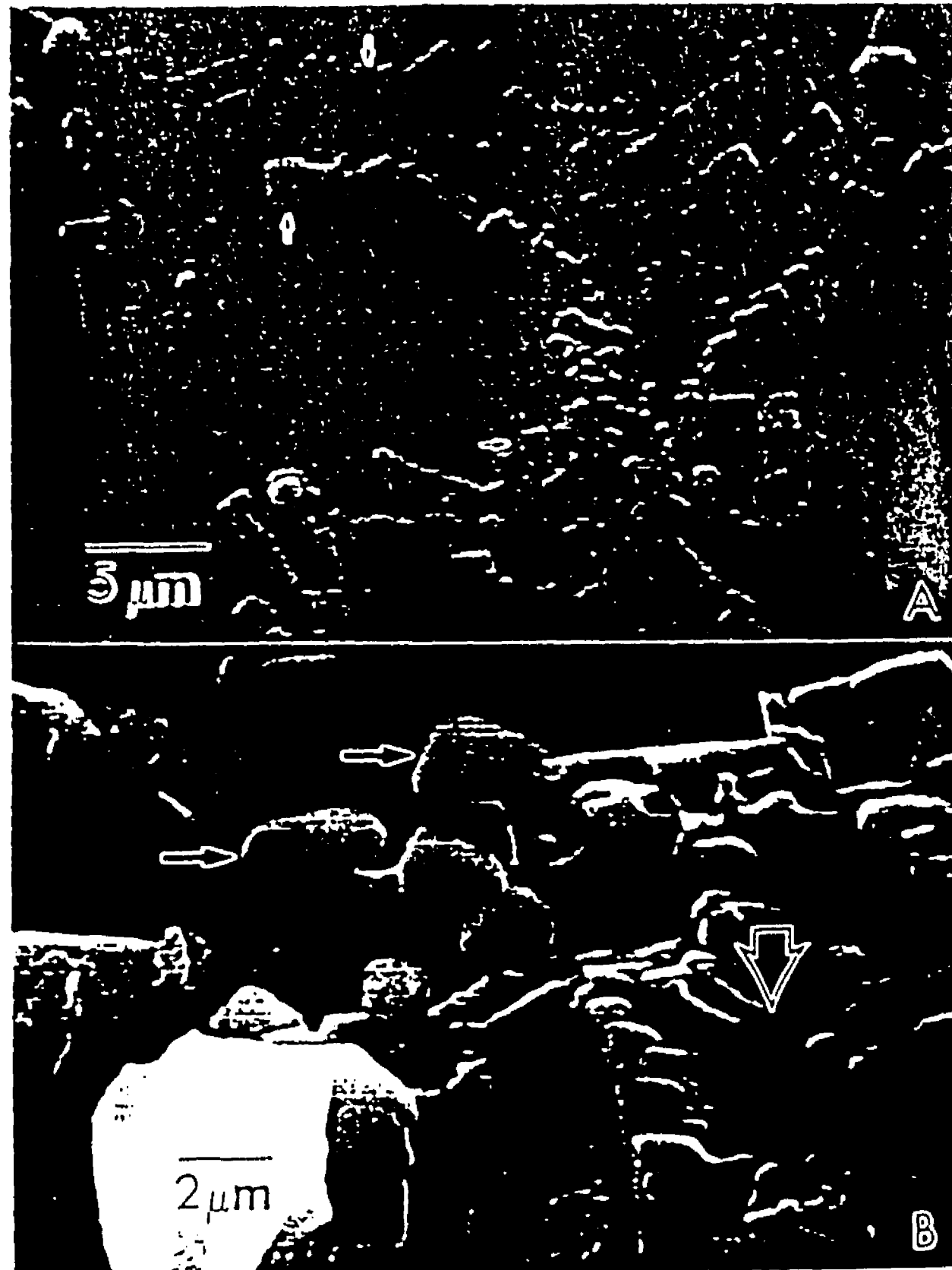


Figure 4. Details of the form of dendritic crystals. (A) The dendritic shape was built by flat cubic microcrystals (arrows). The bar represents 5 μm . (B) High magnification also shows the presence of halobacterial cells (arrows) combined with amorphous halite crystals (empty arrow). The bar represents 2 μm .

obligatory step in S-layer biosynthesis, it represents an important protein-modification reaction that can add great potential for the diversification of bacterial cell surface properties (Messner & Sleytr, 1992). In this context, it is interesting to note that upon continuous cultivation under optimal conditions, some bacterial strains have lost their ability to glycosylate S-layer proteins (Messner & Sleytr, 1991).

