

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

PRODUCCION DE ESTRUVITA Y OTRAS FORMAS
CRISTALINAS POR *Myxococcus coralloides* D

Manuel Alfredo Entrena Guadix

UNIVERSIDAD DE GRANADA
1994

**Produccion de estruvita y otras formas
cristalinas por *Myxococcus coralloides* D**

**MEMORIA PRESENTADA PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Fdo: Manuel Alfredo Entrena Guadix

Los directores de la Tesis Doctoral

**M^a Teresa González Muñoz
Profesora Titular de Microbiología
Facultad de Ciencias**

**José M^a Arias Peñalver
Catedrático de Microbiología
Facultad de Ciencias**

Granada, Noviembre de 1994

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) de la Universidad de Granada durante los años 1991-1994, siendo subvencionada por el Proyecto PB91-0714 concedido por la DGICYT.

A mi esposa

A mis hijos Manuel y Alvaro

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

Al llegar el momento de la finalización de este trabajo quiero mostrar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera lo han hecho posible.

A los directores de este trabajo, los Profesores Doctores José M^a Arias Peñalver y M^a Teresa González Muñoz, que me han iniciado en la investigación científica y me han mostrado, en todo momento, su apoyo, amistad y comprensión.

Al Dr. Francisco Huertas, Investigador del CSIC, por su ayuda en la realización e interpretación de las difracciones de rayos X.

Al Dr. Alberto López Galindo, del Instituto de Geología Mediterráneo, por su ayuda en la realización de las gráficas de dispersión de rayos X, y la preparación de diapositivas.

Al Prof. Dr. José Aguilar por su amistad y apoyo.

Al Prof. Dr. Manuel Rodríguez Gallego, por su colaboración en la interpretación cristalográfica.

Al Prof. Dr. Antonio Luis Extremera León, por su apoyo en todo lo referente a la informática.

Al personal de microscopía, laboratorio de preparación de muestras y laboratorio de fotografía de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

A mi amigo y compañero de laboratorio Nabil Ben Omar, sin él este trabajo habría sido imposible.

A todos los miembros del Departamento de Microbiología con los cuales he compartido estos años de trabajo.

A mis amigos del Instituto de Bachillerato Ilíberis por su ánimo y apoyo constante. Especialmente, a mi compañero Francisco Rodríguez Escudero por su ayuda y colaboración.

INDICE

INTRODUCCION	1
MIXOBACTERIAS	2
Estructura celular.	4
Movilidad celular.	9
Nutrición y metabolismo.	12
Ciclos de vida.	17
Iniciación.	20
Agregación.	21
Esporulación.	23
Fructificación.	27
Germinación.	28
El ciclo de desarrollo: su significado.	30
Autólisis en cultivos dispersos.	32
Filogenia y edad de las mixobacterias.	34
Un paso primitivo hacia formas de vida multicelulares	39
Ecología.	40
BIOMINERALIZACION.	43
Clases de biominerales y organismos que los forman.	45
Funciones biológicas de los minerales.	46
Principios generales de biomineralización.	47
Depósitos minerales.	49

Indice

Formación de CaCO ₃ por bacterias.	52
Formación de fosfatos por bacterias.	54
Precipitación de estruvita por bacterias.	55
OBJETIVOS.	59
MATERIAL Y METODOS.	61
1.- Microorganismo	62
2.- Medios de cultivo	62
3.- Técnicas de cultivo	67
3.1.- Condiciones de cultivo	68
3.2.- Medidas de crecimiento bacteriano.	71
3.3.- Medidas de pH	71
4.- Técnicas de recuperación, aislamiento y purificación de cristales ..	71
5.- Identificación de los cristales.	72
5.1.- Técnicas de microscopía.	72
5.2.- Análisis de difracción de rayos X.	73
RESULTADOS.	76
1.- Producción de cristales por <i>M. coralloides</i> en los medios de cultivo habituales de esta bacteria.	77
2.- Influencia de las condiciones culturales en la producción de cristales por <i>M. coralloides</i> D.	81
2.1.- Influencia del pH.	82
2.2.- Influencia de la concentración de fosfato.	86
2.3.- Influencia de la fuente de magnesio.	89
2.4.- Influencia de la relación fosfato/magnesio	92
3.- Identificación de los cristales producidos. Estudios microanalíticos. .	96

