

## DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

# “PRECIPITACION DE CALCITA Y ESTRUVITA POR BACTERIAS AISLADAS DE LAS AGUAS DEL PANTANO DEL CUBILLAS”

Ferron Vilches, M.C.; Rivadeneyra, M.A.; Pérez-García, I.; Ramos-Cormenzana, A.

### RESUMEN

Se estudia la formación de cristales de calcita y estruvita por 71 cepas bacterianas aisladas de las aguas del Pantano del Cubillas.

Todas las cepas aisladas son capaces de precipitar carbonato de calcio, no ocurriendo igual en el caso de la estruvita, cuya formación varía desde un 94,3 por ciento hasta un 77,5 por ciento dependiendo del medio de cultivo utilizado.

No se observa ninguna relación entre la situación taxonómica de las cepas ensayadas y la capacidad de las mismas para formar cristales de calcita y estruvita.

### RESUME

Nous avons étudié la formation de cristaux de calcite et d'estruvite par 71 souches bactériennes isolées de l'eau du "Pantano del Cubillas".

Toutes les souches essayées ont été capables de précipiter le carbonate de calcium. Par contre, en ce qui concerne l'estruvite le pourcentage de souches donnant des cristaux oscille entre 94,3 par cent et 77,5 par cent, selon le milieu de culture employé.

Nous n'avons pas trouvé une corrélation entre la situation taxonomique des souches et leur capacité de formation de cristaux de calcite et d'estruvite.

### SUMMARY

There is a study being carried out on the formation of calcite and struvite crystals by 71 bacterial strains isolated from the Cubillas swamp waters.

All the isolated strains are capable of precipitating carbonate calcium, the same result not occurring in the case of the struvite whose formation varies from 94,3 % to 77,5 % depending on the cultivated method being used.

There has been no relation observed between the taxonomic situation of the tested strains and their capacity to form calcite and struvite crystals.

## INTRODUCCION

La precipitación bacteriana de carbonato cálcico, ha sido estudiada por numerosos autores tanto en su medio ecológico (4), (8), como en medios de cultivo de laboratorio líquidos (9), (10) y sólidos (12), (1). La gran mayoría de estos estudios se ha realizado sobre bacterias marinas o bacterias del suelo y en muy pocas ocasiones se ha trabajado con bacterias de agua dulce.

Por otra parte, y aunque la formación de carbonato cálcico ha sido la más profusamente investigada, también se ha descrito la implicación bacteriana en la precipitación de otros compuestos cristalinos. Ya en 1889, Robinson (17) opinaba que los microorganismos pueden formar estruvita ( $\text{PO}_4\text{MgNH}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ), posteriormente algunos autores encuentran producción de estruvita por parte de diferentes cepas bacterianas (2), (18), (16). A pesar de estos trabajos, no se conocen bien las condiciones de formación, factores que pueden influir en la misma, tipos microbianos implicados en ella etc.

Todo esto hizo que consideráramos de interés el estudiar la formación de carbonato cálcico y de estruvita por bacterias aisladas de agua dulce, y al mismo tiempo tratar de establecer una relación, si la hubiera, entre capacidad de formación de calcita y estruvita.

## MATERIAL Y METODOS

### *Microorganismos*

Se ensayaron 71 cepas bacterianas aisladas de las aguas del Pantano del Cubillas.

Todos los microorganismos estudiados presentaban la capacidad de formar cristales de carbonato cálcico (observables a simple vista), antes de los 2 días de incubación en un medio adecuado.

La clasificación orientativa de las cepas se hizo de acuerdo con los criterios de Cowan y Steel (7), y Ramos Cormenzana (13).

### *Medios de Cultivo*

Para el aislamiento y selección de las cepas, así como para el estudio de la precipitación de carbonato cálcico, se utilizó el medio B-5 (5).

En el estudio de estruvita, se emplearon los medios: B-17 (5), B-41 (Composición en g/l: Extracto de levadura 4; fosfato bipotásico 2; sulfato magnésico 2; agar 16), y B-42 (Composición en g/l: Extracto de levadura 4; fosfato bipotásico 2; sulfato magnésico 4; agar 16).

### *Técnica de estudio*

El aislamiento de las cepas se realizó directamente en el medio B-5.

Para el estudio de formación de cristales, se sembraron las bacterias masivamente en placas que contenían los distintos medios de cultivo, utilizando 3 placas por microorganismo, y repitiendo 3 veces cada experiencia.

