

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, FACULTAD DE FARMACIA,
UNIVERSIDAD DE GRANADA, GRANADA

INFLUENCIA DEL pH EN LA FORMACION DE CRISTALES DE CARBONATO CALCICO POR BACTERIAS DEL SUELO

RIVADENEYRA, M. A.; PÉREZ-GARCÍA, I.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ DEL
ALAMO, M.; RAMOS-CORMEZANA, A.

RESUMEN

Se estudia la influencia del pH en la precipitación de carbonato cálcico por 96 cepas bacterianas aisladas del suelo.

Se obtienen cristales en medios con pH iniciales comprendidos entre 5,5 y 9. No es necesaria la alcalinización previa de los medios, ya que el pH óptimo para la precipitación puede alcanzarse durante el desarrollo bacteriano.

SUMMARY

The effect of pH on the calcium carbonate precipitation (crystal formations) was studied with 96 strains isolated from the soil. Crystal formations in culture media were detected with initial pH between 5.5 to 9. These data show that the optimum pH to crystal formations may be well established during bacterial growth, and that is not necessary the previous alkalization of the culture media to calcium carbonate precipitation.

RESUME

Nous avons étudié l'influence du pH dans la précipitation de carbonate de calcium, par 96 souches bactériennes isolées du sol.

Les cristaux de CaCO_3 apparaissent lorsque le pH était entre 5,5 et 9. L'alcalinization du milieu n'est pas nécessaire, puisque le pH optimal peut être atteint au cours de la croissance bactérienne.

INTRODUCCION

La formación de carbonato cálcico por acción bacteriana ha sido objeto de numerosos estudios, tanto en lo que se refiere al mecanismo de precipitación (6) (1) (4), como a los diferentes tipos microbianos implicados (5) (7) (12) (10).

Boquet y col. (3) llegan a la conclusión de que la precipitación bacteriana de carbonato de calcio es un fenómeno general, bajo condiciones favorables.

Sin embargo, algunos aspectos de la precipitación bacteriana de carbonato cálcico no están suficientemente aclarados. Así, por ejemplo, la influencia del pH ha sido objeto de controversia, ya que mientras Oppenheimer (9) y Boquet (2) consideran imprescindible un pH alcalino, Mc Callum y Guhathakurta (7) y Ramos-Cormenzana (11) obtienen cristales a pH ácido, por lo que nuestro trabajo va encaminado a aclarar esta disparidad de criterios.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos: Se estudiaron 96 cepas bacterianas aisladas del suelo y que presentan la característica común de precipitar carbonato cálcico en un medio adecuado.

Medios: Se utilizó el medio B-4 (11). El pH se ajustó antes de la esterilización a 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5, y 9 con NaOH 0.1N o con ClH 0.1N.

Técnica de estudio: Las placas previamente inoculadas se llevaron a incubar a estufa a 27° C. Las lecturas se realizaron con ayuda de microscopio óptico a partir de las cuarenta y ocho horas de incubación y hasta los treinta días después de la siembra. En todas las experiencias se usaron placas control, no inoculadas e inoculadas con células bacterianas autoclavadas.

Aislamiento, purificación e identificación de los cristales: Los cristales producidos por todos los microorganismos se trataron en primer lugar con ácido clorhídrico diluido para observar el desprendimiento o no de burbujas de gas (CO₂) al ponerlos en contacto con el mismo.

Posteriormente se seleccionaron dos cepas y se sembraron a los diferentes pH con objeto de obtener cristales en cantidad suficiente para su recuperación y posterior identificación.

La recuperación de los cristales se hizo según el método descrito por Ramos-Cormenzana (10) y la identificación definitiva por difracción de rayos X, para lo que se utilizó un equipo Philips PW 1010 y PW 1050, equipado con contador de centelleo PW 1964/20 y proporcional PW 1965/10.

RESULTADOS

En la tabla 1 se expresan los resultados correspondientes a la formación de cristales, indicando el número de cepas que inician su producción en el tiempo señalado y los diferentes pH.

