REVISTA DEL CENTRO DE GRADUADOS E INVESTIGACIÓN. INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA. Vol. 33 NÚM. 73 PP. 230-233 OCT. 2018 ISSN 0185-6294

POTENCIAL BIOMINERALIZANTE DE BACTERIAS EPILÍTICAS

Ortega-Cano[1], Manuel Eduardo; Ortega-Morales[1], Benjamín Otto; Reyes-Estebanez[1], María Manuela del Jesús y Camacho-Chab[1], Juan Carlos

[1]Universidad Autónoma de Campeche. Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología. Av. Agustín Melgar s/n entre Juan de la Barrera y Calle 20, Col. Buenavista. C.P. 24039. San Francisco de Campeche, Campeche, México
Autor de correspondencia: al039513@uacam.mx; beortega@uacam.mx

Recibido: 31/agosto/2018 Aceptado: 30/septiembre/2018 Publicado: 31/octubre/2018

RESUMEN

El crecimiento microbiano puede provocar deterioro en edificios y objetos de importancia histórica o cultural. Dentro de los mecanismos de deterioro asociado a la presencia de microorganismos resalta la biomineralización, ya que produce eflorescencia; la formación de depósitos de sales sobre la superficie de las rocas, lo que causa cambios en la pigmentación, debilitación y perdida del material. Sin embargo, la biomineralización por inducción ureolítica realizada por bacterias puede aprovecharse para múltiples aplicaciones, entre ellas la inhibición y/o restauración del biodeterioro en monumentos. Por lo anterior, en el presente trabajo de investigación fue evaluada la capacidad biomineralizante por inducción ureolítica de bacterias epilíticas aisladas de roca monumental y de las sustancias poliméricas extracelulares sintetizadas, a través de la detección de su metabolismo ureolítico y la producción de cristales de carbonato de calcio. Un total de 205 aislados bacterianos fueron evaluados, destacando 12 cepas con capacidad ureolítica. La actividad de ureasa detectada fue aceptable e incluso en algunos casos, superior a la presentada por otras bacterias en trabajos similares. La correlación entre la actividad ureolítica, la producción mineral y la producción reportada por los aislados con mayor actividad ureolítica, determinó que las cepas TM1B 407, TM1B 475, TM1B 494 y TM1B 508 fueron los de mayor potencial biomineralizante. Adicionalmente, se comprobó que la precipitación mineral producida por los aislados estudiados se debe principalmente a la inducción ureolítica y no a la producción de sustancias poliméricas extracelulares.

Palabras clave: actividad ureolítica/bacterias epilíticas/biomineralización/ureasa

ABSTRACT

Microbial growth may cause deterioration in buildings and objects of historical or cultural importance. Within the mechanisms of deterioration associated with the presence of microorganisms, biomineralization stands out, since it produces efflorescence, the formation of salt deposits on the surface of rocks, which causes changes in pigmentation, weakening and loss of material. However, biomineralization by ureolytic induction bacterial can be used for multiple applications, including the inhibition and/or restoration of biodeterioration in monuments. Due to the above, in the present research work, the biomineralizing capability by ureolytic induction of epilitic bacteria isolated from monumental rock and extracellular polymeric substances synthesized was evaluated, through the detection of its ureolytic metabolism and the production of crystals of calcium carbonate. A total of 205 bacterial isolates were evaluated, highlighting 12 strains with ureolytic capability. The urease activity detected was acceptable and even in some cases, higher that presented by other bacteria in similar works. The correlation between the ureolithic activity, the mineral production and the production reported by the strains with higher ureolytic activity, showed that strains TM1B 407, TM1B 475, TM1B 494 and TM1B 508 were the best with biomineralizing potential. Additionally, it was found that the mineral precipitation produced by the isolates studied is mainly due to the ureolytic induction and not to the production of extracellular polymeric substances.