Una vez inoculadas, las placas se llevaron a incubar en estufa a 25°C, realizándose lecturas (con ayuda de microscopio óptico) a partir del segundo día de la siembra, y hasta los 30 días.

En todas las experiencias se utilizaron controles estériles no inoculados e inoculados con células bacterianas muertas por calor.

### *Aislamiento, purificación e identificación de los cristales*

La separación y purificación de los cristales se hizo de acuerdo con las técnicas descritas por Ramos Cormenzana (11) y Ramos Cormenzana y col. (14).

En cuanto a la identificación, se efectuó por difracción de rayos X, para lo que se utilizó un aparato Philips PW 1010 y PW 1050, equipado con contador de centelleo PW 1964/20 y proporcional PW 1965/10. Como fuente de rayos X se utilizó un tubo de difracción PW 2253/00 con ánodo de cobre y filtro de níquel, para el registro se empleó el difractómetro.

La preparación de la muestra se limitó a molienda en mortero de ágata.

Los diagramas fueron interpretados siguiendo los criterios de J.C.P. D.S. (3).

## RESULTADOS

Los resultados correspondientes a la identificación taxonómica de las cepas ensayadas, vienen especificados en la tabla I.

En la tabla 2, se exponen los resultados correspondientes a la formación de estruvita, indicando el número de cepas formadoras en los diferentes medios de cultivo empleados y a los distintos tiempos de lectura. Los resultados de formación de calcita, no van expresados en

TABLA 1: Situación taxonómica de las cepas seleccionadas.

| Situación taxonómica | Número de cepas |
|----------------------|-----------------|
| ACINETOBACTER        | 9               |
| AEROCOCCUS           | 2               |
| AEROMONAS            | 1               |
| ALCALIGENES          | 17              |
| BACILLUS             | 5               |
| CORYNEBACTERIUM      | 6               |
| ENTEROBACTERIA       | 17              |
| KURTHIA              | 1               |
| MICROCOCCUS          | 4               |
| MURRAYA              | 3               |
| PLANOCOCCUS          | 1               |
| PLESIOMONAS          | 2               |
| PSEUDOMONAS          | 3               |

TABLA 2: Número de cepas formadoras de estruvita en los medios ensayados a distintos tiempos de lectura.

| Medios | Tiempo en días |    |    |    |    |    |
|--------|----------------|----|----|----|----|----|
|        | 2              | 7  | 15 | 21 | 30 | N  |
| B-17   | 17             | 44 | 54 | 54 | 55 | 16 |
| B-41   | 16             | 53 | 64 | 65 | 67 | 4  |
| B-42   | 40             | 52 | 63 | 63 | 63 | 8  |

Nota: N representa el número de cepas negativas a los 30 días de incubación.

la tabla puesto que todas las cepas estudiadas, eran formadoras de dicho mineral en un tiempo máximo de 2 días.

La identificación de los cristales por difracción de rayos X, dio como resultado calcita, para todos los producidos en el medio B-5, y estruvita para los obtenidos en los medios B-17, B-41 y B-42.

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

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Aunque se seleccionaron solamente 71 cepas, en función de su óptima capacidad para precipitar carbonato cálcico, todas las bacterias aisladas presentaban igualmente dicha capacidad, si bien más tardíamente y con un menor número de cristales; todo esto hace que coincidamos con Boquet y col. (6), en el sentido de afirmar que la precipitación bacteriana de carbonato cálcico es un fenómeno general, es decir que bajo condiciones adecuadas todas las bacterias pueden formar cristales de carbonato cálcico. Este hecho fue también comprobado por Rivadeneyra Ruiz (15).

El haber empleado 3 medios de cultivo distintos para el estudio de la formación de estruvita se debe, fundamentalmente, a que no existe hasta hoy, un medio en el que la precipitación de estruvita sea plenamente satisfactoria a diferencia de lo que ocurre con los medios descritos para formación de carbonato de calcio.

Como puede observarse en la tabla 2, 55 cepas han resultado positivas en el medio B-17, 67 en el medio B-41 y 63 en el B-42, sin embargo, nos parece oportuno señalar que solamente 13 cepas (medio B-17), 37 (medio B-41) y 33 (medio B-42), han presentado una buena formación de estruvita considerándola desde el punto de vista de cantidad de cristales producidos y repetición de los resultados, el resto de las cepas dadas como positivas, producen generalmente cristales en poca cantidad y no en todas las experiencias.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Rivadeneyra Ruiz (15) quien trabajando con bacterias aisladas del suelo también encontró un tanto por ciento bajo de buenas formadoras de estruvita.

