

# Biom mineralización: revisión de algunos de sus aspectos más destacados

Biom mineralization: A review of some of its most relevant aspects

GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. T., BEN OMAR, N. y ARIAS, J. M.

Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. E-18071 Granada. España.

## RESUMEN

En esta breve revisión se hace un recorrido por los distintos procesos de biom mineralización, en los que están implicados organismos pertenecientes, al menos, a 55 *Phyla*. Se comentan los distintos mecanismos utilizados: mineralización inducida biológicamente y mineralización controlada biológicamente. Se hace especial hincapié en los procesos de biom mineralización en que la participación de los microorganismos es importante, tanto desde el punto de vista biogeomicrobiano como desde el punto de vista clínico. Finalmente se hace una aproximación a los procesos moleculares de aportación de núcleos heterogéneos de cristalización por bacterias.

**Palabras clave:** Biom mineralización, mineralización bacteriana, nucleación cristalina.

## ABSTRACT

In this review we point out the different biom mineralization processes. Organisms belonging to as many as 55 *Phyla* are believed to be involved into these processes. We comment on the different mechanisms used: Biologically Induced Mineralization and Biologically Controlled Mineralization. Special remark is made on those biom mineralization processes where the role of microorganisms is important, both from a biogeomicrobial and clinical point of view. Finally, we approach the molecular processes, by which bacteria are able to provide heterogeneous crystallization nuclei.

**Key words:** Biom mineralization, bacterial mineralization, crystal nucleation.

Recibido: 11-12-1995.

Aceptado: 8-1-1996.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:3; 483-518]

## LA BIOMINERALIZACIÓN

### A MODO DE INTRODUCCIÓN

La biomineralización es el proceso mediante el cual los seres vivos intervienen en la formación de los minerales. Esta es una consecuencia de la actividad celular que favorece las condiciones físico-químicas para su formación y crecimiento. El estudio de estos complejos procesos ha dado lugar al surgimiento de la Biomineralización como Ciencia, la cual es, en realidad, un auténtico campo multidisciplinario que se extiende tanto al mundo orgánico como al mundo inorgánico. Por este motivo tiene estrechas conexiones con los estudios biológicos, paleontológicos y médicos de los organismos que han desarrollado esqueletos mineralizados. Por otro lado, la Biomineralización está apoyada por otras Ciencias, junto a las cuales es miembro autónomo de igual categoría. Estas Ciencias son la Cristalografía, Mineralogía, Geoquímica, Sedimentología, Oceanografía, Microbiología, Bioquímica, Evolución, entre otras (1). La Ciencia de la Biomineralización, además de dilucidar los procesos de formación de los minerales biogénicos, tiene por objeto la investigación de todas las propiedades de los biominales, especialmente su forma externa, su estructura fina y sus cualidades físicas y químicas.

En esta revisión se va a llevar a cabo un breve recorrido por los aspectos más destacados que conducen a la deposición de minerales con la intervención de los organismos vivos.

La presencia de partes o zonas mineralizadas en los organismos llamaron la atención de científicos como Haeckel, Gegenbauer, Grobben, Hatschek, Huxley, Lankester, Lamarck, Bronn, y Bütschli, quienes proporcionaron al campo de la biomineralización los primeros fundamentos sólidos. La Biomineralización como Ciencia, comienza a emerger lentamente durante la segunda mitad del siglo pasado y a principios del siglo xx (1). Este período culminó en 1920 con la publicación de los extensos trabajos de Schmidt (2), cuyos datos representan hoy día una inestimable colección de conocimientos sobre los procesos de biomineralización. Así mismo, Clarke y Wheeler (3), publicaron la primera lista exacta y completa de la composición elemental de algunos biominales. La década de los años veinte culmina con los trabajos de Boggild (4), quien realizó un estudio enfocado a la ultraestructura de la concha de los moluscos.

La etapa moderna de la investigación sobre la biomineralización empezó en 1930. En su desarrollo ha jugado un importante papel la introducción, para su estudio, de técnicas de difracción de rayos X, de microscopía óptica, así como el descubrimiento de técnicas avanzadas de histología que permitieron un buen acceso a los tejidos y a la célula. Sin embargo, los estudios detallados sobre la biomineralización empezaron a desarrollarse a partir de los años

60 y 70. Ello fue debido a dos razones fundamentales. La primera de ellas, el uso del microscopio electrónico de transmisión, que permitió ofrecer una información amplia sobre la ultraestructura de los materiales mineralizados tanto de animales como de plantas y, por supuesto, de microorganismos. La segunda, los estudios bioquímicos avanzados sobre el transporte a través de membranas y sobre el análisis de los materiales orgánicos asociados a los esqueletos de algunos seres vivos (5).

## EL IMPACTO DE LA BIOMINERALIZACIÓN EN LA BIOSFERA

El impacto de la biomineralización en la biosfera es de enorme trascendencia. De ello es exponente el que al menos se conocen organismos pertenecientes a 55 *phyla* (entre los que hay representantes en todos los Reinos) que forman, en conjunto, más de 60 biominerales diferentes (1). Para una mayor aclaración ver tabla 1, en el apartado 1.3.

La biomineralización ocurre a gran escala en los océanos, lo que influye en muchos aspectos sobre la química del agua del mar y la naturaleza de los sedimentos que se forman en los fondos marinos. Sin embargo, es menos apreciado el efecto que los minerales biogénicos tienen sobre la química de las aguas dulces. No obstante, un buen ejemplo de este efecto, es el caso de un protozoo, perteneciente al género *Loxodes*, que forma gránulos esféricos intracelulares de sulfato de bario. Este organismo, muy abundante en algunos lagos, puede afectar al ciclo biogeoquímico del bario en las aguas dulces (6). También, la silificación por diatomeas afecta el ciclo de la sílice en los lagos (7).

El efecto de la biomineralización sobre el medio ambiente continental es muy poco conocido. En cambio, es mucho lo que se conoce acerca del efecto de la biomineralización en los océanos (8, 9), siendo de primordial importancia el papel jugado en relación al carbonato cálcico. En las aguas superficiales de los océanos se forman enormes cantidades del carbonato cálcico biogénico. Los organismos responsables de esta precipitación son los coccolitofóridos calcíticos, los foraminíferos calcíticos y los pterópodos aragoníticos, que son gasterópodos nectónicos. El gran efecto que tienen sus restos esqueléticos sobre la química del agua de mar es que con su hundimiento hasta el fondo del océano, redistribuyen, no solamente los iones de calcio y de bicarbonato, sino también varios elementos traza asociados, tales como el estroncio y el bario. De este modo, todo el ciclo geoquímico del carbonato depende íntimamente de la velocidad de formación de las partes duras esqueléticas y de la velocidad con que se disuelven (9). Muchos de estos esqueletos de carbonatos se acumulan en el fondo de los océanos, para luego incorporarse dentro de los sedimentos y de las rocas sedimentarias. Los carbonatos biogénicos se originan también, en enormes cantidades, por las comunidades formadoras de

arrecifes, que se encuentran distribuidas abundantemente en todos los océanos tropicales del mundo. A diferencia de las partes duras esqueléticas, formadas por los organismos planctónicos del océano abierto —la mayor parte de las cuales se disuelven y se reciclan otra vez en el sistema— los carbonatos biogénicos de arrecifes son característicos semipermanentes del registro sedimentario de la Tierra. Smith (10) ha estimado que un 50% de todo el carbonato cálcico que entra en el océano, principalmente por los ríos, es utilizado por las comunidades formadoras de arrecifes.

En orden de importancia le sigue el efecto que los procesos de biomineralización tienen sobre la química de los océanos, en el ciclo de la sílice. Los océanos están subsaturados con respecto a la sílice opalina porque los organismos, tales como diatomeas, radiolarios, esponjas silíceas y silicoflagelados, forman partes duras esqueléticas opalinas. Antes de que estos organismos se desarrollaran, los océanos estaban sobresaturados de sílice opalina, y con la evolución de cada uno de los principales grupos taxonómicos formadores de sílice, el grado de saturación disminuyó. Las mayores acumulaciones de los restos esqueléticos de sílice en el fondo de los océanos ocurren principalmente en las áreas donde las aguas superficiales tienen una productividad muy alta (11). El transporte de los esqueletos opalinos de las aguas superficiales, donde se forman por diatomeas y por radiolarios, hasta el fondo de los océanos, provoca también la redistribución de los elementos traza tales como germanio, zinc y, posiblemente, selenio (9).

Algunos organismos marinos forman minerales en ambientes en los que por mera precipitación inorgánica no podrían llegar a formarse. Estos biominerales, no sólo incluyen los minerales de carbonato sino, también, magnetita, formada por las bacterias magnetotácticas y varios invertebrados; fluorita, formada por gasterópodos (5); así como las partes duras esqueléticas de celestina (sulfato de estroncio), formados por *Acantharia planctónica*.

De lo expuesto se deduce cómo los productos de la biomineralización tienen un gran efecto, no sólo sobre la química del agua de mar, sino también sobre los sedimentos que se forman en el fondo de los océanos y, a través de ellos, sobre el mismo registro geológico sedimentario.

## CLASES DE BIOMINERALES Y ORGANISMOS QUE LOS FORMAN

En 1963 se habían identificado sólo diez minerales biogénicos diferentes (12). Este número aumentó hasta diecinueve en 1974 (8), treinta en 1981 (5) y, treinta y nueve en 1983 (13). En la actualidad, los minerales biogénicos conocidos superan el número de sesenta (1, 14), como quedan recogidos en la Tabla 1.

Los organismos con capacidad de precipitar minerales están presentes en

Tabla 1.—Los distintos minerales biogénicos encontrados en los sistemas biológicos.