El tamaño y morfología de los cristales formados es similar en todos los pH investigados.

En ningún caso se observó producción de cristales en las placas control.

El tratamiento de los cristales con ácido clorhídrico diluido dió en todos los casos desprendimiento de gas, lo que nos orienta sobre la presencia de carbonatos.

La identificación de los cristales por difracción de rayos X ha sido de calcita para todas las muestras ensayadas.

TABLA I
INICIO DE LA FORMACION DE CRISTALES EN LOS DIFERENTES pH

días	<i>N.º de cepas + a los diferentes pH</i>							
	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9
2	—	—	1	14	31	37	39	42
3	—	—	1	15	25	30	38	43
5	4	12	29	46	33	24	17	9
10	36	47	47	18	5	4	1	1
15	11	18	13	3	2	1	1	1
20	18	8	5	—	—	—	—	—
25	9	—	—	—	—	—	—	—
30	—	—	—	—	—	—	—	—

DISCUSION

Como se puede observar en la tabla 1, se han producido cristales a todos los pH investigados. Las cepas no productoras a pH 5.5 (19 %) y a pH 6 (12 %) no presentan capacidad de desarrollo a estos pH, a excepción de una cepa, capaz de crecer a pH 5.5, aunque sin formación de cristales.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mc Callum y Guhathakurta (7) y Ramos-Cormenzana y col. (11) y por el contrario difieren de los obtenidos por Boquet (2) que no obtuvo cristales cuando el pH inicial del medio de cultivo era ácido.

A los pH 8.5 y 9, aunque el desarrollo bacteriano no era muy abundante, en las placas aparecían gran cantidad de cristales en cuanto se iniciaba el crecimiento.

Estos resultados están en concordancia con las observaciones de Morita (8) que, estudiando la precipitación de calcita por bacterias marinas, encuentra una rápida elevación del pH del medio de cultivo (debido a la formación de amonio y trimetilamina) hasta un pH próximo a 9, pH que se mantiene posteriormente y que considera un factor imprescindible en la precipitación del CO_3Ca .

Sin embargo difieren de los resultados obtenidos por Boquet (2), que observó una sensible disminución en la formación de cristales a partir de un pH 8.2.

Los resultados encontrados nos inducen a pensar que no es necesaria la alcalinización previa del medio de cultivo (siempre que trabajemos con medios no tamponados), ya que las bacterias en su crecimiento pueden elevar el pH del medio y conseguir de esta manera un pH óptimo para que tenga lugar la precipitación del CO_3Ca .

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BLACK, M. (1933): *The Geol. Mag.* 70, 455-466.
- 2.—BOQUET, E. (1973): Tesis Doctorales. Universidad de Barcelona.
- 3.—BOQUET, E.; BORONAT, A., and RAMOS-CORMENZANA, A. (1973): *Nature*, 246, 527-529.
- 4.—DEELMAN, J. C. (1975): *Naturwiss.* 62, 484-485.
- 5.—GREENFIELD, L. J. (1963): *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 109, 23-45.
- 6.—KELLERMAN, K. F. and SMITH, N. R. (1914): *J. Wash. Acad. Sci.* 4, 400-402.
- 7.—MCCALLUM, M. F. and GUHATHAKURTA, K. (1970): *J. Appl. Bact.* 33, 649-655.
- 8.—MORITA, R. Y. (1980): *Geomicrobiol. J.* 2, 63-82.
- 9.—OPPENHEIMER, C. H. (1961): *Geochim. et Cosmochim. Acta* 23, 295-299.
- 10.—RAMOS-CORMENZANA, A. (1975): *Microbios* 13, 61-70.
- 11.—RAMOS-CORMENZANA, A.; PÉREZ-MIRANDA, M. C., y BOQUET, E. (1975): *Ars. Pharm.*, 3, 335-343.
- 12.—SHINANO, H. (1972): *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 39, 85-90.