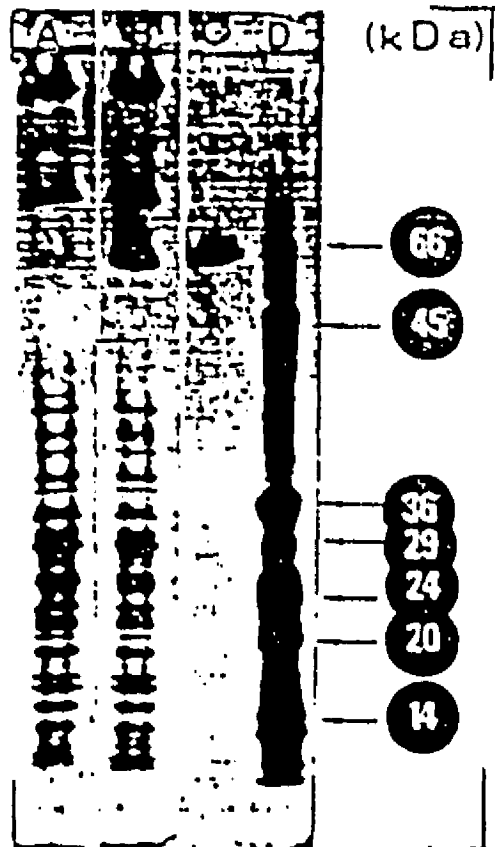


Figure 5. SDS-PAGE 4-15% gradient gel, silver stain. Lanes: A, profile of proteins from spheroplasts of *Haloarcula* SP8807; B, profile of whole-cell protein from *Haloarcula* SP8807; C, purified S-layer subunits from *Haloarcula* SP8807; D, profile of molecular-weight markers.

Au: scale noted somewhere.