<b>BIOMINERALES</b>	
<b>CARBONATOS:</b>	Calcita, aragonito, vaterita, monohidrocalcita, protodolomita, carbonato hídrico amorfo, hidrocerusita y estroncianita.
<b>FOSFATOS:</b>	Hidroxiapatito, fosfato octacálcico, francolita, dahllita, $\text{Ca}_3\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_4$ , whitlockita, estruvita, brushita, pirofosfato amorfo, fosfato cálcico amorfo (FCA), FCA (precursor dahllita) <sup>3</sup> , FCA (precursor brushita) <sup>3</sup> , FCA (precursor whitlockita) <sup>3</sup> , FCA (precursor francolita) <sup>3</sup> , fosfato Ca Mg amorfo, fosfato $\text{Fe}^{3+}$ hídrico amorfo, $\text{KNa}_3(\text{Fe}_{15}\text{Mg}_{25})_3(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_3$ , vivianita, bobierrita, schertelita y newberiyta.
<b>HALUROS:</b>	Fluorita, fluorita amorfa y hieratita.
<b>SULFATOS:</b>	Yeso, celestina, barita, jarosita y taylorita.
<b>SILICATOS:</b>	Ópalo.
<b>ÓXIDOS DE HIERRO:</b>	Magnetita, maghemita, goethita, lepidocroíta, ferrihidrita, óxido de hierro amorfo y ilmenita amorfa.
<b>SULFUROS:</b>	Pirita, hidrotroilita, esfalerita, wurtzita, galena, greigita y mackinawita.
<b>ÓXIDOS DE MAGNESO:</b>	Todorokita y birnessita.
<b>METALES:</b>	Azufre.
<b>CITRATOS:</b>	Earlandita.
<b>OXALATOS:</b>	Whewelita, weddelita, glushinskita, $\text{Mn}_2\text{C}_2\text{O}_4$ .
<b>OTROS CRISTALES ORGÁNICOS:</b>	Utrato sódico, ácido úrico, hidrocarbano de parafina, cera (cadena larga) y tartrato de calcio.

<sup>3</sup> El término "precursor" se refiere a la fase amorfa, que por encima de 500°C se transforma en denominada fase cristalina.

Tabla 1: Autores: González-Muñoz *et al.*

todos los grupos, desde las bacterias a los cordados. Sin embargo, existe una marcada diferencia, en cuanto a la formación de estos biominerales, entre los distintos grupos taxonómicos (14).

Por lo que respecta a la distribución de los biominerales entre los principales grupos de organismos, nos encontramos que los animales son el grupo mayoritario, con treinta y siete minerales biogénicos diferentes, seguido por

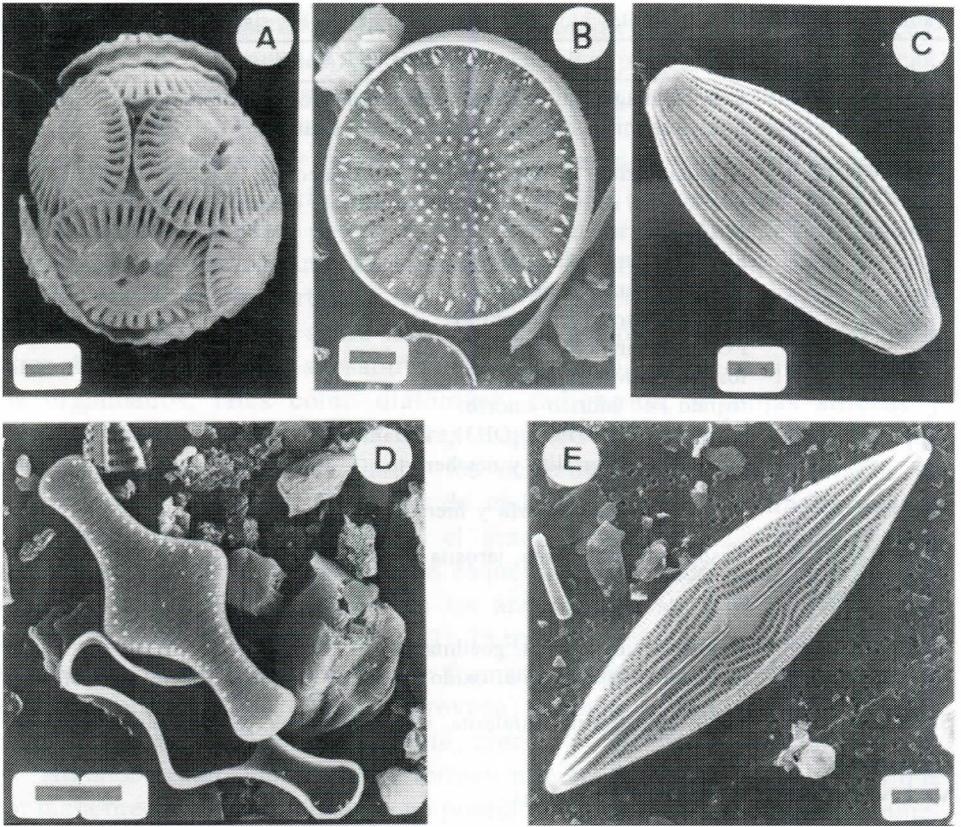


Fig. 1.—Biomíneralización en algas cromistas (división *Heterokontophyta*). **A**, Placas calcáreas (cocolitos) cubriendo la superficie celular de *Gephyrocapsa* (Cl. *Prymnesiophyceae*). **B**, Valva silíceas de la diatomea céntrica *Cyclotella* (Cl. *Bacillariophyceae*). Zona marginal ornamentada por estrías radiales y central punteada. **C**, Zona dorsal del frústulo de *Amphora* (Cl. *Bacillariophyceae*, O. *Naviculales*). Observación de las bandas intercalares que facilitan la unión entre las dos valvas. **D**, Valvas silíceas: epi- e hipovalva en diatomeas pennadas del género *Tabellaria* (Cl. *Bacillariophyceae*, O. *Diatomales*). Presencia de espinas marginales que favorecen la formación de cadenas. **E**, Valva silíceas de *Anomooneis* (Cl. *Bacillariophyceae*, O. *Naviculales*). Estrías interrumpidas por costillas longitudinales. Barras: A: 1  $\mu$ m; B, C: 2  $\mu$ m; D, E: 5  $\mu$ m. Observación mediante SEM (Zeiss DSM-950). (Reproducción por cortesía del Profesor Pedro Sánchez Castillo).

las bacterias que forman 24, las plantas vasculares que forman 11 y, finalmente, los hongos y los protozoos que forman 10. Los minerales de carbonatos, fosfatos, silicatos y óxido de hierro, se forman por especies pertenecientes respectivamente a 26, 23, 21 y 17 *phyla* (1).

De los biomínerales descritos hasta 1983, la mayoría contienen el calcio como principal catión, seguidos por los que contienen hierro (14). Además,

el 60% de los biominerales descubiertos contienen grupos hidroxilos y/o moléculas de agua. El uso mayoritario del calcio se debe, probablemente, a que los organismos desarrollaron tempranamente, durante su evolución, mecanismos para manipular este ión.

De estos minerales de origen biológico, si se agrupan en función de los aniones, los más abundantes serían los fosfatos, seguidos por los óxidos y los carbonatos. Por otro lado, el 25% de estos biominerales están hidratados, mientras que un 25% son amorfos (14).

En cuanto a la distribución de los minerales entre los organismos se ha encontrado, por un lado, que los minerales de calcio y silicio son los más comunes. Por otro lado, los sulfatos y ciertos óxidos sólo son precipitados por bacterias. Los oxalatos y los fosfatos tienen una amplia distribución y, finalmente, los polimorfos de carbonato cálcico, calcita y aragonito, son los que presentan distribución más amplia (14).

Un hecho destacado es que muchos de los minerales biogénicos se producen por los organismos en condiciones en las que sus equivalentes no biogénicos no podrían precipitarse espontáneamente. Además, estos biominerales tienen muchas veces una morfología distinta de los formados por procesos inorgánicos.

## FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LOS MINERALES

La deposición mineral juega un papel importante en la formación de las partes duras esqueléticas, siendo esta función evidente en los organismos unicelulares, así como en muchos grupos de invertebrados. Los principales minerales que componen estas partes esqueléticas son carbonato cálcico, fosfato cálcico y silicatos (14).

Las formaciones esqueléticas más fuertes y ligeras de fosfatos y carbonatos son, por lo general, compuestos bien ordenados de polímeros orgánicos entremezclados con la fase mineral. En otros, el componente mineral es menos preciso. Así, algunos anélidos poliquetos tienen mandíbulas fortalecidas por depósitos de cobre y zinc, de una composición no bien conocida (15).

Además del papel normal en la formación de las partes esqueléticas, parece que la inclusión de depósitos metálicos ejerce un cierto papel en la modificación de las propiedades físicas de un considerable número de tejidos (14).

La segunda función significativa de los depósitos biominerales es que actúan como sistemas de almacenamiento, de modo que, durante períodos de especial demanda fisiológica, los iones pueden ser reutilizados. Esto ocurre durante la amortiguación de los líquidos corporales bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, en el momento de la reparación de las partes duras esqueléticas,

cuando la mineralización tiene lugar siguiendo la muda y en épocas de reproducción y formación de la cáscara del huevo. Claramente los depósitos minerales no sólo están a disposición del organismo como tales, sino que pueden ser movilizados bajo una gran variedad de estímulos (14).

La capacidad biomineralizadora de los organismos multicelulares no depende directamente del organismo en sí, sino de los tejidos específicos. La especificidad celular está bellamente ilustrada en organismos en los cuales un mineral se deposita por células de una región, mientras que un tipo de mineral diferente se forma, simultáneamente, por otras células en otra parte del mismo organismo. Un buen ejemplo es el depósito de carbonato cálcico en el caparazón de un molusco por el epitelio del manto, mientras la magnetita y la sílice se depositan por el epitelio que forma los dientes de la rádula (16, 17).

En algunos casos, las mismas células pueden formar alternativamente depósitos de diferentes orientaciones cristalinas, como ocurre en la secreción de los caparazones lamelares cruzados de algunos moluscos (14).

Se puede concluir, pues, que los fenómenos implicados en la formación de los depósitos minerales varían claramente, tanto por lo que se refiere a las células que se ven implicadas, como por lo que se refiere a los productos que originan.

## LOS PROCESOS DE BIOMINERALIZACIÓN

Todos los sistemas celulares tienen tres propiedades comunes:

Primero, constan, en gran parte, de proteínas disueltas en una solución salina e incluidas dentro de membranas lipídicas.

