

# TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

---

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

## MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS PARA EL ESTUDIO DE LA FORMACION DE CRISTALES POR LOS MICROORGANISMOS

por

A. RAMOS-CORMENZANA, M.<sup>a</sup> CARMEN PEREZ-MIRANDA y E. BOQUET \*

### RESUMEN

En el presente trabajo se ensayan dieciséis medios de cultivo para determinar la formación de cristales. Se describe por primera vez el que la "stroncianita", pueda ser originada biológicamente.

Entre los medios descritos hasta el momento para la formación de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  se considera como más idóneo un medio sencillo (BRC) a base de extracto de levadura y cloruro cálcico.

### RESUME

Dans le présent travail on essayent seize milieux de culture pour déterminer la formation de cristaux. On décrit pour la première fois, qui la "stroncianite" elle peut être motivée biologiquement.

Entre les milieux décrits encore le moment pour la formation de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  on considère comme le plus apte, un milieu (BRC) composé pour Extrait de levure et chlorure de calcium.

### SUMMARY

Sixteen culture media were used to determine crystal formation. Among the culture media used to study calcium carbonate formation, it was concluded that a medium (BRC) with yeast extract and calcium chloride was better and with satisfactory results.

It was first time reported that "stroncianite" could be formed biologically.

\* Cátedra de Microbiología. Facultad de Farmacia. Univ. de Barcelona.

## INTRODUCCION

La existencia de microorganismos capaces de formar cristales en su ambiente ecológico, es un hecho conocido; en alguno de cuyos procesos pueden llegar a originarse grandes acumulaciones en la naturaleza como las de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  descritas en la Gran Bahama (1).

Recientemente se ha incrementado el estudio de la formación de cristales de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  por los microorganismos (2,3). La formación de cristales en los medios de cultivo sólidos ha demostrado ser una buena técnica de estudio (2). En el presente trabajo se pretende estudiar comparativamente alguno de los medios hasta el momento elaborados, y otros no descritos en la bibliografía científica, con la finalidad de poder determinar la influencia de determinados nutrientes en la formación de cristales y seleccionar aquellos medios que puedan servir en posteriores investigaciones.

## MATERIAL Y METODOS

### a) Medios de cultivo

Los medios utilizados se encuentran detallados en la tabla I, a todos ellos se les adicionaba agar purificado al 1.6%.

Cuando el medio de cultivo llevaba glucosa esta se esterilizaba por separado. El pH final antes de la esterilización, se ajustaba a 8.0; aunque se ensayaron algunos medios a pH 7.0, y 6.0.

### b) Microorganismos:

Como cepas bases para una investigación elemental de rutina se utilizaron el *Micrococcus luteus* y el *Serratia marcescens* microorganismos fácilmente formadores de cristales.

Para estudios numéricos se ensayaron diferentes especies bacterianas aisladas del suelo, y otras correspondientes a la colección de cultivos existentes en nuestro laboratorio.

### c) Obtención de cristales:

La separación y purificación de cristales se practicó en la forma descrita en anteriores trabajos (2,4).

## RESULTADOS

En las tablas II y III van indicados los resultados obtenidos respecto a la formación de cristales. En la tabla II se exponen los cristales que han sido determinados por difracción de rayos X y la

Tabla I.- Composición de los distintos medios de cultivo ensayados ( cantidades expresadas en g/ml).

Ingredientes	B <sub>1</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>7</sub>	B <sub>8</sub>	B <sub>12</sub>	B <sub>15</sub>	B <sub>16</sub>	B <sub>17</sub>	B <sub>18</sub>	B <sub>19</sub>	B <sub>20</sub>	BR5	BRC	BR1
Glucosa	6.0				1.0	10.0	5.0									
Extracto levadura	2.0	4.0	4.0	4.0		4.0		4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	1.0	4.0	4.0
Glicrofofato Ca	4.0				1.0		10.0									
Acetato de Na		2.5						2.5			2.5	2.5				
Acetato Ca			2.5	2.5		2.0							1.45			2.0
Acetato Mg										2.4			1.3			
NO <sub>3</sub> K			0.5		0.5			0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5			
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub>							2.0									
Cl <sub>2</sub> Ca. 1/2 H <sub>2</sub> O					0.1			1.8	1.8					1.8	1.8	
Citrato Na							2.0									
Lactato Na							2.0									
SO <sub>4</sub> Mg					0.2											
Cl <sub>2</sub> Sr												2.0				
Cl <sub>3</sub> Fe					0.01											
Cl <sub>2</sub> Ba								1.9								
Cl Na					0.1											