Key words: biomineralization/epilithic bacteria/urease/ureolytic activity

INTRODUCCIÓN

La colonización de rocas por microorganismos ha sido un fenómeno ampliamente estudiado por múltiples investigadores. El interés de este proceso ocurre cuando se presenta en sitios como monumentos históricos y zonas arqueológicas, ocasionando el deterioro del patrimonio cultural. El crecimiento microbiano visible por los pigmentos asociados, tales como citoneminas, carotenoides y melaninas, pueden provocar cambios estéticos indeseables en edificios y objetos de importancia histórica o cultural (Ortega-Morales et al, 2013). Dentro de los microorganismos que colonizan las superficies rocosas, cobran importancia las bacterias ya que son de los primeros colonizadores que contribuyen con los mecanismos responsables del biodeterioro. Entre estos mecanismos, resalta la precipitación de carbonatos o biomineralización, ya que produce eflorescencia, la formación de depósitos de sales sobre la superficie de las rocas, lo que causa cambios en la pigmentación, debilitación y perdida del material.

La preservación de los materiales de construcción que conforman tanto edificios históricos como modernos es un problema mundial. Asimismo, los tratamientos de restauración y reemplazo de materiales deteriorados implican costos considerables. Por lo tanto, el desarrollo de productos innovadores para la conservación de materiales de construcción es un desafío importante. Se busca, además, que estos sean una alternativa ecológica más compatible con la roca que los métodos químicos tradicionales, por lo que han cobrado importancia en la conservación del patrimonio cultural y artístico edificado.

La precipitación de carbonato de calcio por inducción ureolítica es un fenómeno estudiado en las áreas de biorremediación, biotecnología y cementación de materiales. Se cree que es un mecanismo útil para la captura de carbono y recientemente, para la propia recuperación de estructuras formadas por roca monumental. Las bacterias sintetizan la enzima ureasa para hidrolizar la urea y producir amonio disuelto, carbono inorgánico y CO_2. El amoniaco liberado en el ambiente circundante incrementa el pH, llevando a la acumulación de $CaCO_3$ insoluble en un ambiente rico en calcio, produciendo sitios de nucleación donde ocurre la precipitación (Hammes y Vestraete, 2002).

Estudios recientes han resaltado el uso de bacterias que producen biominerales por inducción ureolítica. Se han utilizado, como agente regenerativo en materiales de construcción, en el estudio de la resistencia antibióticos por las biopelículas e incluso para producir capas protectoras en monumentos y edificios de piedra caliza (Suprapto et al, 2014). Gracias al reconocimiento de la función de los microorganismos, en el biodeterioro de monumentos de roca caliza, hoy en día se busca el desarrollo de nuevos tratamientos que protejan y restauren la roca monumental del deterioro microbiano, ocasionado por los procesos de biomineralización. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el potencial biomineralizante de bacterias epilíticas aisladas de roca monumental, con el fin de encontrar cepas candidatas que permitan inhibir y/o restaurar el biodeterioro en monumentos históricos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 203 aislados bacterianos epilíticos pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos Ambientales del Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Universidad Autónoma de Campeche, fueron evaluados a través de la detección de su metabolismo ureolítico y la producción de cristales de carbonato de calcio.

Actividad ureolítica

La actividad ureolítica se determinó de manera cualitativa y cuantitativa. Para la determinación cualitativa se sembró cada aislado en cajas Petri de 60 x 15 mm con un medio selectivo de ureasa y se incubaron por triplicado a 30 °C por 48 h. Pasado este tiempo, un cambio de color en el medio de naranja a rojo o violeta se tomó como positivo para actividad ureolítica (Xu et al, 2017).

La determinación cuantitativa se realizó con las bacterias que resultaron positivas en el ensayo anterior, utilizando el kit enzimático Sigma-Aldrich MAK120 para actividad de ureasas. El ensayo y cálculo de actividad de ureasa se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Las enzimas citosólicas se aislaron siguiendo la metodología de Burbank et al. (2012). Asimismo, a 5 cepas con actividad ureolítica destacada se les realizó la cuantificación de proteínas totales con el método de Lowry et al (1951).