Segundo, por razones osmóticas y otras más sutiles, la composición de las sales difiere entre la parte interna y la externa de las membranas lipídicas.

Tercero, para mantener la estabilidad osmótica, las células transportan activamente iones a través de estas membranas.

Entre los cationes divalentes, el magnesio se acumula intracelularmente, mientras el calcio se expulsa fuera de la membrana celular. Los iones bicarbonatos y los fosfatos también son transportados a través de estas membranas celulares y actúan como tampón inorgánico para la célula (14). En muchos organismos la forma soluble de los silicatos penetra en la célula y luego es transportada hacia fuera por procesos metabólicos asociados a la membrana (14).

Los principales componentes de los minerales que se forman por actividad de los seres vivos están implicados en la biología normal de la célula y **comparten las propiedades de ser disponibles, escasamente solubles y no tóxicos en el estado sólido** (14).

Los procesos fundamentales asociados con la mayoría de las formas de biomineralización son el transporte de iones por la membrana y la formación

de soluciones sobresaturadas, los efectos de las proteínas y los polisacáridos en la formación y crecimiento de cristales, así como el acotamiento de un espacio por las membranas (14).

Los procesos básicos necesarios para labiomineralización residen, sin embargo, dentro de la mayoría de las células y es interesante observar su gran variedad de expresión, ya que los procesos son muy diversos (14).

Por lo que respecta a los tipos de biomineralización, el espectro de estos procesos puede ser, en principio, fácilmente dividido en casos en los que, de alguna manera se ejerce un control sobre la biomineralización y, aquellos otros, en los que no. Así, se podrían diferenciar procesos que no son diseñados específicamente para biomineralización, pero que provocan la formación de minerales, y otros procesos en los que se dispone de una "maquinaria" específica para el propósito de la biomineralización. Lowenstam (5) acuñó el término *mineralización inducida biológicamente* para la primera situación. La segunda se denomina *mineralización controlada biológicamente*, término propuesto por Mann (18).

Hay otro término: *mineralización mediada por una matriz orgánica*, propuesto por Lowenstam (5). Este es un término más restrictivo, y se refiere más específicamente a la mineralización dentro de una red preformada.

### *Mineralización inducida biológicamente*

La formación de minerales en los ambientes acuáticos, donde viven organismos, no es difícil de obtener. Además, la presencia de productos metabólicos, la liberación de cationes por las células o, la presencia de superficies cargadas (como las membranas celulares), pueden, bajo ciertas condiciones, inducir la precipitación de minerales.

Hay una serie de criterios diferentes para distinguir la mineralización inducida biológicamente de la mineralización controlada biológicamente. En el primer caso, la mineralización ocurre en el ambiente abierto y no en un espacio delimitado para este propósito. No existe una maquinaria celular o macromolecular especializada para inducir la mineralización. Los minerales formados tienen una gran variedad de tamaños y de morfologías y suelen agregarse al azar (1).

La mineralización inducida biológicamente parece el proceso dominante entre los procariotas y los hongos, y ocurre con frecuencia entre algunos eucariotas unicelulares (1).

Un hecho característico de la mineralización inducida biológicamente es, que el tipo de minerales formados es más dependiente de las condiciones ambientales en que el organismo vive, que del proceso biológico implicado

en su formación. Así, el mismo organismo en distintas condiciones puede dar lugar a distintos minerales (1).

Las bacterias sulfato reductoras liberan el sulfuro de hidrógeno al medio ambiente, en donde puede reaccionar con cualquier ion metálico que esté presente en una concentración adecuada. Se ha demostrado que *Desulfovibrio*, en cultivos de laboratorio, puede formar hasta siete minerales de sulfuro diferentes. Procesos semejantes pueden también ocurrir en la naturaleza.

Se sabe que los líquenes producen una variedad de ácidos responsables de la disolución del sustrato donde se encuentran. Así, dependiendo de la mineralogía del sustrato, los líquenes pueden inducir la formación de distintos minerales. Por ejemplo, la especie *Pertusaria corallina* forma habitualmente weddellita, o un oxalato de manganeso —sin nombre específico—; pero cuando el sustrato es una roca volcánica rica en hierro, forma ferrihidrita (19).

Entre los animales, la mineralización inducida biológicamente, es un proceso bastante frecuente. Como ejemplos de ésta nos encontramos con, a) los cristales de calcita formados en el esqueleto axial de los pennatulidos (20) y, b) los cristales de weddellita y brushita que se forman entre las capas de depósitos de calcita biológicamente controlados en la mandíbula o el pico de *Nautilus* (21).

Las algas calcáreas forman una gran variedad de minerales (22). Además, utilizan procesos intermedios entre la mineralización inducida biológicamente y la mineralización controlada biológicamente. Las algas pardas, como *Padina*, forman cristales de aragonito en el ambiente abierto, sin ningún control sobre el proceso. Sin embargo, en las algas rojas *Galaxaura* y *Liagora* y, particularmente, en las algas verdes, *Halimeda*, los cristales se forman principalmente entre las células, en un espacio que puede estar parcialmente comunicado con el ambiente marino (23). Los cristales formados están en asociación con la membrana celular. En el caso de *Chara*, los cristales se forman en regiones de la membrana celular que corresponden al área más alcalina (24). En las algas verdes como *Penicillus*, *Rhipocephalus* y *Acetabularia*, el crecimiento de los cristales ocurre en la membrana (25).

### *Mineralización controlada biológicamente*

Muchos estudios sobre la biomineralización han estado encaminados, sobre todo, a comprender el control que los organismos han desarrollado para la formación de los minerales. A pesar de que solamente se han identificado algunos de estos procesos, ya se sabe que muchos organismos pueden combinar diferentes modos de control para la formación de un único producto final (1). En cada caso, para un exacto conocimiento, sería necesario identi-

ficar y comprender los diversos procesos que intervienen, pero teniendo en cuenta, al mismo tiempo, el hecho de que estos actúan en armonía.

En la mineralización controlada biológicamente, uno de los hechos distintivos es que el sitio en el que el mineral se forma, primero es aislado del ambiente exterior por una barrera a través de la cual los iones no pueden difundir libremente (26, 27). Las bicapas lipídicas, tanto en las membranas celulares como en las vesículas localizadas dentro o fuera de las células, son las más utilizadas para delimitar estos espacios. Otros materiales utilizados para este propósito son las macromoléculas insolubles, como proteínas y/o polisacáridos, que forman láminas impermeables. La mejor caracterizada de estas macromoléculas es la periostracina (28), que es una proteína que forma el principal constituyente de la membrana externa de la concha de los moluscos.

En algunos organismos las barreras utilizadas para delimitar el espacio participan, también, en la formación del propio mineral. Así, por ejemplo, algunos lípidos de la membrana de las vesículas son acídicos y pueden participar directamente controlando aspectos de la mineralización (29). También se ha demostrado que el periostraco de los moluscos y la cutícula de los artrópodos, facilitan la formación de los minerales, como consecuencia de sus propiedades semiconductoras (30, 31).

En algunos procesos de mineralización, particularmente los que ocurren en la mayoría de las partes duras esqueléticas, el espacio organizado por las células y/o las macromoléculas polimerizadas está, además, antes del comienzo de la mineralización, dividido por un ensamblaje de las llamadas macromoléculas de la matriz orgánica.

La matriz orgánica se considera generalmente como un material íntimamente asociado con y dentro de las estructuras mineralizadas. Es, por tanto, distinto de las cubiertas externas esclerotizadas de los invertebrados, tales como el periostraco y la cutícula, aunque ellas puedan tener una estrecha relación con los cristales de los exoesqueletos. Por lo general, el término matriz se utiliza sin implicar necesariamente una función particular. Una definición muy amplia lleva a pensar que la matriz es cualquier superficie organizada que actúa como un mediador de la mineralización (18).

En principio, es importante mencionar que la matriz orgánica, dentro de las estructuras minerales, puede ser compleja y no tiene una composición uniforme en los diferentes grupos biológicos. Se ha demostrado la presencia de proteínas, glucoproteínas, hidratos de carbono y lípidos, en gran variedad de matrices mineralizadas (32, 33). Es importante subrayar que, hasta ahora, no se ha hecho ningún análisis completo sobre una especie. Por lo tanto, no se puede definir ninguna matriz orgánica completa. En las algas marinas, los carbohidratos son el principal componente de la matriz (34). En el caso de los exoesqueletos de invertebrados, se pueden separar dos fracciones orgánicas: una fracción soluble y otra insoluble (35, 36). El análisis de la fracción

soluble de varias especies de moluscos revela la existencia, a su vez, de muchas fracciones distintas con grupos finales de diversa naturaleza química que concentran el calcio (33).

Los grupos aniónicos de la matriz orgánica pueden concentrar el ión calcio en varios sitios, induciendo la sobresaturación necesaria para la nucleación mineral. Esta unión es debida a la alta cantidad de grupos carboxilos de los ácidos aspártico y glutámico (37-39), a los grupos ester sulfato que proveen cargas negativas en residuos de hexosamina (40), o bien secuencias de aminoácidos específicos (41).

Las proteínas solubles de la matriz pueden inhibir la deposición de los minerales (42, 43), aparentemente como consecuencia de la unión de proteínas sobre la red cristalina. No obstante, pueden ser cubiertas por minerales y atrapadas dentro del cristal, influyendo en la resistencia de los cristales y el desarrollo de la estructura microcristalina alrededor de la inclusión (44). Por otra parte, las proteínas de la matriz pueden favorecer el crecimiento de isomorfos o inhibir el crecimiento de ciertas caras cristalinas (39).

La matriz insoluble puede formar una red estructural que posteriormente se cubre por una capa de matriz soluble. Esta disposición, de capas de matriz soluble e insoluble alternadas, fue sugerida por Degens (45). Posteriormente, esta hipótesis fue confirmada mediante estudios bioquímicos y ultraestructurales realizados por Weiner (46).

La deposición de la matriz precede o acompaña la formación de los cristales y, muchas veces, ocupa el medio en el cual se forman y crecen los mismos. En varios invertebrados, la matriz es secretada por las células epiteliales en el sitio destinado a la deposición mineral. En el caso de las plantas y animales, las moléculas orgánicas que forman la matriz están contenidas en pequeñas vesículas en el citoplasma y luego, son transferidas dentro de las vacuolas mineralizadoras por la fusión de sus membranas (14).