TABLA II.—CRISTALES ENCONTRADOS EN LOS DIFERENTES MEDIOS ENSAYADOS POR DIFRACCION DE RAYOS X

MEDIO	TIPO DE CRISTALES
B - 1	Tartrato cálcico hidratado
B - 4	Carbonato cálcico (tipo calcita)
B - 8	Carbonato cálcico (tipo calcita)
B - 18	Sulfato de bario
B - 19	Carbonato de estroncio (tipo extroncionito)
BRC	Carbonato Cálcico (tipo calcita)
BR5	Carbonato Cálcico (tipo calcita)

TABLA III.—COMPARACION DE LA FORMACION DE CRISTALES EN B-4 Y BRC A DISTINTOS TIPOS DE INCUBACION

Núm. de microorganismos que forman cristales (de 75 ensayados) a las:								
Medio	24 h.	2 días	3 días	4 días	5 días	7 días	10 días	21 días
B - 4	34	42	48	48	50	52	55	59
BRC	52	54	56	57	57	57	58	64

tabla III se corresponde con un estudio comparativo de la formación de cristales de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  en dos de los medios descritos hasta el momento en la bibliografía el B-4 (3) y el BRC (4).

## DISCUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos con *M. luteus* y *S. marcescens* en los medios B-3 y B-5 puede deducirse que la presencia de  $\text{NO}_3\text{K}$  que era utilizada en los trabajos de Mc Callum y Guhathakurta (1) no es imprescindible para la formación de cristales. A diferencia de los resultados obtenidos anteriormente por Boquet (2) nosotros también obtuvimos cristales en medios a pH ácido.

La mayor parte de los medios ensayados iban dirigidos a la búsqueda de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , por estar mejor descrito en la bibliografía científica y ser relativamente fácil su formación; sin embargo al modificar los componentes metálicos del medio de cultivo se han obtenido datos dignos de señalar como la formación de carbonato de estroncio en el medio de cultivo B<sub>19</sub>, lo que sugiere, dentro del campo especulativo que una adecuada modificación de los consti-

tuyentes del medio de cultivo podría dar lugar a la formación microbiana de otros minerales, cuyo origen biológico aún ni ha sido considerado.

Como se observa en las figuras 1, 2 y 3 la formación de cristales puede ser perfectamente detectada por métodos de observación macroscópica; aunque para efectuar una lectura rápida se deba acudir a la observación microscópica (figuras 4, 5, 6 y 7).

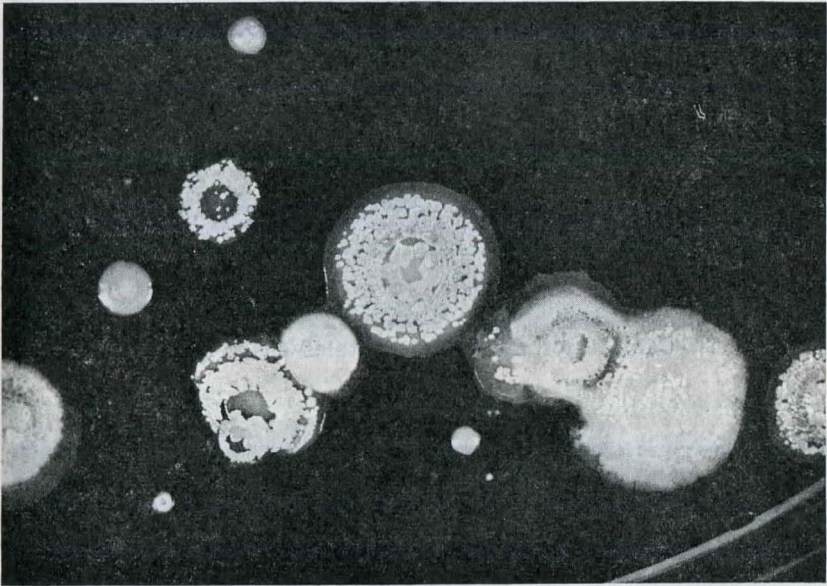


Fig. 1 Aislamiento de bacterias formadoras de cristales en el medio B-4.