Indice

4.- Otros fosfatos y sulfatos distintos de la estruvita producidos por <i>M. coralloides D.</i>	107
5.- Morfologías de estruvita encontradas.	112
6.- Obtención de estruvita utilizando membranas de celofán.	119
7.- Localización de la formación de los cristales.	120
DISCUSION.	123
Producción de estruvita.	124
Morfologías cristalinas producidas.	133
Otras formas cristalinas producidas por <i>M. coralloides D.</i>	137
Presencia de formas no cristalinas.	139
CONCLUSIONES.	143
BIBLIOGRAFIA.	146

INTRODUCCION

INTRODUCCION

MIXOBACTERIAS

Las mixobacterias son bacilos Gram-negativos típicos que abundan en el suelo y en nichos ecológicos en los que exista materia orgánica en descomposición. Su distribución es prácticamente universal, habiéndose aislado a partir de muestras de suelos de todo el mundo y bajo condiciones climáticas tan amplias que abarcan desde el trópico al ártico.

La primera descripción de una mixobacteria data de 1892, año en que Thaxter, cuando se dedicaba a la recolección de hongos en Nueva Inglaterra, observó la presencia de crecimientos de color anaranjado sobre restos vegetales en descomposición. Estos organismos presentaban un aspecto mucoso típico, lo que llevó a Thaxter a incluirlos en un género denominado *Myxobacter* (Thaxter, 1892). Fue este mismo autor quien consiguió, en 1908, cultivar por primera vez estos microorganismos, descubriendo su fase vegetativa unicelular, quedando claro, a partir de este momento, que se trataba de organismos de naturaleza bacteriana.

A pesar de haber transcurrido más de un siglo desde la fecha de su descripción, los conocimientos existentes sobre las mixobacterias dejan mucho que desear y han sido adquiridos prácticamente en el transcurso de los últimos 25 años. El motivo de este retraso radica, de una parte, en que hasta entonces los estudios sobre mixobacterias fueron realizados desde un punto de vista casi exclusivamente morfológico y, de otra, porque las técnicas microbiológicas clásicas son de difícil aplicación al estudio de estas bacterias al ser las mismas incapaces de crecer de forma dispersa en cultivos sobre medios líquidos.

Las características más notables de las mixobacterias, que las diferencian del resto de las bacterias Gram-negativas, son las siguientes: a) presentan un movimiento por deslizamiento, b) son microorganismos de hábitos sociales, presentando un alto potencial morfogenético y c) la capacidad de producción de una gran variedad de enzimas y metabolitos secundarios. Estas propiedades no son independientes unas de otras y pueden tener su justificación en el comportamiento social y ecología de estos microorganismos (Reichenbach, 1984).

La taxonomía de las mixobacterias está basada casi exclusivamente en caracteres morfológicos, tales como la forma de las células vegetativas y de las mixósporas, la forma y estructura de los enjambres y, especialmente, la morfología de los cuerpos fructificantes. Además, se han utilizado algunos parámetros accesorios como pigmentación, tipo de ácidos grasos y producción de actividades enzimáticas lo cual plantea serios problemas a la hora de una determinación microbiológica. Desgraciadamente, ninguno de estos caracteres son estables. Así, muchas razas de mixobacterias pueden dar lugar a cuerpos degenerados o incluso dejar de producir totalmente cuerpos fructificantes. Todos los intentos para inducir a estas razas a una fructificación normal han sido infructuosos (Reichenbach, 1993).

La posición filogenética de las mixobacterias fue establecida en la pasada década, en base a estudios del ARNr 16S (Oyaizu y Woese, 1985; Shimkets y Woese, 1992). En este sentido, el catálogo de oligonucleótidos del ARNr 16S ha demostrado

claramente que las mixobacterias son un grupo coherente y asignadas a una rama del grupo *Proteobacteria* (conocido como bacterias purpúreas), la rama delta, con las bacterias reductoras de azufre y sulfatos y *Bdellovibrio* como parientes remotos mas próximos, no existiendo relación alguna con otras bacterias deslizantes (Shimkets, 1993).

