

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

## «ESTUDIO DE LA FORMACION DE CRISTALES POR BACTERIAS EN MEDIOS TAMPONADOS»

RIVADENEYRA, M. A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ DEL ALAMO, M.;  
PEREZ-GARCIA, I.; RAMOS-CORMENZANA, A.

### RESUMEN

Se investiga la precipitación bacteriana de carbonato cálcico en el medio B-4 tamponado con tres sistemas bufer diferentes a los pH 7 y 8, por 96 cepas bacterianas aisladas del suelo.

A pH 8 se observa precipitación de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  en todas las cepas ensayadas, mientras que el pH 7 solo ocurre excepcionalmente.

Los tampones tris-hidroximetil amino metano-HCl y clorhidrato de trietanol amina-OHNa se revelaron idóneos para estas experiencias, mientras que el tampón 5:5 dietil barbiturato sódico-HCl no resultó apropiado.

### SUMMARY

Calcium carbonate precipitation by, 96 strains isolated from soil, was studied in B-4 buffered medium using three different systems at pH 7 and 8.

$\text{CaCO}_3$  precipitation at pH 8 is observed in all the strains investigated, whereas it occurs only exceptionally at pH 7.

The tris-hydroxymethyl amino methane-ClH and hydrochloride triethanol amine-NaOH were adequated for these experiments, but the 5:5 diethyl sodium barbiturate was not considered suitable.

### RESUME

La précipitation de carbonate de calcium par 96 souches bactériennes isolées du sol, a été étudié dans le milieu B-4 tamponé avec trois systèmes tampon différents aux pH 7 et 8.

Alorsque à pH 8, toutes les souches éprouvées ont été capable de précipiter le carbonate de calcium, a pH 7 cette précipitation n'a lieu qu'exceptionnellement.

Les tampons tris hydroximethyl amine méthane-HCl et chlorhydrate triethanol amine-OHNa se sont révélés idoines pour ces expériences, tandis que le tampon 5:5 diethyl barbiturate avec sodium-HCl n'était pas propre.

## INTRODUCCION

Han sido muchos los trabajos realizados en torno a la precipitación bacteriana de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , bien en su forma de aragonito (7), (9), (8), (1), bien en su forma de calcita (3), (12), (10); aunque la mayoría de estos trabajos se han realizado en el laboratorio algunos autores sugieren que estos procesos pueden dar lugar a la creación de depósitos geológicos (6).

La influencia del pH en la precipitación bacteriana de carbonato cálcico ha sido objeto de controversia (11), (2), (9), (13). Nosotros en un trabajo anterior (14) llegamos a la conclusión de que no es necesaria la alcalinización previa del medio de cultivo, pero debido a que todos los trabajos existentes al respecto se habían realizado en medios no tamponados, creimos de interés el realizar un estudio similar con medios tamponados que nos ayudaría a clarificar el pH real necesario para la formación bacteriana de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ .

## MATERIAL Y METODOS

### *Microorganismos:*

Se ensayaron 96 cepas bacterianas aisladas del suelo, que presentan todas ellas la capacidad de precipitar carbonato cálcico en un medio adecuado (13).

### *Medios:*

Se utilizó el medio B-4 (13) tamponado con tres sistemas bufer diferentes: a. Tris-hidroximetil amino metano-ClH, b. 5:5 dietil barbiturato sódico-ClH y c. Clorhidrato de trietanol amina-NaOH. Los pH se ajustaron antes de la esterilización a 7 y 8, con un pHmetro «pH M62 standar, radiometer Copenhagen» con electrodo de vidrio.

La preparación de los tampones se realizó de acuerdo con las fórmulas de Dawson y col. (4) y Dien y Lentner (5).