En la dentina, la matriz orgánica se forma justo antes de que la mineralización comience. En los dientes de quitón y de peces, la estructura del diente entero es preformada antes de que entre ningún mineral. El diente está rodeado de células epiteliales que establecen la red matriz y proveen los iones para la mineralización. Así, podemos suponer que la estructura de la matriz orgánica es permeable y permite la difusión de los iones al sitio de la nucleación.

## DEPOSICIÓN DE LOS MINERALES

### *Solución sobresaturada*

Una precondition para que ocurra la mineralización es que la solución a partir de la que el mineral precipita debe estar sobresaturada. Además, deben

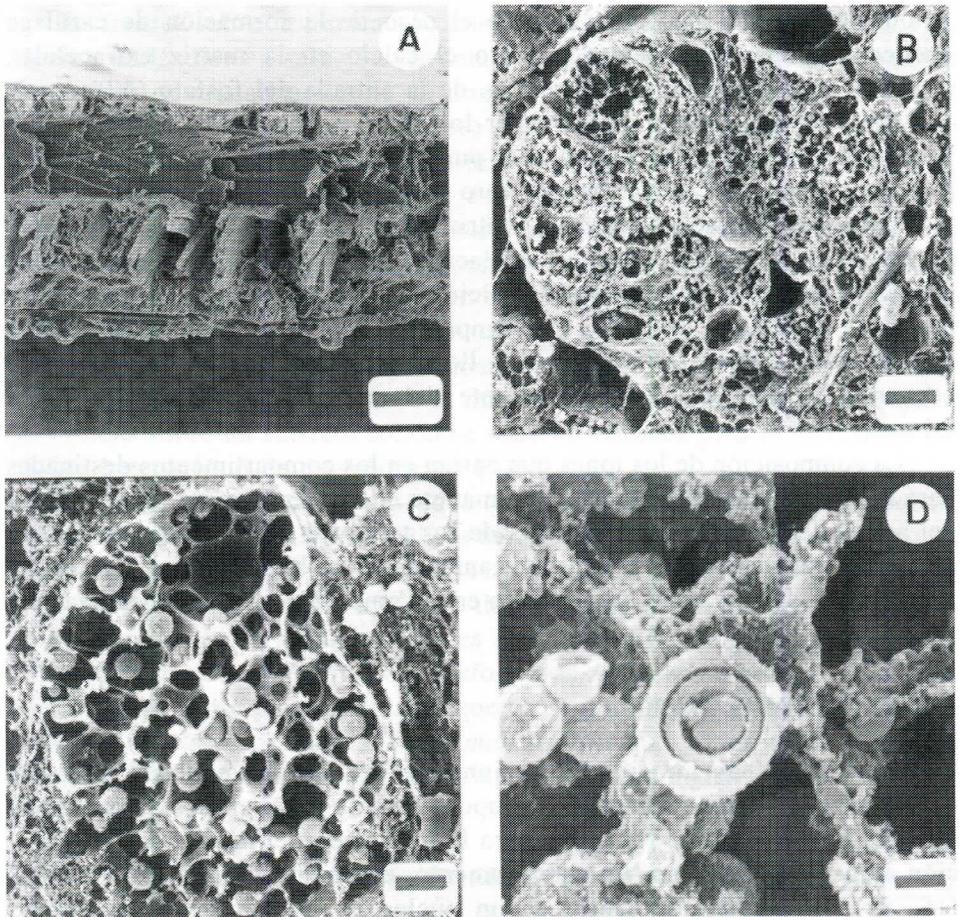


Fig. 2.—Concha de caracol, *Helix aspersa* (caracol común de vega) observadas mediante SEM (Zeiss DSM-950). **A**, Sección transversal de la concha. **B**, Una visión general de la glándula digestiva. **C**, Células de la glándula digestiva (hepatopáncreas) que acumulan calcio (detalle de B). **D**, gránulo cálcico de la célula (detalle de C). Barras: A: 50 µm; B: 20 µm; C: 5 µm; D: 1 µm. (Reproducción por cortesía del Doctor David Porcel Muñoz).

darse las condiciones termodinámicas y cinéticas adecuadas para que la cristalización tenga lugar.

La formación de la solución sobresaturada en los procesos de mineralización controlada biológicamente está dominada por las células. Estas células están bien equipadas para activar el bombeo de los iones elegidos dentro del compartimento destinado para la mineralización y, también, para controlar la biomineralización, determinando el orden de entrada de los iones, la composición iónica y para conseguir el grado de saturación necesario (1). Este

fenómeno ha sido bien estudiado en el caso de la formación de cartílago endocondral, en donde entra primero el calcio en la matriz extracelular, seguido, después de un cierto tiempo, de la entrada del fosfato (47).

Otra estrategia es la de mantener los cationes separados de los aniones hasta que la mineralización está a punto de iniciarse; se sabe que este fenómeno ocurre en cierto foraminífero bentónico (48).

Todas las glucoproteínas de la matriz estudiadas hasta ahora, que aparentemente son esenciales para la regulación de la mineralización, necesitan primero asociarse con los iones de calcio, para luego juntarse en sus conformaciones ordenadas (49, 50). Un compartimento que se subdivide por una estructura de matriz está ya medio lleno de iones de calcio en la fase primaria. La introducción subsiguiente del anión disparará la nucleación mineral.

La composición de los iones que entran en los compartimentos destinados para la mineralización depende de la manera en que estos iones son extraídos del ambiente, transportados a través de los tejidos e introducidos en el sitio de la mineralización (1). Muchos organismos están bien dotados para determinar cuales son los iones que entrarán en el compartimento de mineralización.

### *Nucleación de los cristales*

Cuando la concentración de los iones en la solución aumenta, los iones empiezan a asociarse en pequeños grupos. Cuando estos grupos aumentan de tamaño, la energía libre requerida para la formación del núcleo de cristalización aumenta al máximo. En este momento, el tamaño del núcleo es crítico (18, 51). El número de iones, en un núcleo de cristalización de tamaño crítico, es del orden de 10-1000. Agrupamientos más pequeños que el tamaño crítico tienden a disolverse, disminuyendo su energía libre (14).

La nucleación homogénea o espontánea, probablemente no ocurre en los procesos de mineralización biológica. En estos procesos, otros iones y moléculas, además de varios "cuerpos" y superficies, están siempre presentes y, probablemente, influyen en el proceso (52). Bajo estas condiciones ocurre la nucleación heterogénea y se deposita el mineral sobre superficies existentes, por procesos que pueden ocurrir y continuarse a más bajas sobresaturaciones que la nucleación homogénea.

El proceso de nucleación heterogénea se consigue por los sistemas biológicos, normalmente, mediante la utilización de materia orgánica asociada a los lugares de la deposición mineral (14).

La comparación de los procesos de biomineralización de distintos *phyla*, muestra que el grado del control sobre la nucleación varía enormemente, desde procesos sin ningún control a procesos con un control estricto (46).

El control sobre la nucleación puede ser indirecto, en el sentido de que algunas moléculas en solución pueden, específicamente, inhibir la formación de núcleos de cristalización de un mineral y permitir la formación de otros. Por ejemplo, la adenosina trifosfatada puede causar la formación de fosfato cálcico amorfo por inhibición de la nucleación de la fase cristalina (53).

Generalmente el control directo sobre la nucleación ocurre sobre superficies sólidas especializadas. Estas superficies son más eficaces para la formación del núcleo de cristalización porque el movimiento de los iones que se van a agrupar para formar este núcleo está restringido. Esto se ha demostrado en el caso de la nucleación de los cristales de calcita *in vitro* en presencia de glucoproteínas extraídas de la concha de los moluscos. La presencia de glucoproteínas en solución inhibe la nucleación de calcita, pero cuando están adsorbidas sobre un sustrato sólido se vuelven eficaces para la formación del núcleo heterogéneo de cristalización (39).

Los tipos de sustratos implicados con más probabilidad en la nucleación son las membranas de bicapas lipídicas de vesículas, así como las glucoproteínas y proteoglucanos localizados sobre las superficies de la red de matriz orgánica. La evidencia más convincente de que estas membranas están directamente implicadas en la nucleación, es que son realmente ricas en complejos multimoleculares, proteolípidos y fosfolípidos, capaces de absorber los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (54). Entre los procesos en que están implicadas las bacterias, podemos citar el caso de *Bacterionema matruchotii*, que es un microorganismo oral, que produce cristales de hidroxipatito intracelulares.

## LAS BACTERIAS EN LA BIOMINERALIZACIÓN

### *Las bacterias como agentes geoquímicos*

Desde hace tiempo se conoce la implicación de las bacterias en la precipitación de compuestos cristalinos y su posible intervención en la formación de estos materiales en sus hábitats naturales. En la biosfera, las bacterias pueden ser consideradas como agentes geoquímicos. Así, pueden servir como agentes de concentración, de dispersión o de fraccionamiento de la materia (55).

A.—*Como agentes de concentración.* Llevan a cabo la acumulación de materia inorgánica mediante distintos procesos que se desglosan a continuación.

a) Deposición intracelular, como en el caso de las bacterias púrpuras del azufre y otras que depositan los gránulos de azufre dentro de sus células.

b) Promoción de la precipitación de compuestos extracelulares insolubles, especialmente carbonatos y fosfatos.

En relación a los carbonatos cabe citar:

— Carbonato cálcico, ( $\text{CaCO}_3$ ) tanto en forma de calcita (56-60) como de aragonito (61-67).

— Estroncionita,  $[\text{SrCO}_3]$ , (58).

— Dolomita,  $[\text{CaMgCO}_3]$ , (68).

En relación a los fosfatos, destacan:

— Estruvita,  $[\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ , (69-77).

— Apatito,  $[\text{Ca}_5(\text{F},\text{OH})(\text{PO}_4)_3]$ , (78).

— Bobierrita,  $[\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$ , (79).

— Fosfato cálcico,  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ , (80).

c) Adsorción a nivel de la superficie celular, como el caso de la unión de varios metales a la pared celular (81-83).

d) Absorción y fijación a nivel de células, como en el caso de la captación del mercurio por algunas bacterias (55).