Estructura celular

Son bacilos que presentan una morfología de aspecto cilíndrico, con extremos redondeados o más frecuentemente afilados que se multiplican por fisión binaria transversal. Las células se encuentran embebidas en un mucílago más o menos tenaz constituyendo una colonia plana característica que recibe el nombre de "enjambre". En *Myxococcus virescens* el mucílago está compuesto mayoritariamente por un complejo de proteína-polisacárido-lípido en proporción 14:8:16 (Gnospelius, 1978a). En *Myxococcus xanthus* el material extracelular está compuesto por un polisacárido neutro, carente de ácidos urónicos que aparecen normalmente en los exopolisacáridos de otras bacterias, que representa del 5 al 10% del peso seco total de la colonia (Sutherland y Thomson, 1975). El hidrolizado del polisacárido extracelular está formado mayoritariamente a base de glucosa, galactosa, manosa y ramnosa (Sutherland, 1979). A este mucílago se le han atribuido varias funciones, ninguna de las cuales ha sido demostrada claramente: facilitar la adhesión de unas células a otras; facilitar la adhesión a sustratos sólidos así como su digestión; suministrar protección frente a toxinas y bacteriófagos e intervenir en el movimiento por deslizamiento. El mucílago constituye la matriz en la que se encuentran inmersas las mixósporas en el cuerpo fructificante (Dworkin, 1972).

La estructura de las células vegetativas de las mixobacterias es similar a las de otras bacterias Gram-negativas, así presentan: membrana externa, peptidoglucano y membrana plasmática, que envuelven al protoplasto.

Por lo que respecta al protoplasto, este presenta inclusiones de polifosfatos y

polisacáridos (Voelz *et al.*, 1966). La evolución en el contenido de polifosfatos durante el ciclo de vida de *Myxococcus coralloides* D ha sido estudiada en nuestro laboratorio (González *et al.*, 1989). Los polifosfatos son sintetizados durante la fase de crecimiento vegetativo y fructificación de esta mixobacteria.

Las mixobacterias presentan uno de los genomios cromosómicos más grandes de los existentes en bacterias (Shimkets, 1990). En *M. xanthus* se ha demostrado que el genomio posee un tamaño de 9.554 Kpb (Chen *et al.*, 1990); en *Stigmatella aurantiaca* oscila entre 9.200 y 9.870, dependiendo de la raza, y en *Stigmatella erecta* está comprendido entre 9.710 y 10.100 Kpb (Neuman *et al.*, 1992). Por el contrario, el genomio de otros miembros del subgrupo delta es considerablemente más pequeño. Así, en especies de *Bdellovibrio* el tamaño del genomio oscila entre 1.950 y 2.550 Kpb (Seidler *et al.*, 1972; Torella *et al.*, 1978), siendo ligeramente superiores a los encontrados en algunas bacterias sulfato reductoras, tales como *Desulfovibrio gigas* con 1.630 y *Desulfovibrio vulgaris* con 1.720 Kpb (Postgate *et al.*, 1984). De acuerdo con ello, la evolución de las mixobacterias a partir de un ancestral común en el subgrupo delta, parece haber ido acompañada de una cuatriplicación en el tamaño del cromosoma (Shimkets, 1993).

Aunque los factores fisiológicos y ambientales que controlan el tamaño del genomio son desconocidos, existen dos correlaciones llamativas. Los genomios de mayor tamaño se encuentran en organismos con eficiencia respiratoria muy alta y que son capaces de esporular. Las mixobacterias, como se indicó, presentan un tamaño de genomio grande, mientras que *Anabaena* sp. presenta un tamaño de 6.400 Kpb (Bancroft *et al.*, 1989), *Bacillus subtilis* tiene un tamaño de 5.700 Kpb (Kolsto *et al.*, 1990) y *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans* (Kleser *et al.*, 1992) y *Streptomyces ambofaciens* (Leblond *et al.*, 1990) tienen un tamaño de 8.000 Kpb. Estos datos sugieren la importancia de un sistema respiratorio para generar suficiente energía para poder replicar un gran cromosoma.

Aunque la evolución debió ir acompañada de una expansión del genomio, en

ningún caso se ha demostrado que el ADN adicional tenga un papel esencial, o incluso accesorio, en el desarrollo. Por el contrario, en *M. xanthus* se ha encontrado que sólo una pequeña porción del genomio está destinado al proceso de desarrollo; aproximadamente un 8% del mismo incrementa su transcripción durante el desarrollo y un 0.3–0.6% resulta ser esencial para estos eventos (Kroos *et al.*, 1986). Una situación similar ocurre durante la esporulación en *B. subtilis* (Piggot, 1973).

Además, no parece que este tamaño esté relacionado con la formación de esporas, ya que *B. subtilis* presenta un tamaño similar al de *Escherichia coli*. Asimismo, *Anabaena*, bacteria formadora de células especializadas en la fijación de nitrógeno (heteroquistes) y de resistencia (acinetos), presenta un genomio muy por debajo del de las mixobacterias.