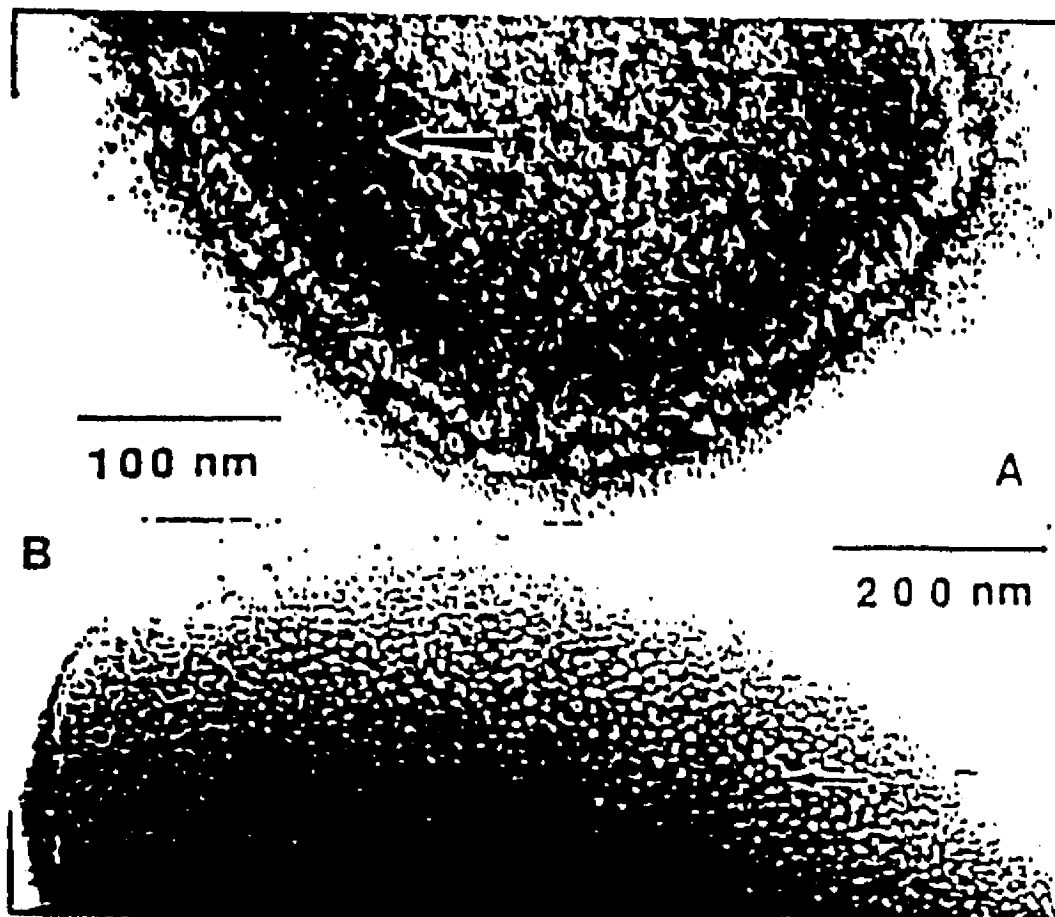


Figure 6. Negatively stained (2% uranyl acetate) preparations of S-layer self-assembly products of *Haloarcula* SP8807. (A) Unfixed S-layer reassembled in 10 mM CaCl₂ at pH 6. The arrow shows an area with a hint of periodicity in one dimension. (B)

Au: Please add legend for part B

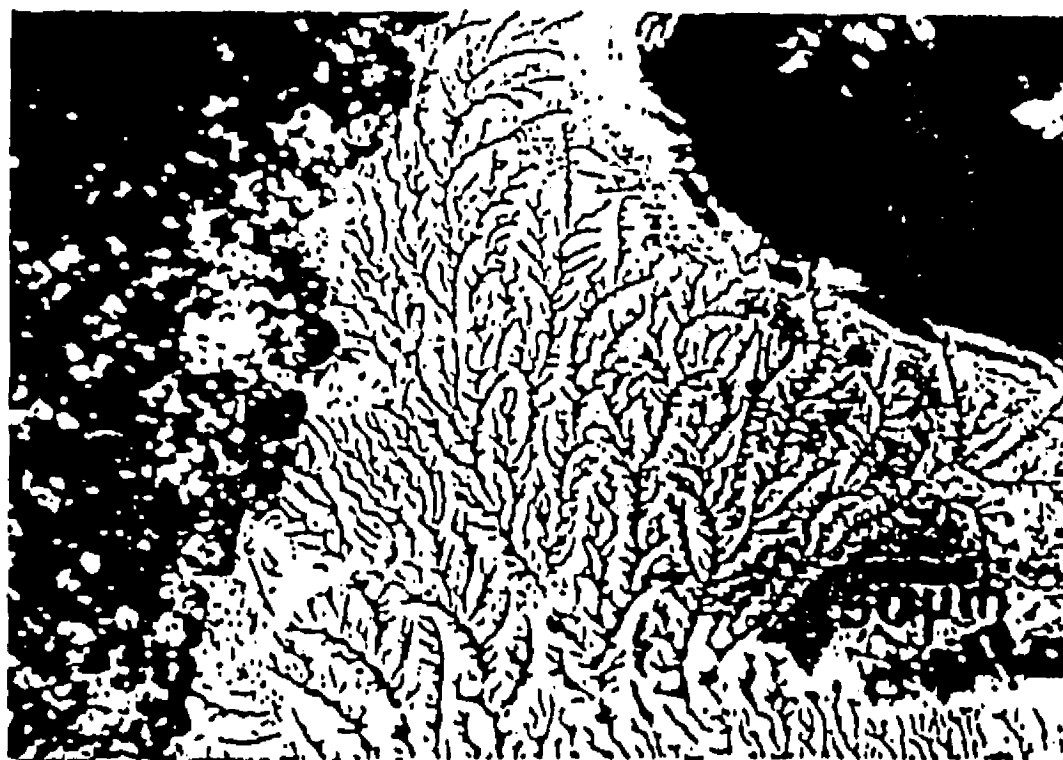


Figure 7. Thin dendritic halite crystals caused by surface layers (20 $\mu\text{g/ml}$) from *Haloarcu* SP8807. The bar represents 50 μm .

The SDS-PAGE results were correlated with negatively stained preparations examined by transmission electron microscopy, which showed self-assembled S-layers (Figure 6). Despite the greater difficulty in obtaining good negatively stained S-layer from *Haloarcu* SP8807 strain, due to the high salt concentration and specific divalent cations required to maintain the integrity of the S-layer lattice (Koval & Murray, 1986; Kessel et al., 1988), a hint of periodicity and regions with honeycomb appearance of the morphological units was observed (Figure 6).