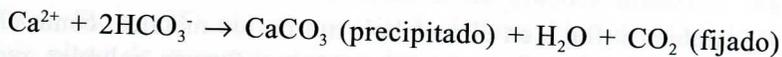
B.— *Como agentes de dispersión.* Estos serían los casos en que actuarían promoviendo la disolución de minerales insolubles. Por ejemplo, la disolución del carbonato cálcico por el dióxido de carbono procedente de la respiración, o la reducción bioquímica del óxido de hierro o dióxido de manganeso a compuestos solubles (55).

C.— *Como agentes de fraccionamiento.* En este sentido se entiende la actuación que selectivamente pueden ejercer sobre una mezcla de compuestos inorgánicos para promover cambios químicos selectivos de uno o de algunos compuestos de la mezcla, causando una concentración o dispersión selectiva. Por ejemplo, el caso de la oxidación de arsenopirita por *Thiobacillus ferrooxidans* (84).

### *Mineralización bacteriana extracelular*

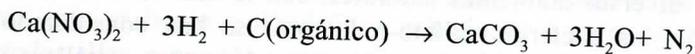
Las bacterias, en conjunto, presentan una gran variedad de vías metabólicas y liberan con frecuencia gran cantidad de productos metabólicos al medio ambiente. De hecho son, a menudo, el centro de una gama extensa de

procesos de mineralización. Por ejemplo, la captación fotosintética de dióxido de carbono a partir de las aguas dulces o aguas de mar, que contienen iones de calcio y de bicarbonato, puede llevar a la precipitación de carbonato cálcico:

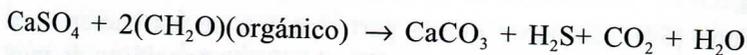


La fijación de dióxido de carbono puede ocurrir también en la oscuridad por una diversidad de organismos quimiolitótrofos tales como las bacterias nitrificantes, las bacterias oxidadoras del hierro, las bacterias verdes y purpúreas fotosintéticas anoxigénicas y las cianobacterias. Por lo tanto, en medios adecuados varias bacterias forman calcita, o cuando hay presencia de iones de magnesio, aragonito (63). No obstante, la importancia de las bacterias en estos procesos es sólo una consecuencia de las diferentes actividades metabólicas que llevan a cabo.

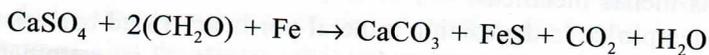
La reducción de nitrato por heterótrofos puede inducir la deposición de carbonato cálcico:



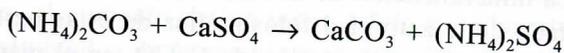
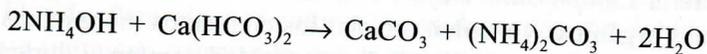
La reducción del sulfato por *Desulfovibrio* puede también inducir la precipitación del carbonato cálcico:



La presencia del hierro conduce a la formación de sulfuro de hierro y de carbonato cálcico:

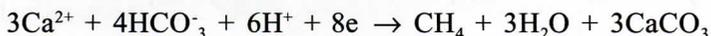


Un efecto semejante puede producirse por las bacterias aeróbicas y anaeróbicas que liberan el amonio después de la desaminación oxidativa de los aminoácidos:



Según Deelman (85), es posible identificar dos tipos de mecanismos en la precipitación bacteriana del carbonato cálcico: a) intervención de las vías metabólicas de la bacteria para la precipitación de este compuesto cristalino y, b) cambio en el potencial de oxidación-reducción, en este caso a un pH 7.0 y

un potencial redox ( $E_o$ ) de 250 a 300 mV. En estas condiciones el bicarbonato y el  $H^+$  se combinan para formar el metano y el carbonato cálcico.



El  $E_o$  también influye en el metabolismo de los metales, como el hierro y el manganeso, que pueden presentarse como formas solubles reducidas ( $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) o como formas insolubles oxidadas ( $Mn^{4+}$ ,  $Fe^{3+}$ ). Así, las actividades bacterianas que afectan el pH o el  $E_o$  pueden también influir en la distribución de estos metales de manera indirecta, por vía de óxido-reducción, o de una manera directa, proveyendo sitios inorgánicos de enlace.

Para Kusnetzov *et al.* (86), los microorganismos tienen una actividad geoquímica que fue importante para la deposición de minerales en el pasado. Según Kusnetzov (87), la actividad de los microorganismos del ciclo del azufre está relacionada con la formación de depósitos de azufre elemental en ambientes marinos. Otros autores, como Ivanov (88), Domka & Gasiowek (89) y Trudinger (90), también relacionaron la precipitación de azufre elemental, en diversos ambientes naturales, con la actividad de estas bacterias.

Además, las bacterias sulfato-reductoras se han considerado como las responsables de la formación de varios tipos de menas metálicas de sulfuros (90, 91, 92). Sin embargo, Trudinger (93), indica que la participación biológica en la formación de sulfuros metálicos (de Cu, Ag, Pb, Zn, U) es, como mucho, indirecta.

Doetsch y Cook (57), afirmaron que la participación de las bacterias en la formación de depósitos geológicos de considerable importancia no es muy probable. Sin embargo, apuntaron que la actividad bacteriana puede ejercer una gran influencia en la génesis de depósitos de calcita, yeso, azufre elemental y varias menas metálicas.

Otro ejemplo de la deposición mineral por la actividad bacteriana son los estromatolitos, que son estructuras biosedimentarias. Los estromatolitos son bien conocidos en el registro fósil y todavía se forman en algunos sitios, tales como Australia Occidental. En realidad, el estromatolito es una comunidad microbiana, aunque puede estar dominado por una sola especie como la oxifotobacteria *Entophysalis major*. Los filamentos de estos organismos contienen vainas orgánicas y pueden reciclar los elementos inorgánicos dentro de la comunidad. La mineralización de la comunidad comienza durante el verano. Como resultado de la actividad fotosintética de estas oxifotobacterias, el pH aumenta, facilitando la precipitación de  $CaCO_3$  en el mar. La deposición mineral se realiza, en primer lugar, en la capa de polisacáridos que envuelve a la bacteria. Al endurecer, el filamento pierde su apariencia translúcida, adquiriendo un color marrón y opaco con un interior duro. Simultáneamente hay una deterioración de *Entophysalis* y sólo queda fuera del depósito mine-

ral una fina película de células vivas. Esta película se verá poblada luego por una gran variedad de bacterias y algas, algunas de las cuales son destructoras de los estromatolitos (94).

Obviamente, hay situaciones ecológicas muchísimo más complejas en las cuales las bacterias inducen la formación de grandes depósitos minerales. Margulis y Stolz (95) observaron en la laguna Figueroa, Méjico, que la superficie plana de evaporita parece desierta y deshabitada, pero por debajo de la costra mineral hay una comunidad microbiana diversa. El medio centímetro superior contiene una comunidad fotosintética que fija el dióxido de carbono y que aumenta la deposición de aragonito. Por debajo de esta hay varias especies bacterianas heterotróficas que depositan los óxidos de manganeso; mientras que las bacterias que reducen el sulfato producen sulfuro de hidrógeno, precipitando varios sulfuros metálicos.

#### — *Precipitación bacteriana de carbonato cálcico*

El carbonato cálcico es un compuesto químico que tiene la particularidad de presentar tres variantes polimórficas cristalinas. La configuración más estable de todas ellas, a presión y temperatura ambiental, se denomina calcita, la cual cristaliza en el sistema trigonal en una estructura de alta simetría. La segunda variedad, el aragonito, cristaliza en el sistema rómbico con una estructura también de gran simetría; es ligeramente inestable con respecto a la calcita, por lo que con el tiempo sus átomos pasan a adoptar la configuración de ésta. La última variante, la vaterita, que cristaliza en el sistema hexagonal con una estructura bastante desordenada, es muy inestable con respecto a las otras dos anteriormente citadas. Esta es la razón de que en los sistemas biológicos, en todos los *phyla*, puedan encontrarse agrupaciones cristalinas de los dos primeros tipos de polimorfos. De hecho, la mayor parte del carbonato cálcico de origen orgánico se presenta en la forma de calcita o aragonito. Por el contrario, la presencia de vaterita sólo se ha registrado en muy pocos grupos filogenéticos.

Entre los depósitos de  $\text{CaCO}_3$  existentes en la Tierra, un caso de gran importancia lo constituyen los bancos sedimentarios de las Bahamas, en las costas de Florida. Para algunos autores, estos depósitos son debidos a procesos físicos o químicos, afirmando que la precipitación de carbonatos se debe a la evaporación, al aumento de los iones calcio y carbonato, al incremento del pH, de la salinidad o de la temperatura (96, 99). Para otros autores son debidos a la actividad bacteriana. Así, la precipitación bacteriana de  $\text{CaCO}_3$  fue descrita por primera vez por Murray e Irvine (100). Estos autores relacionaron la precipitación del carbonato cálcico con la actividad bacteriana al observar, en medios de agua de mar adicionados de orina en descomposición

y en putrefacción, formación de este compuesto cristalino. A partir de este momento la implicación de las bacterias en la deposición de carbonato cálcico fue puesta de manifiesto por varios autores. Nadson (101) demostró que los depósitos de  $\text{CaCO}_3$  existentes en el lago Veisowe de Karkou (Rusia) podían tener su origen en la actividad microbiana, ya que al incubar sedimentos del fondo del lago con agua no estéril procedente del mismo, se observaba formación de  $\text{CaCO}_3$ . Luego, de los sedimentos de este lago, Nadson aisló numerosos microorganismos de diferentes especies como *Proteus vulgaris*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus salinus*, *Bacterium-albo-luteus*, *Actinomyces albus*, *Actinomyces verrucosis* y *Actinomyces roseolus*. Este autor observó, también, la formación de este compuesto cuando incubaba sedimento estéril con un cultivo puro de *P. vulgaris* y cuando cultivaba *B. mycoides* en diferentes medios de cultivo (caldo y agar nutritivo y medio de gelatina). Para Drew (102, 103), las bacterias desnitrificantes eran las responsables de la deposición de  $\text{CaCO}_3$  en los sedimentos de la Gran Bahama. A partir de estos sedimentos aisló una bacteria desnitrificante que la llamó *Bacterium calcis*, y demostró que era capaz de precipitar carbonato cálcico en medios de cultivo artificiales, provistos de nitrato potásico y de una sal orgánica de calcio. Así mismo, afirmó que el nitrato potásico era un factor indispensable para que ocurriera la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . Posteriormente, Kellerman y Smith (104) identificaron la bacteria aislada por Drew como *Pseudomonas calcis*. Por otra parte, Lipman (96), indicó que las bacterias marinas son capaces de formar  $\text{CaCO}_3$  siempre que haya en el medio gran cantidad de sales solubles, entre ellas sales orgánicas e inorgánicas de calcio. Además, encontró que el nitrato potásico no era necesario para la precipitación de carbonato cálcico.