Se ha especulado que este exceso de ADN podría permitir a estos organismos la flexibilidad para poder desarrollar unas funciones génicas que les permita incrementar la complejidad morfológica y de desarrollo. Además, gran parte de la información contenida en su cromosoma podría ser usada para otras funciones (Shimkets, 1993).

En procariotas, la metilación del ADN tiene implicaciones importantes en la regulación de diversas funciones (Razin y Riggs, 1980). El ADN de *M. xanthus* se metila en sitios específicos durante los procesos de desarrollo y en fases tardías del crecimiento vegetativo. Sin embargo, sólo una fracción de la población de moléculas de ADN aparece metilada (Yee e Inouye, 1982). Las principales funciones de la metilación en mixobacterias están relacionadas con la movilidad y el comportamiento táctico en *M. xanthus* (McBride *et al.*, 1993).

Otra característica peculiar del genomio de las mixobacterias es su alto contenido en G+C, entre 67 a 71 mol % (Johnson y Ordal, 1986; Mandel y Leadbetter, 1965; McCurdy y Wolf, 1967) situándose próximo a un extremo del amplio rango (24–74 mol %) comprobado en bacterias (Normore, 1976). Hay pruebas de que

contenidos tan elevados en G+C correlacionan la cantidad de luz a la que se encuentran expuestas las bacterias que los poseen (Singer y Ames, 1970). Esta elevada proporción de G+C en las mixobacterias, que viven normalmente sobre las capas superficiales del suelo, podría suponer una adaptación para resistir exposiciones periódicas a dosis altas de luz ultravioleta.

Por último, se ha comprobado en diversas especies de mixobacterias la existencia de ADNs accesorios lineales y de cadena simple, referidos como "msDNA", que están presentes en más de 500 copias por cromosoma (Yee *et al.*, 1984). El "msDNA-1" contiene ribonucleótidos en su extremo 5', existiendo de 500 a 700 copias por cromosoma (Dhundale *et al.*, 1985). Estas moléculas son sintetizadas a partir de genes cromosómicos, utilizando un mecanismo de síntesis mediante una transcriptasa inversa, de similar estructura a la polimerasa encontrada en retrovirus (Lampson, 1993).

Los genes que codifican la transcriptasa inversa aparecen en una nueva clase de retroelementos encontrados en procariotas, llamados retrones. Estos fueron descubiertos inicialmente en *M. xanthus* (Inouye *et al.*, 1989) y *S. aurantiaca* (Furuichi *et al.*, 1987a y b), aunque posteriormente también se ha descrito en *E. coli* (Lampson *et al.*, 1989; Lim y Maas, 1989). Estos retrones también codifican para la producción de los "msDNA".

Estos "msDNA" se encuentran en la mayoría de las razas de mixobacterias ensayadas (Dhundale *et al.*, 1985) y puesto que los genes de la transcriptasa inversa emplean un uso de codones típico de mixobacterias (Inouye *et al.*, 1989, 1990), parece que la transcriptasa inversa estaba presente en una mixobacteria ancestral.

De otra parte, los "msDNA" se han encontrado únicamente en algunas razas de *E. coli*. Sin embargo, estas razas carecen del uso de codones típicamente utilizado por las mixobacterias. Es por ello que se sugiere que *E. coli* ha adquirido esta propiedad por transferencia a partir de alguna otra fuente (Lampson *et al.*, 1989). Así,

estos elementos debieron haberse originado dentro del subgrupo delta. No obstante, en otras bacterias del subgrupo delta (*Bdellovibrio* y diferentes especies de sulfato reductoras) no se ha evaluado la presencia de estos inusuales ADNs satélites. De momento, no se atribuye función alguna a estos "msDNA" (Inouye *et al.*, 1990).

La membrana externa, a diferencia de otras bacterias, se encuentra constituida por un lipopolisacárido que no presenta heptosa, presentando, en algunos casos, 3-O-metil-D-xilulosa (Sutherland y Smith, 1973; Rosenfelder *et al.*, 1974). Presenta ácidos grasos ramificados de número impar de átomos de carbono. Esta membrana es menos densa que la membrana plasmática lo que se debe a su alto contenido en fosfolípidos, fundamentalmente fosfatidiletanolamina que llega a alcanzar un porcentaje del 64% del total (Orndorff y Dworkin, 1980). La membrana externa de las mixobacterias presenta una estructura más permeable a las sustancias de tipo hidrófobo que la de las bacterias entéricas (Kaiser *et al.*, 1979).