En apariencia los cristales obtenidos al modificar parcialmente la composición del medio de cultivo son distintos como fácilmente puede apreciarse de la observación de las figuras 4, 5 y 6; sin embargo al efectuar la determinación por difratometría de rayos X se aprecia que se corresponden con  $\text{CO}_3\text{Ca}$ . En algunos casos esta formación de cristales es intensa (fig. 6) y en otros son menos numerosas, quedando como superficies cristalinas sobre la colonia (fig. 5).

Como hecho verdaderamente curioso puede destacarse el que se obtuvieran cristales de sulfato de bario, en un medio en el que esperábamos obtener cristales del tipo de los carbonatos.



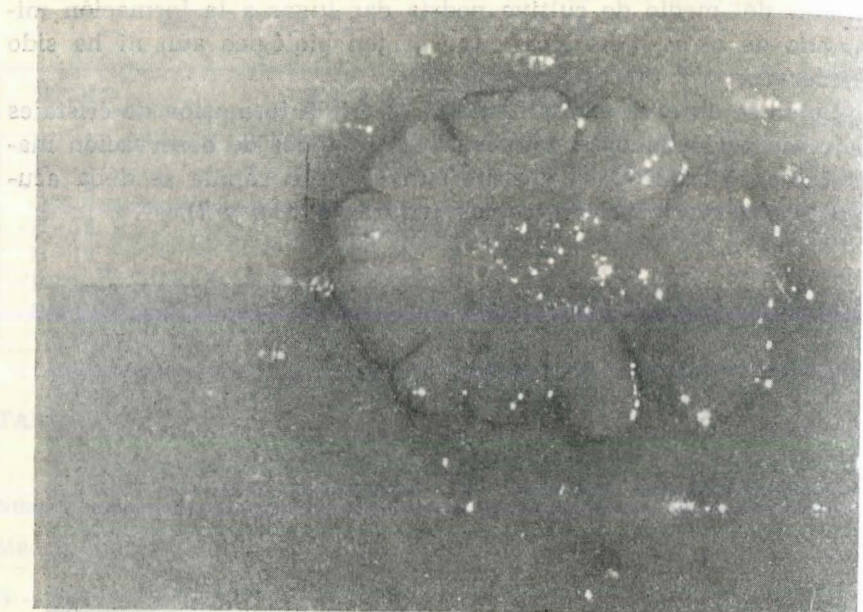


Fig. 2 Colonia formadora de cristales en el medio B-1.

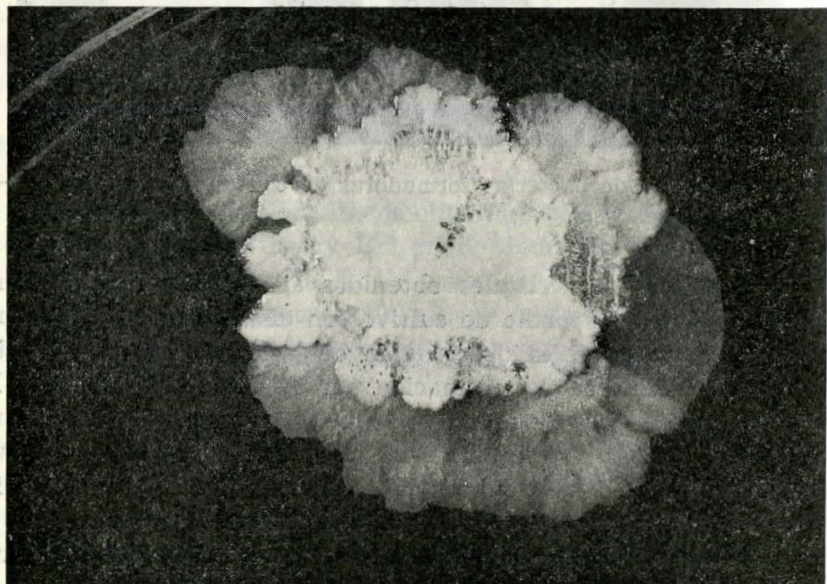


Fig. 3 Colonia formadora de cristales sobre el medio de cultivo B-4.