S-Layers of *Haloarcu* SP8807 (20 $\mu\text{g/ml}$) modified the crystal habit of halite, yielding dendritic crystals as well as cubic ones (Figure 7). The novel function of the cyanobacterial surface layer in fine-grain calcite formation proposed by Schultze-Lam et al. (1992) may be applicable to halite formation in the presence of halobacterial S-layer. This hypothesis, however, will require further study.

Our results show that halobacterial cells, and/or halobacterial S-layer protein, common in hypersaline ecosystems, are capable of inducing the formation of NaCl dendritic crystals. Supported by these results, we suggest the monitoring of organic carbon concentration and population density of halobacterial cells in crystallizer ponds of commercial salterns for the production of salt of high quality.

The dendritic crystals and their branches at micrometer level showed flat cubic microcrystals combined with amorphous crystals and halobacterial cells (Figure 7). The conservation and defects of the inner structure of these sodium chloride crystal will be studied in the future.

At low salt and magnesium concentration, spheroplasts prove to be extremely fragile (Jarrel & Sprott, 1984), and some lysis occurs. This is reflected by the many protein bands found in our SDS-PAGE. However, a 66-kD light band was detected in the spheroplast samples (Figure 5). Jarrel and Sprott (1984) reported spherical bodies produced from logarithmic-phase cells, which were spheroplasts with cell wall still present but thinner than the wall of the original rod-shaped halobacterial cells.

Table 2
Effect of dissolved and suspended materials in the formation of halite crystals

Agent	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Shape	Relative abundance ^d	Frequency (%) ^b	
Ferrocyanide	250	Dendritic ^c	(+++)	100	
Glucose	250	Cubic	(+++)	100	
Glycerol	250	Cubic	(+++)	100	
Amino acids ^e	200–2000	Cubic	(+++)	100	
Casamino acids	200–600	Cubic	(+++)	100	
		1200	Dendritic ^d	(++)	15
		Dendritic	(+)	55	
	2000	Cubic	(++)	30	
		Dendritic ^d	(+++)	10	
		Dendritic	(++)	40	
		Dendritic	(+)	40	
Silica gel	100–2000	Cubic	(+++)	100	
Halobacteria cells	200 ^f	Dendritic ^c	(+++)	50	
		Cubic	(++)	50	
S-layers	20 ^g	Dendritic ^c	(+++)	50	
		Cubic	(++)	50	

^a(+++)
^bFrequency found in 60 experiments.

^cInside the cubic crystals (50 mm average width of the branches).

^dBetween the cubic crystals (10 mm average width of the branches).

^eDL-alanine, L(-)-proline, glycine, DL-serine, L-cysteine, DL-threonine, L(-)-tyrosine, L-histidine, L(+)-lysine, and L-glutamic acid.

^fOn basis of dry weight.

^gOn basis of Coomassie protein determination.

The effect of different chemical compounds on the induction of dendritic crystals of halite is shown in Table 2. As previously reported (Ploss, 1964; Shuman, 1965) and also shown in Table 2, ferrocyanide was capable of inducing the formation of dendritic crystals, but interestingly, the ferrocyanide salt at 250 $\mu\text{g/ml}$ caused dendritic growth of sodium chloride crystals entrapped within cubic crystals.

The poor formation of dendritic crystals by casein hydrolysate (1200–2000 $\mu\text{g/ml}$) suggests that amino acids do not induce the production of dendritic crystals (Table 2). The absence of dendritic crystal formation in the presence of silica gel demonstrated that this phenomenon is not the result of an inert particle effect.

In conclusion, the formation of a greater number of cubic crystals in the presence of halophilic archaeobacterial cells suggests that the cells serve as templates for halite formation.

The modification of the halite crystal habit, resulting in a dendritic shape, was attributed to the proteinaceous components of the S-layer of the halophilic archaeobacteria. Research on the types and concentrations of dissolved organic carbon compounds and of halobacteria in natural solar salterns may be an important biotechnological tool in the operations of salterns.