Con respecto al peptidoglucano este se caracteriza porque no se presenta como una capa continua, como ocurre en otras bacterias Gram-negativas, sino que, en mixobacterias, está representado por una serie de estructuras discontinuas a manera de paquetes conectados entre sí por un material sensible a la tripsina formado por polímeros de glicocola y serina (White *et al.*, 1968). Esto puede explicar la flexibilidad que presentan este tipo de células y su capacidad para convertirse en mixósporas (Kaiser *et al.*, 1979). En el caso de *M. xanthus* el peptidoglucano está constituido por ácido glutámico, ácido mesodiaminopimélico, alanina, glucosamina y ácido murámico fundamentalmente; a estos componentes hay que añadir cantidades significativas de glicocola, serina y glucosa (White *et al.*, 1968).

Por lo que respecta a la membrana plasmática, esta se ajusta al modelo general, si bien hay que hacer notar que los ácidos grasos de sus fosfolípidos, frecuentemente insaturados, presentan ramificaciones e hidroxilaciones en α o β (Schröder y Reichenbach, 1970; Ware y Dworkin, 1973; Fautz *et al.*, 1979 y 1981). El perfil de proteínas es muy diferente al de la membrana externa (Orndorff y Dworkin,

1980).

Se ha detectado la presencia de pigmentos de tipo carotenoide en la membrana citoplasmática de muchas mixobacterias. Estos compuestos son responsables, en parte, de la coloración de las colonias y de los cuerpos fructificantes, y parecen tener una función fotoprotectora (Kleining *et al.*, 1970; Reichenbach y Kleining, 1971; Kleining, 1972).

Finalmente, las mixobacterias presentan apéndices extracelulares de tipo fimbrias -pili- de localización polar, a las que se atribuye un papel importante en la adhesión de las células en la comunidad, así como en el movimiento coordinado de estas bacterias (MacRae y McCurdy, 1975; Dobson *et al.*, 1979; Kaiser, 1979). Recientemente se han obtenido evidencias claras del papel de las fimbrias en el comportamiento social, ya que una desfimbriación mecánica no afecta el movimiento individual de las células (Rosenbluh y Eisenbach, 1992).

A pesar de ello, su papel no está del todo claro. Estos autores sugieren que las fimbrias actúan como sensores táctiles que indican la proximidad de otras células y que sería la señal para que las células sinteticen o exporten unos filamentos extracelulares (Arnold y Shimkets, 1988a, 1988b), referidos como fibrillas, que hacen que las células permanezcan unidas durante su movimiento social (Behlamder y Dworkin, 1991).

Estas fibrillas de naturaleza glucoproteica están distribuidas alrededor de la célula. Su tamaño, de más de 50 nm de longitud por 15 a 30 nm de diámetro, indica que son mucho más largas y gruesas que las fimbrias. Estas fibrillas conectan unas células con otras y representan las fuerzas cohesivas que mantienen a las células unidas en el enjambre. Su formación es dependiente de la densidad celular (Arnold y Shimkets, 1988b).

Movilidad

Las mixobacterias muestran un movimiento por deslizamiento sobre superficies sólidas o en la interfase aire agua. Este se realiza paralelamente a su eje longitudinal, siendo su tasa de movilidad baja, de $2\mu\text{m}/\text{min}$ (Shimkets, 1987). Hasta el momento, el mecanismo de este movimiento permanece totalmente oscuro, habiéndose atribuido alternativamente a la secreción del mucílago extracelular (Fluegel, 1963), a la formación activa de gradientes de tensión superficial (Keller *et al.*, 1983) y, como parece más probable, a la contracción de filamentos intracelulares asociados a la membrana plasmática y que están ausentes en mutantes que han perdido la capacidad de moverse (Schmidt-Lorenz y Kühlwein, 1968; MacRae y McCurdy, 1976; Buchard *et al.*, 1977; Inouye *et al.*, 1985). Carecen de órganos locomotores detectables y quizás sea esta la causa de que las direcciones de sus movimientos estén restringidas en relación a las de las bacterias flageladas.