Con objeto de dilucidar los grupos bacterianos implicados en la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ , se hicieron varios estudios taxonómicos. Según Bavendamm (105), la precipitación de este compuesto es un importante proceso geoquímico que no está restringido a la actividad de un grupo determinado de bacterias. Así, las bacterias autótrofas y heterótrofas, incluyendo bacterias del azufre, bacterias fotosintéticas, bacterias que hidrolizan la urea, bacterias agarolíticas, celulolíticas y fijadoras de nitrógeno, todas ellas están implicadas en la formación de  $\text{CaCO}_3$ . Posteriormente, McCallum y Guhathakurta (64), realizaron un estudio con veinticuatro bacterias aisladas del banco de las Bahamas sobre la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  en diferentes medios de cultivo líquidos, modificando las condiciones de temperatura y pH. Estas bacterias pertenecían a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio* y *Streptomyces*. Obtuvieron precipitación de este compuesto en todos los medios y condiciones experimentales ensayados. Finalmente, Boquet *et al.*, (56) encontraron que la formación de carbonato cálcico por bacterias es un fenómeno general; así, en condiciones favorables todas las bacterias pueden formar cristales de calcita.

También se han realizado varios estudios para comprobar la influencia de

distintos factores sobre la precipitación bacteriana de  $\text{CaCO}_3$ . Se ha encontrado, por ejemplo, que un exceso de sales, tiene un efecto negativo sobre la precipitación bacteriana de aragonito (66, 106, 107).

De otra parte, se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . Para Ferrer *et al.* (106, 107) las altas temperaturas favorecen la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . Sin embargo, Rivadeneyra *et al.* (108) observaron que la temperatura sólo influye en la formación del carbonato cálcico cuando las condiciones externas no son las más adecuadas para su precipitación. Así, a altas concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$ , la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  se hace muy difícil y la temperatura puede tener un efecto importante sobre su formación. Sin embargo, a concentraciones bajas de  $\text{Mg}^{2+}$ , que es una condición adecuada para la precipitación de este compuesto cristalino, la temperatura tiene poco efecto. En el caso de la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  por bacterias halófilas, Rivadeneyra *et al.* (109), observaron que la temperatura y la concentración externa de sales influyen en la precipitación, ya que estos dos factores producen importantes cambios en la composición interna y la actividad fisiológica de estas bacterias, como había sido demostrado por Morita (60) y Quesada *et al.*, (110).

El fosfato tiene un efecto inhibitor sobre la precipitación de este compuesto cristalino. Además, el sulfato amónico (0,05%) inhibe la formación de calcita en cultivos de *Azotobacter* spp (111, 112).

#### — Precipitación bacteriana de fosfatos

El fósforo se presenta fundamentalmente en la naturaleza en forma de fosfatos, solubles e insolubles. Dentro de los fosfatos insolubles el más abundante es el apatito  $[(\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH}))]$ , donde el radical libre puede estar representado exclusivamente por F, Cl u OH, o por una combinación de ellos. El apatito normalmente aparece formando depósitos en ambientes marinos.

La precipitación bacteriana de apatito fue puesta de manifiesto por varios autores. Así, Rizzo *et al* (113), observaron la precipitación de apatito por *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces israeli*, *Actinomyces naeslundii* y *Bacterionema matruchotii* en el estómago de animales, sugiriendo que estos microorganismos están implicados en la formación biológica del apatito. Luego, Mc Connell (114), afirmó la intervención de los microorganismos en la precipitación de depósitos de apatito en ambientes marinos. Más tarde, Ennever *et al.* (115), estudiando el papel de los fosfolípidos bacterianos, encontraron que *in vitro* su papel es más de intermediarios de la precipitación de apatito que de agentes catalíticos. Un año después, Piter y Codespoti (116) afirmaron que la formación de carbonato fluorapatito en aguas de mar, es

debida a la desnitrificación bacteriana en las últimas capas de oxígeno del océano. Posteriormente, Lucas y Prevot (117-119), investigaron la precipitación bacteriana de apatito en agua de mar y agua dulce, adicionadas de ARN y fuentes de calcio, como calcita, aragonito y yeso. Como consecuencia de los resultados obtenidos, propusieron un mecanismo de precipitación basado en la ruptura del ácido ribonucleico por acción bacteriana: la D-ribosa proporcionaría la energía necesaria para el desarrollo microbiano, mientras que el ácido fosfórico precipitaría apatito por combinación con el calcio procedente de los carbonatos. Además, observaron que en los cultivos de agua dulce el tiempo de aparición de los cristales era más corto que en las aguas de mar, fenómeno que lo atribuyeron a un posible efecto inhibitor de los iones de magnesio presentes en el agua marina. Estos autores sugirieron que dicho modelo biogeoquímico puede explicar, en parte, la génesis de depósitos de apatito en la naturaleza.

El fosfato también puede aparecer en la naturaleza como sales de calcio, aluminio, hierro o magnesio. Estos precipitados son más frecuentes en suelos y sedimentos. Para algunos investigadores, la precipitación de fosfatos en suelos y sedimentos, es debida a la actividad metabólica de los microorganismos. Como consecuencia del metabolismo puede producirse la liberación de iones activos de calcio, aluminio y hierro a partir de combinaciones orgánicas e inorgánicas de dichos iones. Por otra parte, su influencia sobre el pH y la energía libre puede ser también un factor influyente en la formación de éstos fosfatos insolubles (120, 121). Para Youssef (122), la mineralización del fitoplacton es la responsable de la formación de los depósitos de fosfato cálcico en fondos marinos, explicando este proceso como una acumulación localizada de fosfato, que luego precipita cuando reacciona con el calcio del agua del mar.

Entre los fosfatos insolubles que han merecido especial atención por los microbiólogos se encuentra la estruvita ( $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Ello es debido, por una parte a que muchos tipos de bacterias pueden producir este mineral en condiciones de laboratorio y, por otra, por haberse establecido una relación entre su presencia en los cálculos renales y las infecciones urinarias.

En la naturaleza, la estruvita puede encontrarse asociada con la materia orgánica en descomposición como, por ejemplo, en los depósitos de guano (por ello también llamada guanita), en las tierras pantanosas, en estiércoles, en sedimentos ricos en restos orgánicos, en cuevas basálticas (123, 124). Por otra parte, Handschuh y Orgel (125), y McConnell (126) sugirieron que la estruvita pudo precipitarse a partir de la evaporación del agua de mar en la Tierra primitiva. Para Lindsay *et al.* (127) y Das & Datta (128), la estruvita se forma en suelos a partir de los fertilizantes de fosfato amónico.

La estruvita es un mineral que cristaliza en el sistema ortorrómbico. Es un hecho bien conocido que la estruvita se caracteriza por la diversidad de

formas y hábitos cristalinos que presenta, tanto el mineral como las fases artificiales (129).

Sarkar (130) realizando experimentos isotermales, demostró que la estruvita es inestable en el aire a temperaturas por encima de 50°C. Además, observó que este mineral puede perder todo o sólo una parte de su amonio y también sus moléculas de agua, dependiendo del tiempo de exposición y de la temperatura. El producto final es un fosfato ácido de magnesio, que cuando se rehidrata forma estruvita o newberiyta. De otra parte, este autor observó que al calentar la estruvita en presencia de un exceso de agua, sólo pierde 5 moléculas de agua para formar la dittmarita.

La primera descripción de la producción de estruvita por bacterias fue hecha por Robinson (69), quien sugirió que los microorganismos pueden precipitarla como consecuencia de la combinación de los iones amonio, producidos por el metabolismo de compuestos nitrogenados, con el fosfato y magnesio presentes en el medio. Robinson también adelantó la hipótesis de que la formación bacteriana de este mineral puede ser la razón de la presencia de estruvita en la naturaleza. Resultados similares fueron encontrados, más tarde, por Beavon y Heatley (70), trabajando con la producción de estruvita por *Staphylococcus aureus*. En el caso de *Bacillus pumilus*, Nelson *et al.* (131) explicaron la liberación del ión amonio, necesario para la formación de estruvita, como consecuencia de la degradación de las células vegetativas por autolisinas.

Rivadeneira *et al.* (71) observaron que no hay ninguna correlación entre la producción de estruvita y el grupo taxonómico de las cepas productoras de este mineral. También, mostraron que la producción bacteriana de estruvita no es un fenómeno general. Además, en este mismo trabajo, estos autores demostraron que la producción de amonio no era el único factor responsable de la precipitación de estruvita por bacterias, ya que, el 75% de las cepas que no producen estruvita también liberan el amonio durante su crecimiento.

Se han realizado, además, estudios acerca del efecto de varios factores sobre la precipitación de estruvita. Beavon y Heatley (70), encontraron que el ión magnesio favorece su precipitación, mientras el calcio la inhibe. Resultados similares fueron encontrados por Rivadeneira *et al.* (71).

En cuanto al efecto de la aireación, Malone y Towe (132), estudiaron la formación de estruvita en cultivos bacterianos de agua de mar sometidos a distintos niveles de aireación, concluyendo que la aireación influía de forma positiva sobre la precipitación de la estruvita. Pérez-García *et al.* (133), trabajando sobre la precipitación de estruvita en cultivos de *Arthrobacter* sp y *Pseudomonas* sp, encontraron que la agitación ayuda a la formación de estruvita como consecuencia de la influencia de la misma sobre el crecimiento bacteriano.