### *Técnica de estudio:*

Las bacterias se sembraron masivamente de forma que tuvieran un diámetro de aproximadamente 1 cm, se inocularon 3 placas por microorganismo y se llevaron a incubar a estufa a 27°C. Las lecturas se realizaron a partir de las 48 horas de la siembra y hasta los 30 días. En todas las experiencias se dejaron placas control no inoculadas o inoculadas con células bacterianas muertas por calor, y tanto las placas sembradas como los controles se introdujeron en bolsas de plástico para evitar la desecación de las mismas.

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

Los cristales formados por todos los microorganismos se trataron con ácido clorhídrico diluido para observar el desprendimiento o no de burbujas de gas (CO<sub>2</sub>) que nos orientara sobre la presencia de carbonatos.

Posteriormente se seleccionaron 2 cepas y se sembraron para 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 (12) y la identificación definitiva por difracción de rayos X para lo que se utilizó un equipo de difracción 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 exponen los resultados correspondientes a la formación de cristales a pH 7, y en la tabla 2 los resultados obtenidos a pH 8, indicando en ambos casos el número de cepas y días en que se inicia la precipitación.

En las placas control no se ha observado en ningún caso formación de cristales.

El tratamiento de los cristales con ácido clorhídrico diluido dió en todos los casos desprendimiento de gas, lo que nos orienta hacia la presencia de carbonatos. Esto fue confirmado posteriormente mediante difracción de rayos X que nos reveló, en todas las muestras ensayadas, la presencia de calcita.

Tabla 1: Inicio de la formación de cristales en medios tamponados a pH 7.

Días	1	2	3
2	-	-	-
3	-	-	-
5	1	-	-
10	2	3	2
15	-	-	-
20	-	-	-
25	-	-	-
30	-	-	-

1 = Tampón tris-hidroximetil amino metano-ClH

2 = Tampón 5:5 dietil barbiturato sódico-ClH

3 = Tampón clorhidrato de trietanol amina-Na OH

Tabla 2: Inicio de la formación de cristales en medios tamponados a pH 8.

Días	1	2	3
2	10	18	-
3	28	17	41
5	34	24	33
10	24	35	17
15	-	2	5
20	-	-	-
25	-	-	-
30	-	-	-

1 = Tampón tris-hidroximetil amino metano-ClH

2 = Tampón 5:5 dietil barbiturato sódico-ClH

3 = Tampón clorhidrato de trietanol amina-NaOH

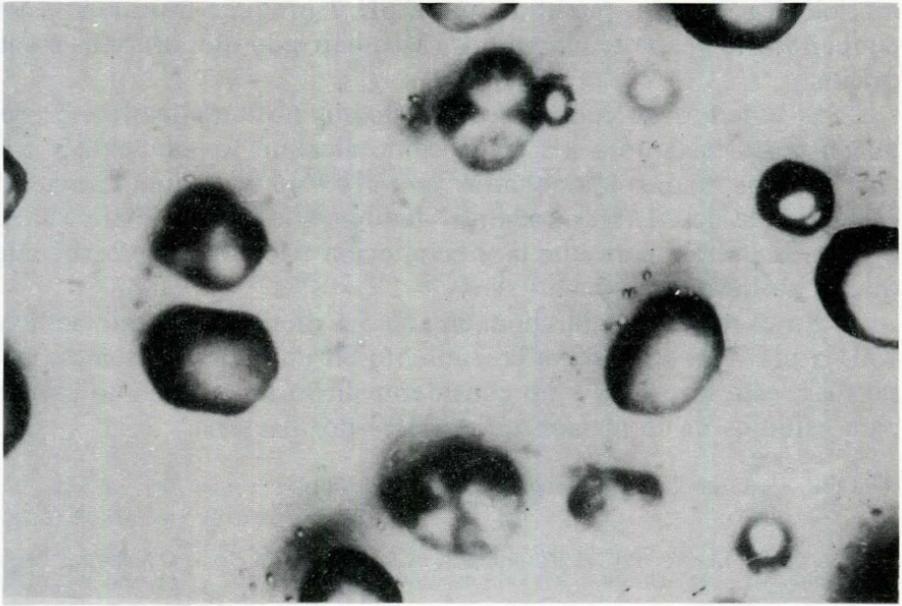


FIGURA 1.—Cristales producidos por la cepa T3 en el medio B-4 tamponado con clorhidrato de trietanol amina a pH 8.