Curiosamente las mixobacterias, además del movimiento individual de cada célula, son capaces de moverse como conjuntos coordinados, como puede observarse en la expansión de los enjambres, en que tiene lugar un fenómeno rítmico muy peculiar en el que ondas oscilantes de células discurren sobre la superficie del enjambre (Reichenbach y Dworkin, 1981; Reichenbach, 1965b, 1966). El fenómeno se conoce como "oleaje", dado que el aspecto de las ondas recuerda el de las olas sobre la superficie del mar. Las ondas, alineadas paralelamente y perpendiculares al radio del enjambre, consisten en crestas formadas por varias capas de células y están separadas entre sí por una monocapa con pocas células (Shimkets y Kaiser, 1982b). Las ondas cambian continuamente su posición, viajando con una notable velocidad ($2,2\ \mu\text{m}/\text{min}$), hasta el punto de que su migración puede observarse con el microscopio de disección. El oleaje puede ser inducido por preparaciones de peptidoglucano o ciertos componentes del mismo (Shimkets y Kaiser, 1982b). Este movimiento, como conjuntos coordinados, parece estar relacionado con los procesos de tipo social que dichas bacterias protagonizan, de los cuales, el más importante es la formación de cuerpos fructificantes. En el movimiento de expansión de los enjambres parecen jugar un papel fundamental las fibrillas polares de estas bacterias (Kaiser, 1979).

El deslizamiento puede, por tanto, ser realizado individualmente o en grupos, existiendo células que lo hacen de las dos formas o bien de sólo una de ellas. En *M.xanthus* el movimiento deslizante está controlado por dos sistemas multigénicos: un sistema A (de "Aventurero") con al menos 22 loci, que controla el movimiento de las células individuales, y un sistema S (de "Social") con al menos 10 loci, que controla el movimiento de grupos de células (Hodgkin y Kaiser, 1977, 1979a, 1979b).

Las células A^+S^+ se mueven individualmente o en grupos compuestos desde unas pocas a miles de células, estando controladas las diferentes pautas de movimiento por la expresión relativa del sistema A o S. Células con una mutación en el sistema A (A^-S^+) exhiben un comportamiento social puro y se deslizan en enjambres densos, pero nunca como individuos. Por el contrario las células capaces de un comportamiento exclusivamente aventurero (A^+S^-) se deslizan fundamentalmente como individuos. Finalmente células con mutaciones en los dos sistemas (A^-S^-) son inmóviles.

Existe una relación entre el tipo de movilidad que presentan las células y su capacidad para formar cuerpos fructificantes; así, las células inmóviles son incapaces tanto de formar cuerpos fructificantes como de dar el fenómeno del oleaje. La movilidad aventurera parece ser requerida para el oleaje, ya que los mutantes A^-S^+ no lo producen, sin embargo la mayoría de estos mutantes son capaces de dar cuerpos fructificantes. Por último, las estirpes A^+S^- son incapaces de formar cuerpos fructificantes o dar oleaje, lo que lleva a la conclusión de que la movilidad social es fundamental para estos tipos de comportamiento de las mixobacterias.

Parece ser que el contacto celular es requerido para la movilidad de tipo social, ya que las células A^-S^+ permanecen inmóviles cuando están separadas por una distancia igual o superior a la longitud de una célula (Kaiser y Crosby, 1983).

Este contacto celular está facilitado por dos caracteres que parecen estar regulados por el sistema S: la formación de fimbrias y la cohesión celular. En

M.xanthus la formación de las fimbrias polares está correlacionada con la movilidad social, dado que las células A⁺S⁺ y A⁻S⁺ presentan fimbrias, mientras que la mayoría de las A⁺S⁻ no las presentan (Kaiser, 1979). De otra parte las estirpes A⁺S⁺ y A⁻S⁺ de *M. xanthus* tienden a adherirse y aglutinar en poco tiempo cuando se suspenden en tampón conteniendo Ca²⁺ y Mg²⁺, mientras que las estirpes A⁺S⁻ no aglutinan o lo hacen muy pobremente (Shimkets, 1986a y b, 1987). Resultados parecidos han sido obtenidos con estirpes de *S. aurantiaca* (Quall y White, 1982; Gilmore y White, 1985). Así pues la cohesión celular, uno de cuyos factores condicionantes es probablemente la presencia de fimbrias y cuyo establecimiento es energía dependiente en *M. xanthus*, constituye uno de los factores que condicionan la movilidad social al promover y mantener la existencia de grupos de células.

Nutrición y metabolismo

Los estudios de nutrición y metabolismo intermediario de las mixobacterias han venido siendo dificultados por la tendencia de estas bacterias a crecer en medios líquidos de forma no dispersa y por el hecho de que, salvo excepciones, crecen mejor y más rápidamente en medios muy complejos con macromoléculas insolubles de muy diversa naturaleza o células vivas o muertas de otros microorganismos. Esta capacidad es consecuencia de la producción de una gran variedad de enzimas extracelulares o epicelulares, tales como enzimas bacteriolíticas, proteasas, lipasas, celulasas, amilasas etc. En la lisis de otras células, a más de las citadas enzimas, es probable que intervengan también antibióticos y bacteriocinas (Rosenberg y Varon, 1984).