References

- Cohen, S., Oren, A., and Shilo, M. 1983. The divalent cation requirement of Dead Sea halobacteria. *Arch. Microbiol.* 136:184-190.
- Davis, J. S. 1978. Biological communities of a nutrient enriched salina. *Aquat. Bot.* 4:23-42.
- Grant, W. D., and Ross, H. N. M. 1986. The ecology and taxonomy of halobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 39:9-15.
- Hecht, K., Wieland, F., and Jaenicke, R. 1986. The cell surface glycoprotein of *Haloabacterium halobium*. *Biol. Chem.* 367:33-38.
- Jarrell, K. F., and Sprott, G. D. 1984. Formation and regeneration of *Halobacterium* spheroplast. *Curr. Microbiol.* 10:147-152.
- Javor, B. 1989. *Hypersaline environments*. New York: Springer-Verlag.
- Jones, A. G., Ewing, C. M., and Melvin, M. V. 1981. Biotechnology of solar saltfields. *Hydrobiol.* 82:391-406.
- Kessel, M., Wildhaber, I., Cohen, S., and Baumeister, W. 1988. Three dimensional structure of the regular surface glycoprotein layer of *Halobacterium volcanii* from the Dead Sea. *EMBO J.* 7:1549-1554.
- Koval, S. F., and Murray, R. G. E. 1986. The superficial protein array on bacteria. *Microbiol. Sci.* 3:357-361.
- Krumbein, W. E. 1985. Applied and economic aspects of sabkha systems—Genesis of salt, ore and hydrocarbon deposits and biotechnology. In *Hypersaline ecosystems*, eds. G. M. Friedman and W. E. Krumbein, pp. 426-436. New York: Springer-Verlag.
- Lechner, J., and Sumper, M. 1987. The primary structure of a procaryotic glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 262:9724-9729.
- Lechner, J., and Wieland, F. 1989. Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58:173-194.
- Mescher, M. F., Strominger, J. L., and Watson, S. W. 1974. Protein and carbohydrate composition of the cell envelope of *Halobacterium salinarum*. *J. Bacteriol.* 120:945-954.
- Mescher, M. F., and Strominger, J. L. 1976. Purification and characterization of a procaryotic glycoproteins from cell envelope of *Halobacterium salinarum*. *J. Biol. Chem.* 251:2005-2014.
- Messner, P., and Sleytr, U. B. 1991. Bacterial surface layer glycoproteins. *Glycobiology* 1:545-551.
- Messner, P., and Sleytr, U. B. 1992. Crystalline bacterial cell-surface layers. In *Advances in microbial physiology*, vol. 33, ed. A. H. Rose, pp. 213-275. New York: Academic Press.
- Norton, C., and Grant, W. D. 1988. Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt crystals. *J. Gen. Microbiol.* 134:1365-1373.
- Ploss, R. S. 1964. Sodium chloride: Modification of crystal habit chemical agents. *Science* 144:143-144.
- Schneider, J., and Herrmann, A. G. 1980. Saltworks—Natural laboratories for microbiological and geochemical investigations during the evaporation of seawater. *5th Symp. Salt 2*, eds. A. H. Coogan and L. Hauder, pp. 371-381. Ohio: North Ohio Geological Society.
- Schulze-Lam, S., Harauz, G., and Beveridge, T. J. 1992. Participation of a cyanobacterial S layer in fine-grain mineral formation. *J. Bacteriol.* 174:7971-7981.
- Shuman, A. C. 1965. Gross imperfections and habit modification in salt crystals. *2nd Symp. Salt 12*, ed. J. L. Rau, pp. 246-253. Ohio: North Ohio Geological Society.
- Sleytr, U. B., Messner, P., and Pum, D. 1988. Analysis of crystalline bacterial surface layers by freeze-etching, metal shadowing, negative staining and ultrathin sectioning. In *Methods in microbiology*, vol. 20, ed. F. Mayer, pp. 29-60. New York: Academic Press.
- Sumper, M. 1987. Halobacterial glycoprotein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 906:69-79.
- Sumper, M., Berg, E., Mengele, R., and Strobel, I. 1990. Primary structure of glycosylation of the S-layer protein of *Haloferax volcanii*. *J. Bacteriol.* 172:7111-7118.
- Torreblanca, M., Rodríguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M., and Kates, M. 1986. Classification of nonalkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. *System. Appl. Microbiol.* 8:89-99.
- Van-Seuningen, I., and Davril, M. 1992. A rapid periodic acid-Schiff staining procedure for the detection of glycoproteins using the PhastSystem. *Electrophoresis* 13:97-99.

3
 > Au: Give
 city please
 Y