Producción de cristales de calcio

La producción de cristales de carbonato de calcio se realizó en dos medios sólidos (TSA enriquecido con $CaCl_2$ y B4) y un medio líquido (TSB enriquecido con $CaCl_2$). Los medios sólidos fueron incubados a 28 °C por 3 semanas. El medio líquido se incubó en un agitador orbital a 120 rpm y 28 °C por el mismo tiempo. Los cristales fueron recuperados fundiendo los medios sólidos y filtrando todos los cultivos con un papel filtro Whatman No. 1 para posteriormente lavarlos con agua destilada y secarse a 37 °C por 48 h. (Dhami et al, 2013). La producción de cristales en todos los medios evaluados fue cuantificada por gravimetría y se obtuvo el promedio de cada uno de los triplicados realizados en este ensayo.

Evaluación de capacidad biomineralizante de EPS bacterianos

Para determinar si la producción de biominerales observada estaba relacionada con la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), se realizó un ensayo de nucleación sobre perlas de agarosa con aquellas bacterias que presentaron la mayor producción de minerales. Los EPS fueron extraídos y fijados a perlas de agarosa con formaldehido al 4% y sumergidos en una solución salina por 5 días. Pasado este tiempo se lavaron con NH_4OH al 1% y se montaron en un portaobjetos para su observación en busca de la presencia de cristales (Kawaguchi y Decho, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del análisis cualitativo de 205 aislados bacterianos, se obtuvieron 12 aislados con actividad ureolítica: TM1B 257, TM1B 343, TM1B 357, TM1B 403, TM1B 405, TM1B 407, TM1B 475, TM1B 494, TM1B 508, TM1B 524, TM1B 538 y TM1B 541. Los resultados cuantitativos de estos aislados se observan en la Fig. 1 siendo TM1B 535 un control negativo. Los resultados de la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry et al (1951) se observan en la tabla 1. Los aislados evaluados en este trabajo tienen una actividad de ureasa aceptable, que va de 0.0322 U/mg a 0.08 U/mg en los aislados de interés. Esta incluso es mayor que la de bacterias ya utilizadas en trabajos de biomineralización

por inducción ureolítica, como es el caso de *Bacillus subtilis* que Suprapto et al (2014) determinaron usando el mismo kit Sigma MAK120 utilizado en este trabajo.

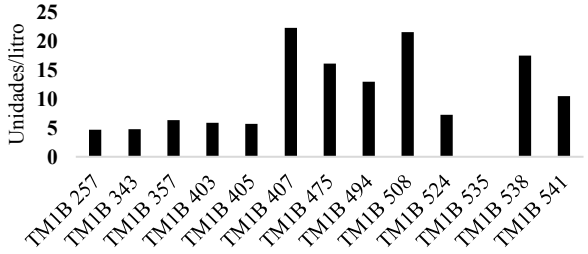

Figura 1. Actividad de ureasa de los aislados seleccionados. TM1B 535 fue utilizado como control negativo.

Tabla 1. Proteínas totales y actividad de ureasa de los aislados selectos

Aislado	*Proteínas totales (mg/ml)*	*Actividad de ureasa (U/l)*	*Actividad de ureasa (U/mg)*
TM1B 407	0.278	22.31	0.0802
TM1B 475	0.393	16.09	0.0409
TM1B 494	0.404	13.03	0.0322
TM1B 508	0.609	21.54	0.0353
TM1B 524	0.149	7.24	0.0487

Los 12 aislados positivos a ureasa fueron sembrados en los medios para la producción de precipitados de calcio, dando diferentes rendimientos (Fig. 2). En general en el medio de cultivo en el que se detectó la mayor producción de cristales fue el medio TSA modificado seguido del medio TSB y el medio B4 fue el que tuvo la menor producción, dándose incluso una nula formación de cristales en este medio.

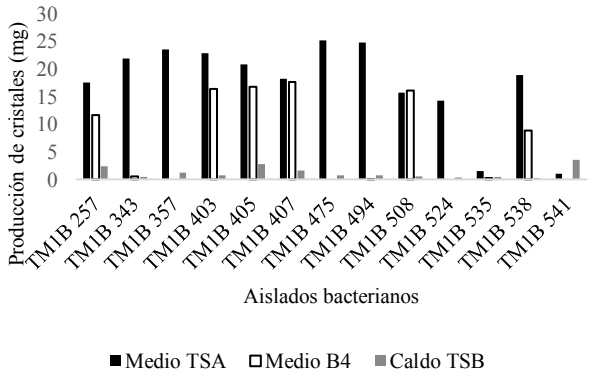

Figura 2. Producción de cristales de calcio en los diferentes medios de cultivo evaluados.