La precipitación de estruvita en medios de agua de mar (natural o artificial) conteniendo cloruro magnésico o sulfato magnésico, ha sido descrita por Shinano y Sakai (134) en cultivos puros de *Pseudomonas calciprecipitans*, y por Malone y Towe (132), en cultivos de bacterias marinas. Los resultados obtenidos con estas dos fuentes de magnesio muestran que ambas son favorables para la precipitación bacteriana de este mineral. Resultados similares fueron encontrados, más tarde, por Pérez-García *et al.* (73) y Entrena (135), quienes confirmaron que la fuente de magnesio juega un papel importante en la formación de estruvita por bacterias. Estos autores observaron que, el sulfato y el cloruro magnésico son las fuentes más favorables para la precipitación, mientras el acetato y el carbonato magnésico son fuentes inapropiadas para la formación bacteriana de este compuesto cristalino. Shinano y Sakai (134) estudiaron también el efecto de la concentración de iones magnesio en la formación de carbonatos por *P. calciprecipitans*. Además, observaron formación de estruvita cuando la concentración de magnesio se aumenta con respecto a la de calcio. Así, con una relación de  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  de 4.0, 5.0 y 6.33 encontraron una cantidad considerable de estos cristales, mientras que a una proporción de  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  de 3.0, sólo se produjeron trazas de este compuesto cristalino.

En relación al pH, Boistelle *et al.* (136, 137), observaron que la estruvita puede formarse en orinas estériles tanto a pH ácido como alcalino, siempre y cuando las concentraciones de magnesio, amonio y fosfato sean idóneas para la cristalización. Resultados similares fueron encontrados por Pérez-García *et al.* (74) y Ben Omar *et al.* (76), quienes observaron que la estruvita se forma tanto bajo condiciones iniciales de cultivo ácidas como alcalinas. Sin embargo, estos autores afirmaron que los mejores resultados se obtienen para valores de pH entre 7 y 8.

La temperatura también tiene un efecto sobre la precipitación bacteriana de estruvita. Así, Rivadeneyra *et al.* (72) trabajando con la precipitación de estruvita por 54 cepas bacterianas aisladas del suelo y de las aguas dulces, encontraron que la precipitación de este compuesto cristalino se da en todas las temperaturas ensayadas. Los mejores resultados, sin embargo, se obtuvieron a 5°C y 25°C. Además, encontraron que la precipitación de los cristales disminuye por encima de 30°C.

En relación con la diversidad de morfologías con que puede presentarse la estruvita según se ha dicho más arriba, Ben Omar *et al.* (138) trabajando con mixobacterias, especialmente con *M. xanthus* y *M. coralloides*, encontraron que estas bacterias son capaces de originar una gama de hábitos cristalinos, agrupaciones y drusas verdaderamente notable (Fig. 3).

Finalmente, González-Muñoz *et al.* (139) encontraron trabajando con *M. coralloides*, que este microorganismo es capaz de producir en medios de cultivo líquidos estáticos, junto con la estruvita, cantidades menores de fosfatos

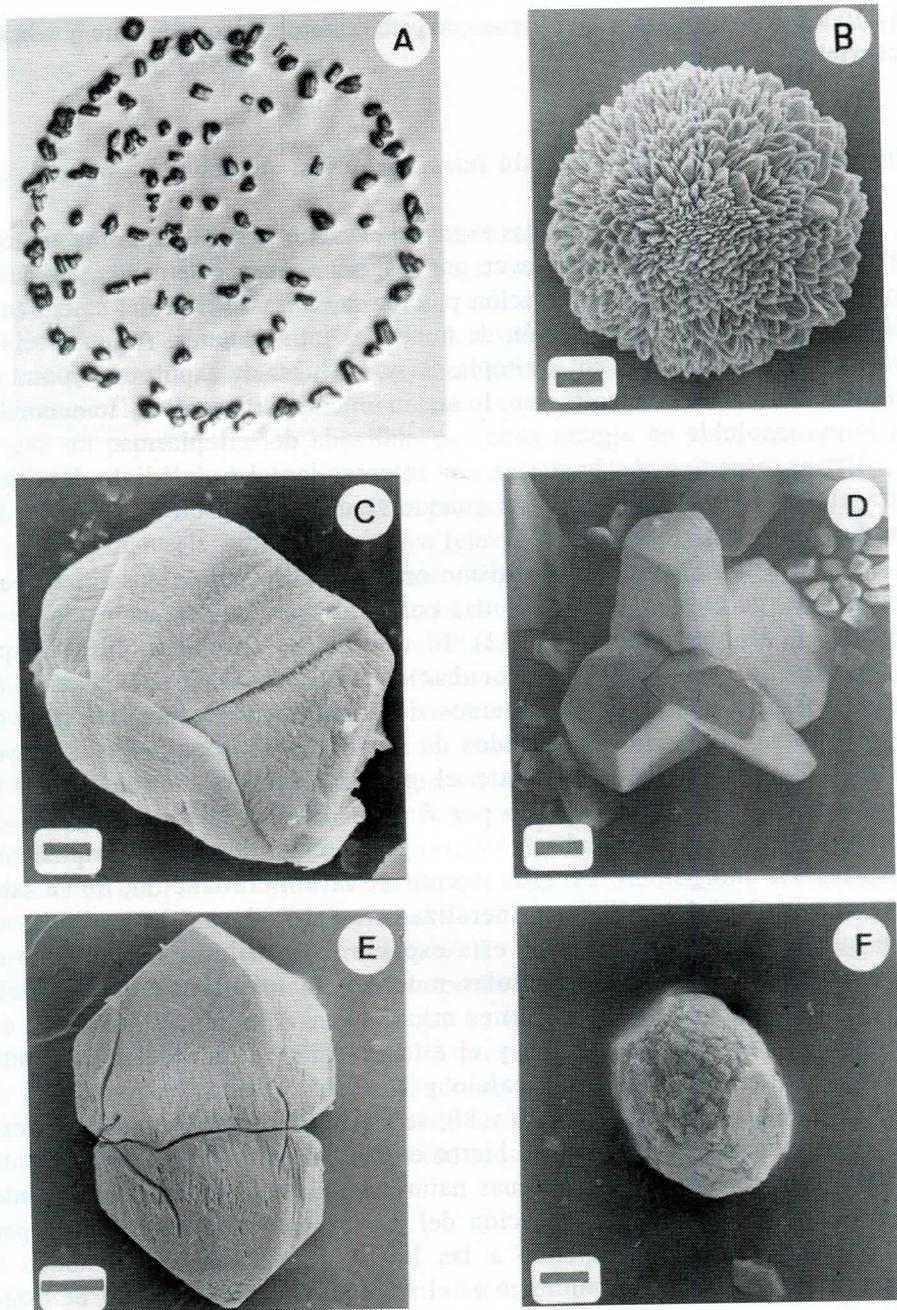


Fig. 3.—Cristales producidos por Mixobacterias. **A.** Cristales de estruvita producidos en medio sólido, observados mediante microscopía óptica (amplificación  $\times 17,6$ ). **B.**, **C.**, **D** y **E.** Variantes morfológicas de estruvita observada mediante SEM (Zeiss DSM-950). **F.** Calcita. Barras: **B:** 50  $\mu\text{m}$ ; **C:** 10  $\mu\text{m}$ ; **D:** 200  $\mu\text{m}$ ; **E:** 200  $\mu\text{m}$ ; **F:** 10  $\mu\text{m}$ .

y sulfatos considerados singenéticos con este mineral, concretamente newberita, schertelita y taylorita.

### *Bioacumulación y mineralización intracelular*

Parece ser que todas las células expulsan el calcio de sus citoplasma al medio ambiente extracelular y lo sustituyen por magnesio. Frecuentemente, una de las primeras señales de una perturbación patológica, es la entrada del calcio en la célula, seguido de la precipitación de minerales intracelulares. Algunas células permiten que entre calcio en el citoplasma y, en lugar de expulsarlo contra un gradiente de mayor concentración, lo aíslan en compartimentos y lo acumulan en forma insoluble en alguna zona especializada del citoplasma.

Varias especies de bacterias de interés dental y médico depositan intracelularmente el hidroxiapatito cuando se cultivan en un medio que contiene calcio y fosfato (140, 141).

*B. matruchotii*, un microorganismo oral, fue utilizado extensamente bajo condiciones de cultivo bien definidas para el estudio del mecanismo de la deposición de hidroxiapatito (142). El mineral se forma después de que hayan pasado varios días de incubación (142, 143). Los cristales de hidroxiapatito pueden estar dispersos dentro del citoplasma, en caso de mineralización ligera, o depositados de manera densa ocupando la mayor parte de la célula (144). Durante el período anterior a que ocurra la mineralización del hidroxiapatito por *B. matruchotii*, la concentración de proteolípidos aumenta, cambian su composición iónica y la composición de su fosfato inorgánico. En el momento de la mineralización, no se sabe con seguridad si las células mineralizadas están vivas. En realidad, se sabe que las células muertas de esta especie forman intracelularmente el hidroxiapatito (143). En las células muertas, la membrana de la célula permite la libre entrada de los iones minerales y el establecimiento de un nuevo equilibrio entre el medio y el citosol. El resultado es un aumento de la concentración interna en calcio y fósforo (142).

En las décadas de los años 70 y 80, se descubrieron unas nuevas formas interesantes de mineralización del hierro en las bacterias. Varias especies de bacterias que se encuentran en aguas naturales muestran un comportamiento magnetotáctico, es decir, la dirección del movimiento está determinada por una orientación que corresponde a las líneas de un campo magnético o geomagnético. Este comportamiento es el resultado de las partículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) que están dentro de la célula (145-149). Las partículas pueden aparecer en formas cúbicas, rectangulares, paralelepípedicas, o en puntas de flecha (150) y están organizadas en una o dos cadenas (151). Estas partículas pueden formarse dentro de las membranas orgánicas. No obstante,

todavía no se sabe con certeza si realmente estas membranas están implicadas en este proceso. (14).