Podemos apreciar igualmente en la tabla 2, que los mejores resultados, en cuanto a formación de cristales, se obtienen en los medios

B-41 y B-42, teniendo en cuenta que las innovaciones de estos dos medios de cultivo respecto al B-17 son por una parte la adición de fosfato al medio, y por otra el cambio de la fuente de magnesio, pensamos que dichos cambios favorecen la producción de cristales de estruvita.

Por otra parte, el hecho de que los resultados obtenidos en el medio B-41, donde la relación fosfato/magnesio es 1/1, sean mejores que los del medio B-42 (fosfato/magnesio = 1/2), parece indicar una influencia de dicha relación en la formación de cristales de estruvita, asimismo, parece que el aumento de la concentración de magnesio respecto a la de fosfato no favorece la producción bacteriana de estruvita.

En lo que se refiere a cantidad de cristales formados, ha sido muy similar en los medios B-41 y B-42, no pudiéndose hacer una comparación numérica entre estos dos medios y el B-17, ya que la morfología de los cristales, ha resultado ser distinta (fotografías 1 y 2) en este último medio de cultivo.

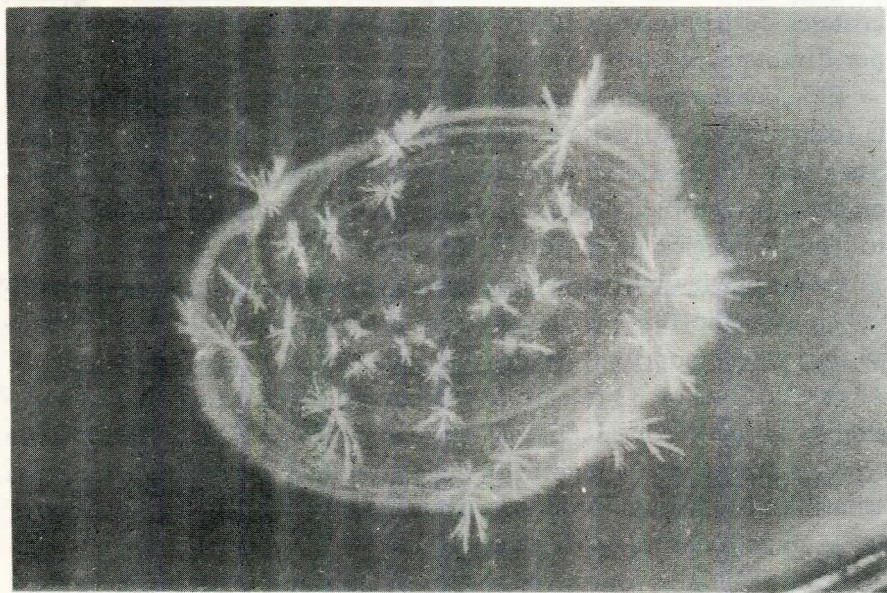


Fig. 1.- Cristales de estruvita producidos por una cepa de *Pseudomonas sp.* en el medio B-17 a los 2 días de incubación. La fotografía se ha realizado con un aumento de 5x.