Los aislados con mayor producción de cristales en el medio TSA modificado fueron TM1B 475 con 25.1 mg y TM1B 494 con 24.7 mg. La mayor producción en el medio B4 la presentó el asilado TM1B 407 con 17.6 mg. La cuantificación gravimétrica de cristales de carbonato de calcio en medio sólido, por lo general no es reportada, ya que el crecimiento bacteriano en placas de agar se utiliza cualitativamente para determinar la presencia de cristales (Marvasi et al, 2012). Para estudiar la producción de biominerales se utiliza un medio general para bacterias, como el caldo o agar nutritivo y se modifica añadiéndole cloruro o acetato de calcio y urea para inducir la precipitación mineral (Dhami et al, 2013, Xu et al, 2017). En este trabajo, se utilizó el medio general TSA ya que fue en el que se realizó el aislamiento y conservación de las bacterias estudiadas y al igual que el agar nutritivo, se modificó añadiendo urea y $CaCl_2$. Otro medio frecuente reportado en la bibliografía para la precipitación mineral es el B4, diseñado para promover la formación de cristales de calcio (Marvasi et al, 2012). Sin embargo, aunque también se consiguió la precipitación mineral en este medio, no todos los aislados evaluados lograron crecer en él. Después de fundir y filtrar el medio, se realizó la observación de los cristales producidos (Fig. 3).

La producción de cristales en el medio líquido fue significativamente menor que en los medios sólidos, teniendo una producción máxima de 3.5 mg para el asilado TM1B 541. Esto es considerablemente diferente de la reportada en la bibliografía. Dhami et al (2013) reporta una producción de carbonatos entre 150 y 200 mg/100 mL de caldo nutritivo para bacterias del género *Bacillus* aisladas de suelos calcáreos. La poca producción obtenida en este trabajo podría deberse a la poca adecuación de los aislados al medio líquido, a la incompatibilidad del $CaCl_2$ en el medio TSB o a la concentración de $CaCO_3$ adicionada en cada estudio, por lo que quizá incrementar la concentración de calcio en los cultivos podría favorecer la producción de biominerales. Ensayos de optimización en el medio líquido para la producción de cristales de carbonato de calcio podrían realizarse en el futuro.

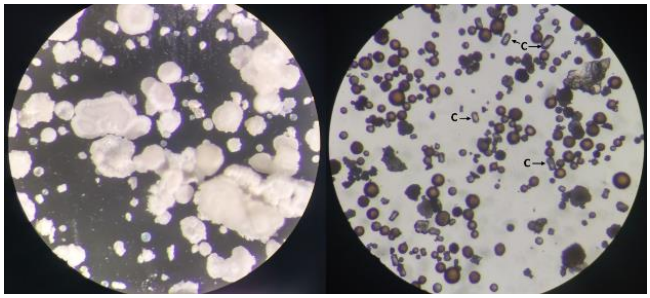

Figura 3. Precipitados minerales producidos por diferentes aislados bacterianos. Izquierda: Precipitados irregulares producidos por TM1B 257. Derecha: Precipitados esféricos y cristales producidos por TM1B 508. C: Cristales.

La correlación entre actividad de ureasa y producción mineral ha sido reportada múltiples veces (Dhami et al, 2013). Los resultados de este trabajo coinciden parcialmente con esto, siendo esta correlación bastante más evidente en el medio B4. Sin embargo, los aislados con mayor actividad de ureasa tuvieron una producción moderada o alta de precipitados minerales en el medio TSA. Esto refuerza la idea de que la actividad metabólica no es el único factor que interviene en el proceso de precipitación mineral producida por bacterias. Adicional a la actividad ureolítica podrían actuar la presencia de EPS y de otras superficies celulares

ionizadas como factores relevantes en la precipitación microbiana de carbonato de calcio.