### *El posible doble papel de las bacterias en los procesos de biomineralización*

Las bacterias han tenido una influencia fundamental, tanto en la evolución de otras formas de vida, como en la composición de la corteza terrestre (14). Su interacción con el medio ambiente ha permitido, indirectamente, la deposición de minerales. Y, para que ocurra esto, las bacterias han desarrollado procesos espaciales, químicos y estructurales, que forman la base de todos los procesos de biomineralización en los que intervienen. Para Morita (60) los microorganismos juegan un papel activo en la precipitación de calcita en la naturaleza, sugiriendo que la célula bacteriana actúa como núcleo heterogéneo de cristalización de calcita. Por otra parte, podrían promover la precipitación indirecta de este mineral mediante la acción metabólica (elevación del pH, producción de  $\text{CO}_2$ ).

González-Muñoz *et al.* (75) afirmaron que para la producción de estruvita por *Myxococcus coralloides* no sólo basta con el suministro del ión amonio, y de un pH alcalino en el medio de cultivo, sino que es necesaria la presencia física de la bacteria. Más tarde, Ben Omar *et al.* (77) encontraron que las células muertas y/o restos celulares de *M. xanthus* podrían actuar pasivamente, como núcleos heterogéneos de cristalización, cuando estuviesen presentes los iones precisos. Estos autores observaron que, en condiciones de concentración de los mismos en las que de forma espontánea no se daría la cristalización, las bacterias muertas presentes provocan que esta se de. Resultados similares fueron también encontrados por Rivadeneyra *et al.* (152) trabajando con *Azotobacter* y *Pseudomonas*. Posteriormente, González Muñoz *et al.* (153, 154) pusieron de manifiesto que las membranas celulares de *M. xanthus* y *E. coli* pueden actuar como núcleos heterogéneos de cristalización para la producción de estruvita y calcita.

De todo esto se puede concluir que las bacterias inducen la mineralización en un doble sentido: primero —en los procesos más simples— proporcionando los iones necesarios y/o provocando un pH adecuado, como consecuencia del metabolismo, para la formación de un mineral. Y, segundo, dentro de un proceso de biomineralización inducida más avanzada, actuando como matriz para la cristalización.

### UN PROCESO PATOLÓGICO DE BIOMINERALIZACIÓN: RELACIÓN UROLITIASIS-INFECCIÓN

Además del papel que las bacterias desempeñan en la formación de depósitos minerales en sus hábitats naturales (57, 86, 88, 155), juegan tam-

bién un importante papel en ciertos procesos patológicos. Es un hecho demostrado que los cuerpos extraños dentro de las vías urinarias pueden ser asiento de acúmulos cristalinos y formación de cálculos. Por ello, es lógico suponer que, una condensación bacteriana se comporte como tal.

La infección urinaria produce una serie de alteraciones que van a facilitar la litogénesis:

- a) lesión de vías excretoras.
- b) obstrucción o estenosis de las mismas.
- c) modificaciones del pH.
- d) aparición de cuerpos extraños en orina que destruyen el equilibrio cristales-coloides produciendo la precipitación.

Robinson, (69), relacionó por primera vez la litogénesis con la infección bacteriana, sugiriendo que la producción de cálculos en el cuerpo humano puede ser la consecuencia de la liberación de amonio por el metabolismo bacteriano. Rosenow y Meiser (156) relacionaron la formación de cálculos del tracto urinario con *Streptococcus* sp. Posteriormente Boquet (157), obtuvo en medios de cultivo a base de orina estéril adicionada de acetato cálcico, la precipitación de carbonato cálcico por bacterias aisladas de cálculos renales. En este mismo año Keefe (158), observó que distintas especies bacterianas, aisladas de individuos litiásicos (*Enterobacter aerogenes*, *P. vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter intermedius*, *Edwardsiella tarda* y *Escherichia coli*) precipitaban pirofosfato cálcico, hidroxapatito y carbonato cálcico. Así mismo, Keefe y Smith (159) observaron la precipitación de cristales intracelulares en los microorganismos anteriormente citados. En un estudio realizado por García de la Peña (160) sobre 1102 cálculos, comprobó que, el 13% de los cálculos ensayados tenían como origen una infección bacteriana, siendo más frecuente su presencia en mujeres que en hombres.

Más tarde, Cohen *et al.* (161), observaron la producción de cristales intracelulares de calcita y apatito al cultivar bacterias con distinta actividad ureásica en medios de orina. Afirmaron que las bacterias actúan acumulando cristales intracelulares que, posteriormente, servirían de núcleos para la producción de cálculos renales. Por otra parte, Curtis Nickel *et al.* (162), afirmaron que el papel que desempeñan las bacterias en la litogénesis está relacionado con la secreción por las mismas de productos (glucocalix) que iniciarían la nucleación y agregación paulatina para la formación macroscópica de los cálculos.

En el cálculo se puede distinguir dos tipos de componentes fundamentales:

— Sustancias cristalinas: capaces de aparecer sobresaturadas en la orina,

por ejemplo, weddellita, apatito, estruvita, whewellita, hidroxapatito, whitlockita, brushita, entre otras.

— Matriz orgánica: su composición es puramente orgánica, generalmente, mucoproteínas. Además, tiene una importancia secundaria, excepto en los cálculos ricos en fosfato cálcico en los que puede ser realmente matriz calcúlosa.

Algunos autores asocian la infección bacteriana con la formación de cálculos renales de distinta naturaleza química. Sin embargo, son los cálculos de estruvita los más ampliamente relacionados con la infección urinaria, siendo numerosos autores los que afirman que estos son siempre consecuencia de infecciones bacterianas (163-166).

Para Griffith *et al.* (163), la actividad de las bacterias ureasa positivas causa una alcalinización de la orina, responsable de la sobresaturación y posterior cristalización de estruvita y del carbonato-apatito  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3]$  en ella. Así mismo, Griffith y Musher (167) observaron que la inhibición de la ureasa puede evitar la formación de los cálculos renales inducidos por infección. Resultados similares fueron encontrados por Grenabo *et al.* (168), trabajando sobre precipitación de estruvita con orina sintética, por microorganismos ureasa positivos (*Ureaplasma urealyticum* y *Proteus*) y ureasa negativos (*E. coli*). Obtuvo formación de este mineral sólo por las bacterias ureasa positivas, además de una elevada alcalinización de los cultivos, fenómeno por el que concluyeron que, la elevada alcalinización es la responsable de la precipitación de estruvita. Además, observaron que al adicionar ácido acetohidroxámico —que es inhibidor de la ureasa— a los cultivos de microorganismos ureasa positivos, se previene tanto la alcalinización como la precipitación de estruvita.

McLean *et al.* (169) demostraron que los patógenos urealíticos colonizan las células epiteliales del riñón y forman un glucocalix que queda atrapado en el interior de las microcolonias. Por otra parte, la actividad ureasa de estos microorganismos produce una orina alcalina en la que precipita la estruvita y el apatito. El glucocalix atrapa dichos cristales así como otros componentes de la orina, como las mucoproteínas. Y, además, protege a los microorganismos de los antibióticos y de una respuesta inmune. De esta forma, los microorganismos continúan su desarrollo, actividad ureasa y deposición de cristales. Con ello, la microcolonia aumenta en cantidad de compuestos cristalinos incrustados así como en incorporación de mucoproteínas de la matriz formadora del cálculo. Estos mismos autores (170-172), trabajando con *Proteus mirabilis*, afirmaron que el hábito cristalino de la estruvita depende de la presencia o de la ausencia de la bacteria. Además, estos autores desarrollaron una técnica que permitió realizar observaciones directas, utilizando el microscopio, para controlar el crecimiento de los cristales de estruvita cuando hay algún cambio en la composición química de la orina. Luego, estudiaron la formación de estruvita por *P. mirabilis* en medios de orina sintética, y mostraron que la

adición a la orina artificial de glucosaminoglucano, sulfato de condroitina A, o sulfato de heparina no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de los cristales o su aparición. Sin embargo, cuando el citrato sódico está presente en concentraciones altas, observaron una disminución en la aparición de los cristales, así como un cambio en la morfología. Además, observaron que ninguno de estos compuestos añadidos tiene efecto sobre la viabilidad de la bacteria, pH o actividad ureásica. Estos autores explicaron, por lo tanto, que la actividad inhibidora puesta de manifiesto por el citrato sódico puede estar relacionada con su habilidad de fijar el magnesio o de su interferencia con la estructura cristalina durante la formación de la estruvita.

Un año después, McLean *et al.* (173), propusieron que el pirofosfato inhibe el crecimiento de la estruvita por su interferencia directa con el mecanismo químico implicado en la nucleación y el crecimiento de los cristales.

## BIOMINERALIZACIÓN Y MATERIALES BIOMIMÉTICOS

El estudio de la biomineralización ofrece valiosos conocimientos acerca de la asociación que existe entre la matriz orgánica y la fase inorgánica. Esta asociación, como se ha descrito anteriormente, da lugar a la formación de biominerales de tamaños, orientaciones y texturas bien controladas. Para muchos científicos estos minerales biogénicos representan una fuente de inspiración para la síntesis de nuevos materiales. De hecho, el estudio de los procesos moleculares que dan lugar a la construcción de estructuras altamente ordenadas, ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias, para mejor controlar la síntesis de compuestos inorgánicos bien organizados. Estas nuevas estrategias están ayudando de una parte, a comprender ciertos aspectos oscuros de los procesos de biomineralización, así como, el papel que desempeña la matriz orgánica en ellos. Y, de otra parte, están dando lugar a la síntesis de compuestos a los que se conoce con el nombre genérico de minerales biomiméticos. Estos nuevos materiales podrán diseñarse con múltiples e interesantes aplicaciones (174).

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) LOWENSTAN, H. A., WEINER, S.: *In Biomineralization* (1989), pp. 324, Oxford University Press, New York.
- (2) SCHMIDT, W. J.: *Die Bausteine des Tierkörpers in Polarisiertem Lichte* (1924), F. Cohen Verlag, Bonn.
- (3) CLARKE, F. W., WHEELER, W. C.: *US. Geol. Surv. Prof. Pap* (1922), 124.
- (4) BOGGILD, O. B.: *K Dan Vidensk Selsk Skr Naturvidensk Math Afd* (1930), 9: 233-326.