Al ser organismos de hábitos sociales, las sustancias segregadas por ellos benefician, obviamente, a la comunidad, habiéndose observado que la secreción de sustancias se ve estimulada por lo que se conoce como crecimiento cooperativo (Rosenberg *et al.*, 1977).

Entre las enzimas líticas de la pared celular se han descrito las siguientes:

muramidases (Harcke *et al.*, 1971, 1972), glucosaminidasas (Sudo y Dworkin, 1972; Haska, 1974), amidases (Katz y Stominger, 1967) y peptidasas (Tsai *et al.*, 1965; Tipper *et al.*, 1967). Los tres primeros tipos rompen enlaces altamente específicos de la pared celular, mientras que las del cuarto tipo pueden actuar también sobre otros polipéptidos distintos del peptidoglucano. Excepto las especies celulolíticas, la mayoría de estas bacterias producen enzimas proteolíticas que son responsables del crecimiento de las mixobacterias a expensas de muy diversos tipos de proteínas y juegan un papel importante en la bacteriolisis. Se han detectado enzimas proteolíticas en diversas especies de mixobacterias como son *M. virescens* (Gnospeilius, 1978b), *Chondrococcus coralloides* (Harcke *et al.*, 1971) y *M. xanthus* (Rodríguez y Montoya, 1980). Como ocurre también con la actividad bacteriolítica, la actividad proteolítica de las mixobacterias es afectada por la composición del medio de cultivo (Haska y Stahl, 1971; Pérez-López *et al.*, 1978).

También ha sido detectada la presencia de fosfatasas ácidas y alcalinas, extracelulares y periplásmicas, en *M. xanthus* (Nicaud *et al.*, 1984) y en *M. coralloides* D (González *et al.*, 1987), así como en otras mixobacterias (Muñoz *et al.*, 1989). En *M. coralloides* D la producción de fosfatasa ácida y alcalina es constitutiva, independientemente de la presencia de fosfato en el medio (González *et al.*, 1989). Los ensayos *in situ* de estas actividades revelaron que estaban ligadas a células (González *et al.*, 1990). Ambas actividades fueron localizadas citoquímicamente a nivel de la membrana externa y periplasma (González *et al.*, 1994), liberándose al medio de cultivo (aproximadamente un 10%) durante la fase de crecimiento exponencial. Las actividades fosfatasa celulares durante los ciclos de vida de *M. coralloides* D exhiben diferentes perfiles de actividad durante el crecimiento vegetativo y en el proceso de fructificación. También se aprecian diferencias en los niveles de actividad de los dos tipos de mixósporas (González *et al.*, 1987). Resultados similares fueron encontrados en diversas razas de *M. xanthus*, aunque con ligeras variaciones en cuanto a los máximos de actividad (González *et al.*, 1990).

La utilización del ADN por mixobacterias fue ya descrita por Finck en 1950.

Posteriormente Noren (1955) detectó actividad desoxirribosa y ribonucleásica en varias mixobacterias, e incluso observó crecimiento de las mismas en medios suplementados con ADN y ARN como únicas fuentes de carbono y nitrógeno; esto último, sin embargo, fue negado por Loebeck y Klein (1956). Estudios más recientes (Mayer y Reichenbach, 1978) indican que si bien una gran variedad de mixobacterias (*Myxococcus fulvus*, *M. virescens*, *M. xanthus*, *Myxococcus stipitatus*, *Archangium serpens* y *Podangium erectum*) sintetizan abundantes nucleasas de restricción, la localización de las mismas es en el espacio periplásmico y por tanto no se segregan. En este mismo sentido apuntan los trabajos de Morris y Parish (1976) sobre nucleasas de restricción en *M. virescens* y de Martínez-Cañamero (1986) sobre desoxirribonucleasas de *M. coralloides* D. Esta última mixobacteria muestra una alta actividad DNasa que le confiere resistencia a la infección por bacteriófagos (Muñoz *et al.*, 1989). En este sentido, todos los intentos para aislar bacteriófagos específicos de *M. coralloides* D resultaron infructuosos. Muñoz y colaboradores encontraron numerosos bacteriófagos capaces de adsorberse, pero incapaces de multiplicarse en esta bacteria (Muñoz *et al.*, 1987). La actividad DNasa fue purificada obteniéndose tres enzimas diferentes, dos con localización periplásmica y una ligada a la membrana citoplasmática (Martínez-Cañamero *et al.*, 1991). La actividad DNasa total de *M. coralloides* D se mantiene alta tanto a lo largo del crecimiento vegetativo como de la formación de mixósporas (Martínez-Cañamero *et al.*, 1993).