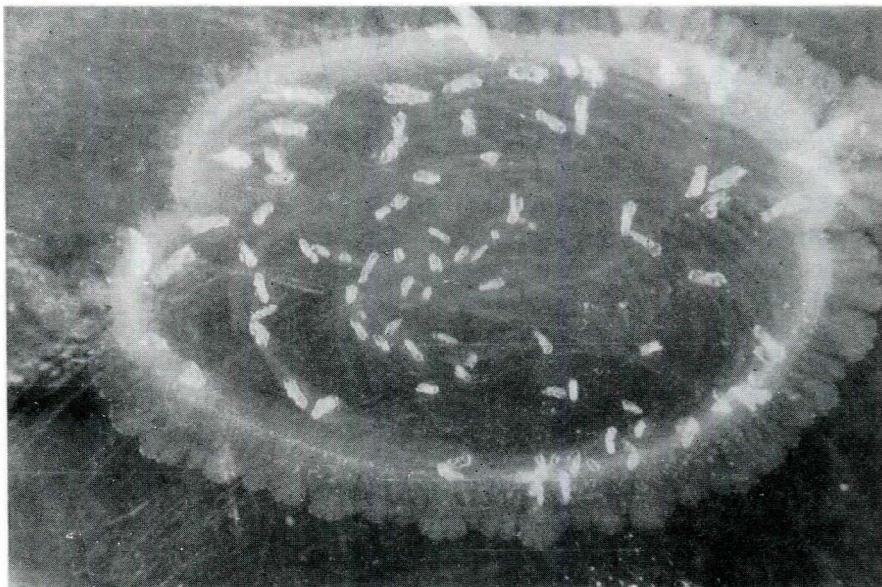


Fig. 2.- Cristales de estruvita producidos por la misma cepa de *Pseudomonas sp.* en el medio B-41 a los 2 días de incubación. Fotografía realizada con un aumento de 5x.

Considerando que los cristales formados en el medio B-17, son ramificados y de menor grosor que los obtenidos en los otros dos medios de cultivo, y teniendo en cuenta además que los diagramas de difracción de rayos X nos han confirmado una peor cristalinidad en el caso de los producidos en el medio B-17, opinamos que estas diferencias morfológicas, podrían deberse a la mayor disponibilidad del ión fosfato en los medios B-41 y B-42 en los que se encuentra incorporado en forma de fosfato soluble, mientras que en el medio B-17, no se ha incorporado este fosfato como tal.

No hemos encontrado ninguna relación entre situación taxonómica de las cepas seleccionadas y capacidad de las mismas para precipitar calcita y estruvita, ahora bien, puesto que en el presente trabajo solo se ha hecho una aproximación taxonómica a nivel de género y en el caso de las Enterobacterias a nivel de familia, no podemos asegurar que esta relación no exista a nivel de especie bacteriana.

## BIBLIOGRAFIA

1. AGUILAR, J.; RAMOS CORMENZANA, A. and RUIZ-BERRAQUERO, F. (1978). Contribution to the study of crystals formation process by bacteria. Proceeding of the fifth International Working Meeting on soil, Micromorphology. Granada. 1, 139.
2. BEAVON, J. and HEATLEY, N.G. (1962). *J. Gen. Microbiol.* 31, 167-169.
3. BERRY, L.G. (1974). Selected powder diffraction data for minerals, data book. Pub. Joint. Committe on powder diffraction standars. Philadelphia.
4. BLACK, M. (1933). *The Geol. Mag.* 70, 455-466.
5. BOQUET, E. (1973). Tesis Doctorales. Universidad de Barcelona.
6. BOQUET, E.; BORONAT, A. and RAMOS CORMENZANA, A. (1973). *Nature*, 246, 527-529.
7. COWAN, S.T. and STEEL, K.J. (1974). Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press.
8. DOETSCH, R.N. and COOK, T.M. (1973). Introduction to bacteria and their ecobiology. Medical and Tecnical Publishing Co. Ltd. Lancaster.
9. GREENFIELD, L.J. (1963). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 109, 23-45.
10. MC. CALLUM, M.F. and GUHATHAKURTA, K. (1970). *J. Appl. bact.* 33, 649-655.
11. RAMOS CORMENZANA, A. (1975). *Microbios*, 13, 61-70.
12. RAMOS-CORMENZANA, A.; PEREZ-MIRANDA, M.C. y BOQUET, E. (1975). *Ars Pharm.*, 3, 335-343.
13. RAMOS CORMENZANA, A. (1979). Taxonomía bacteriana. Universidad de Granada.
14. RAMOS CORMENZANA, A.; RIVADENEYRA RUIZ, M.A. et GARCIA CERVIGON, A. (1980). Influence de la relation Mg/Ca dans la formation de carbonates par des bactéries. Cristallisation, Deformation, Dissolution des Carbonates. Bordeaux, 381-388.
15. RIVADENEYRA RUIZ, M.A. (1981). Tesis Doctorales. Universidad de Granada.
16. RIVADENEYRA RUIZ, M.A.; RAMOS CORMENZANA, A. and GARCIA CERVIGON, A. (1983). *Geomicrobiol. J.*, 3, 151 - 163.
17. ROBINSON, H. (1889). *Proc. Camb. phil. Soc.* 6, 360. En BEAVON, J. and HEATLEY, N.G. (1962). *J. Gen. Microbiol.* 31, 167-169.
18. SHINANO, H. and SAKAI, M. (1975). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 41, 913.