## DISCUSION

La selección de los tampones se hizo basándonos por una parte en que son sistemas bufer biológicos, que presentan entre sus márgenes de pH, los pH 7 y 8 elegidos para nuestra experiencia, y por otra, el que pensamos que estos tampones no interfieren la precipitación de carbonato cálcico como ocurre con tampones de fosfatos o boratos más usuales en microbiología.

Como puede observarse en las tablas 1 y 2 los resultados obtenidos han sido similares para los tres tampones utilizados, formación de cristales a pH 8 y no producción a pH 7, salvo algunas excepciones que se reflejan en las tablas.

Los cristales formados a pH 7 son de tamaño inferior y se producen en menor cantidad que a pH 8, observándose también a pH 7 un ligero retraso en el inicio de formación de los mismos.

Es curioso el caso de la cepa T3, que a pH 8 produce dos tipos de cristales (Fig. 1) unos grandes y otros pequeños con apariencia

morfológica distinta, mientras que a pH 7 produce únicamente los pequeños, no obstante, en ambos casos han sido identificados como calcita.

Si tenemos en cuenta que en medios no tamponados se producen cristales tanto a pH ácido como alcalino Rivadeneyra y col. (14) y en los medios tamponados ya a pH 7 no se da una formación considerable de cristales podemos deducir que un pH final alcalino es imprescindible para que la precipitación bacteriana de carbonato cálcico se lleve a cabo.

En el medio B-4 tamponado con 5:5 dietil barbiturato sódico-CIH a pH 7 no se observa crecimiento en un 49% de las cepas ensayadas, esto nos lleva a no considerar dicho tampón como idóneo para estudios de formación de cristales por bacterias.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BILLY, C.; BLANC, Ph. et ROUVILLOIS, A. (1976): *Ann. Inst. Océanogr.*, París, 52, 231-239.
2. BOQUET, E. (1973): Tesis Doctorales. Universidad de Barcelona.
3. BOQUET, E.; BORONAT, A. and RAMOS-CORMENZANA, A. (1973): *Nature*, 246, 527-529.
4. DAWSON, R. M. C.; ELLIOT, D. C.; ELLIOT, W. H. and JONES, K. M. (1969): *Data for biochemical Research*. 2.<sup>a</sup> ed. Oxford University. Press. London. 492.
5. DIEM, K. y LENTNER, L. (1975): *Tablas científicas*. 7.<sup>a</sup> ed. Leigy. División Farmacéutica. Barcelona.
6. DOETSCH, R. N. and COOK, T. M. (1973): *Introduction to bacteria and their ecobiology*. Medical and Technical Publishing. Co. Ltd. Lancaster.
7. GREENFIELD, L. J. (1963): *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 109, 23-45.
8. KRUMBEIN, W. E. (1974): *Naturwiss.* 61, 167-168.
9. McCALLUM, M. F. and GUHATHAKURTA, K. (1970): *J. Appl. bact.* 33, 649-655.
10. MORITA, R. Y. (1980): *Geomicrobiol. J.* 2, 63-82.
11. OPPENHEIMER, C. H. (1961): *Geochim. et Cosmochim. Acta* 23, 295-299.
12. RAMOS-CORMENZANA, A. (1975): *Microbios* 13, 61-70.
13. RAMOS-CORMENZANA, A.; PEREZ-MIRANDA, M. C. y BOQUET, E. (1975): *Ars Pharm.*, 3, 335-343.
14. RIVADENEYRA, M. A.; PEREZ-GARCIA, I.; FERNANDEZ-GUTIERREZ DEL ALAMO, M. y RAMOS-CORMENZANA, A. (1982): *Ars Pharm.*, 3, en prensa.