De los cinco aislados seleccionados, ninguno presentó producción de cristales sobre las perlas de agarosa recubiertas de EPS, encontrándose cristales aislados solo en los controles. La formación de cristales en los controles era de esperarse, ya que se tiene documentada la actividad carbonatogénica de múltiples polisacáridos neutros y la agarosa, al ser una sustancia de este tipo, tendría la capacidad de realizar esta interacción e inducir la precipitación de biominerales (Kontrec et al, 2008). En este sentido, al no haber crecimiento cristalino sobre las perlas de agarosa cubiertas con EPS, éstos parecen no estar actuando como sitios de precipitación mineral. Por lo que en este estudio la producción mineral observada fue generada principalmente por la actividad ureolítica de los aislados bacterianos y no por la producción e interacción de los EPS.

CONCLUSIONES

En este trabajo, se obtuvieron 12 aislados con actividad ureolítica de la CCMA-DEMAB. Estos aislados presentaron una actividad de ureasa aceptable e incluso mayor que la reportada por otras bacterias en trabajos similares. Los aislados con mayor actividad ureolítica fueron TM1B 407 y TM1B 508. Los aislados con mayor producción mineral fueron TM1B 475 y TM1B 494. Dada la correlación entre la actividad ureolítica y la producción mineral, y la producción reportada por los aislados con mayor actividad ureolítica, estos aislados (TM1B 407, TM1B 475, TM1B 494 y TM1B 508) fueron determinados como los de mayor potencial biomineralizante. Adicionalmente, se comprobó que la precipitación mineral producida por los aislados estudiados se debe principalmente a la inducción ureolítica y no a la producción de EPS

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se circunscribe dentro del marco del Proyecto “Influencia de nano y biomateriales en la colonización microbiana de roca monumental” Clave 257449 perteneciente a la Convocatoria 2015 “Investigación Científica Básica” del CONACYT y fue realizado en el Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología (DEMAB) de la Universidad Autónoma de Campeche.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Burbank M. Weaver T. Williams B. Crawford R. 2012. Urease Activity of Ureolytic Bacteria Isolated from Six Soils in which Calcite was Precipitated by Indigenous Bacteria. Geomicrobiology Journal, 29:4: 389-395.

Dhami, N. Sudhakara Reddy M. Mukherjee A. 2013. Biomineralization of Calcium Carbonate Polymorphs by the Bacterial Strains Isolated from Calcareous Sites. Journal of Microbiology and Biotechnology, 23: 707–714.

Hammes, F., Verstraete, W., 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 1: 3-7.

Kawaguchi T, Decho AW. 2002. A laboratory investigation of cyanobacterial extracellular polymeric secretions (EPS) in influencing CaCO3 polymorphism. Journal of Crystal Growth 240: 230-235.

Kontrec J. Kralj D. Brecevic L. Falini G. 2008. Influence of some polysaccharides on the production of calcium carbonate filler particles. Journal of Crystal Growth 310: 4554-4560.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.

Marvasi M.; Gallagher K.; Casillas Martinez L.; Molina Pagan W.; Rodríguez Santiago R.; Castilloveitía Vega G.; Visscher P. 2012. Importance of B4 Medium in Determining Organomineralization Potential of Bacterial Environmental Isolates. Geomicrobiology Journal. 29 (10): 916-924.

Ortega-Morales BO, Gaylarde C. Anaya-Hernández A. Chan-Bacab MJ. De la Rosa-García SC. Arano-Recio D. Montero-M J. 2013. Orientation affects Trentepohlia-dominated biofilms on Mayan monuments of the Rio Bec style. International Biodeterioration & Biodegradation 84: 351-356.

Suprapto Y.H.; Mroueh H.; Lacroix J.M.; Madec E.; Soepandji B.S.; Rahayu W. 2014. Experimental study of utilization of Bacillus subtilis to improve the shear strength of sand. International Conference on Civil, Biological and Environmental Engineering (CBEE-2014). Turkey. 21-26.

Xu G. Li D. Jiao B. Li Dou. Yin Y. Lun L. Zhao Z. Li Shan. 2017. Biomineralization of a calcifying ureolytic bacterium Microbacterium sp. GM-1. Electronic Journal of Biotechnology 25: 21-27.