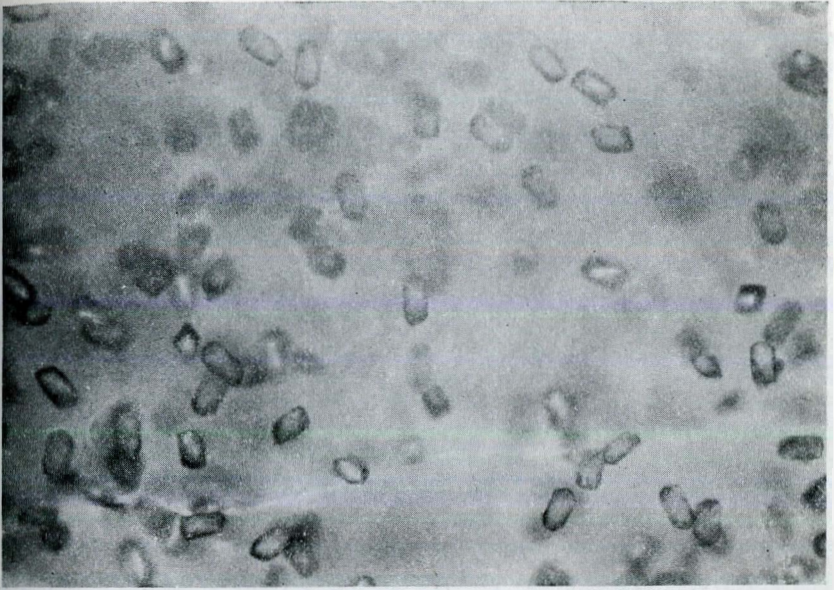


Fig. 4 Observación de cristales microscópicamente en B-4.

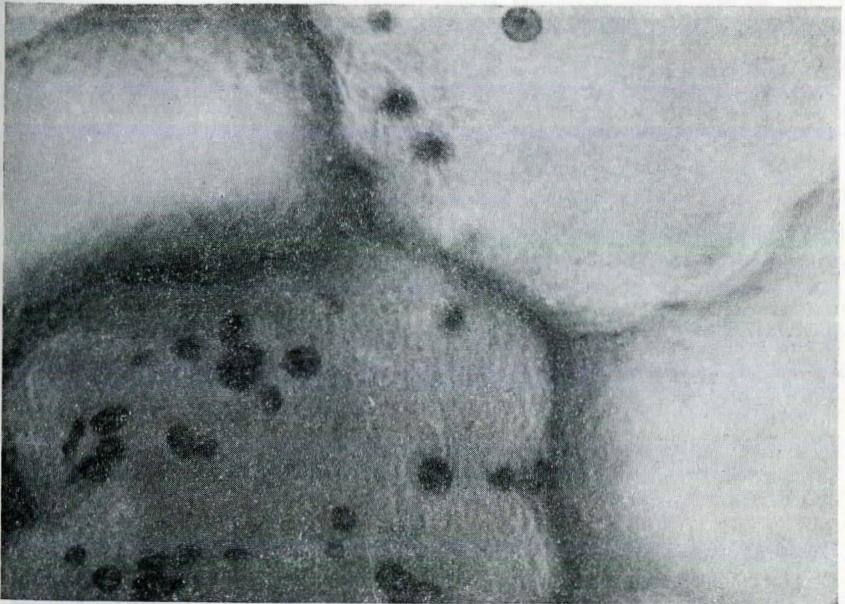


Fig. 5 Observación de cristales microscópicamente en BRC (escasos).



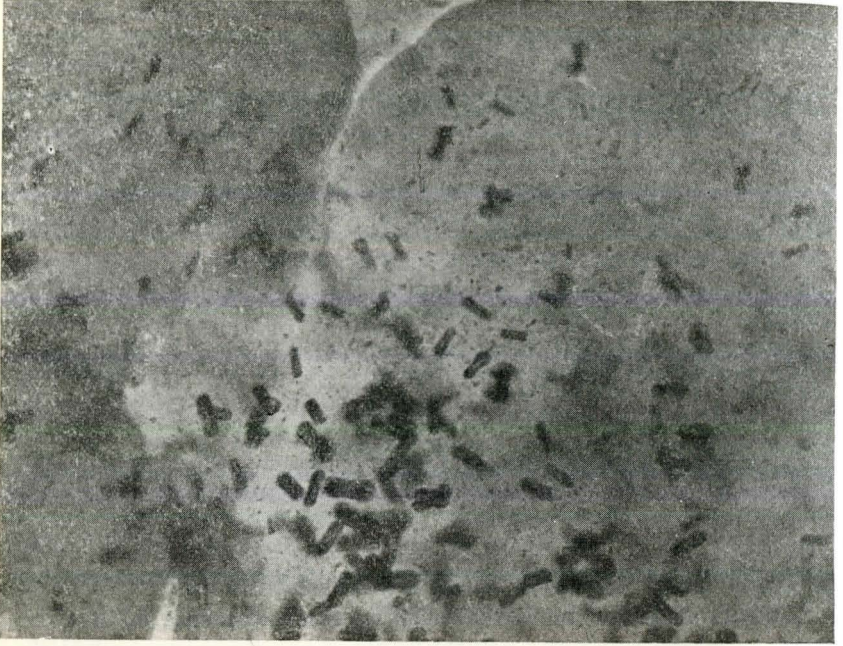


Fig. 6 Observación de cristales microscópicamente en BRC (numerosas).

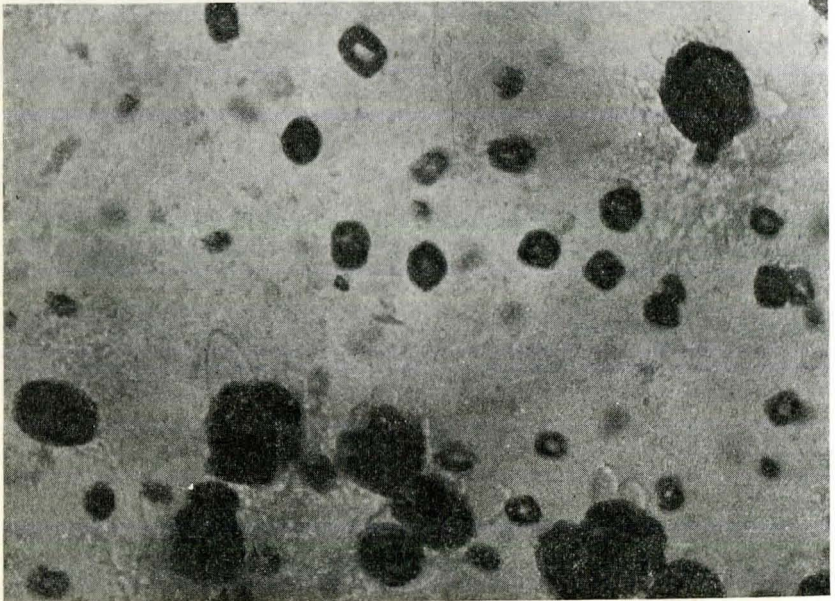


Fig. 7 Detalle de los cristales formados intracolonialmente en BRC.



## BIBLIOGRAFIA

1. Mc CALLUM, M. F. and GUHATHAKURTA, K.—The precipitation of calcium carbonate from sea water by bacteria isolated from Bahama Bank-sediments. *J. Appl. Bact.* 33, 649 (1970).
2. BOQUET, E.—La formación de cristales por las bacterias en medios sólidos. Tesis doctoral. Univ. Barcelona (1973).
3. BOQUET, E., BORONAT, A., and RAMOS-CORMENZANA, A.—Production of calcite (Calcium Carbonate) crystals by soil Bacteria is a General Phenomenon. *Nature* 246, 527 (1973).
4. RAMOS-CORMENZANA, A.—Formation of Calcite crystals by Bacteria of the genus *Bacillus*. *Microbios* (pendiente de publicación, 1975).