La presencia de enzimas lipolíticas también se ha descrito (Sorhaug, 1974). Este autor encontró una hidrolasa de ésteres del glicerol en *M. xanthus*, aún cuando no aclaró su localización. Posteriormente se demostró la existencia, en esta misma bacteria de una actividad esterásica no difusible, sino asociada a la superficie celular (Rodríguez *et al.*, 1979). Finalmente, Ruíz-Rodríguez (1980) encontró dos sistemas enzimáticos con actividad lipásica en *M. xanthus*, uno de ellos extracelular y otro unido a estructuras celulares.

Además, las mixobacterias presentan capacidad hidrolítica frente a muy diversos tipos de polisacáridos que, aunque muy mal estudiada, es muy amplia, ya

que abarca desde celulasas a amilasas y enzimas que degradan polisacáridos complejos presentes en la pared celular de las bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Solntseva, 1940, 1941; Beebe, 1943; Noren, 1955; McCurdy, 1969a; Irschik y Reichenbach, 1985a; Reichenbach, 1986). La actividad predatora de las mixobacterias puede ser atribuida, en algunos casos, exclusivamente a la producción de enzimas extracelulares (lisis de bacterias Gram-positivas), pero en los restantes casos se requiere además un contacto directo entre la mixobacteria y su presa, lo que indica la intervención de enzimas u otras sustancias unidas a estructuras celulares.

Aparte de las enzimas citadas, también se ha atribuido un papel en la lisis de otros microorganismos a los antibióticos y bacteriocinas producidas por las mixobacterias, en el sentido de que su acción podría ser un paso previo a la lisis por las enzimas extracelulares. Son numerosas las mixobacterias productoras de antibióticos, en contraste con las productoras de bacteriocinas. Los antibióticos producidos por mixobacterias son, en general, sustancias de bajo peso molecular, estructura química compleja, mecanismo de acción variado y un amplio espectro antimicrobiano (Reichenbach, 1986). Las bacteriocinas, sin embargo, sólo se han descrito en cuatro especies de mixobacterias: *M. xanthus* (McCurdy y MacRae, 1974), *M. fulvus* (Hirsch, 1977), *M. virescens* (Brown et al., 1976) y *M. coralloides* D (Muñoz et al., 1984), si bien posiblemente sea un fenómeno general.

Como se ha dicho al comienzo de este apartado, gracias a la producción de este conjunto de enzimas las mixobacterias pueden crecer mejor y más rápidamente en medios de cultivo a base de macromoléculas, bacterias o levaduras que en los medios convencionales y por supuesto que en medios definidos. La complejidad de estos medios ha dificultado y retrasado los estudios sobre nutrición y metabolismo de estas bacterias. La obtención de cultivos dispersos de varias mixobacterias (Dworkin, 1962; Arias y Montoya, 1978) y la definición de medios mínimos para *M. xanthus* (Bretscher y Kaiser, 1978) han permitido conocer algunos de sus requerimientos nutritivos y su metabolismo intermediario, en especial para la mixobacteria citada.

La mayoría de las mixobacterias, con excepción de las celulolíticas, usan aminoácidos como fuente de carbono, nitrógeno y energía y poseen vías metabólicas para oxidar dichos compuestos.

Al parecer los azúcares no son utilizados por las especies bacteriolíticas, aunque sorprendentemente utilizan polisacáridos, incluido el almidón. En *M. coralloides* D se ha encontrado la producción de una α -amilasa extracelular inducible por almidón (Fárez-Vidal *et al.*, 1992). La máxima actividad se produce durante el crecimiento vegetativo, reduciéndose progresivamente durante el ciclo de desarrollo hasta desaparecer, coincidiendo con la formación de las mixósporas; en la germinación de las mixósporas se observa un incremento progresivo de dicha actividad (Fárez-Vidal *et al.*, 1990)

La incapacidad de *M. xanthus* para metabolizar la glucosa era explicable por la falta del enzima hexoquinasa (Watson y Dworkin, 1968). Sin embargo, en otras mixobacterias se ha detectado actividad hexoquinasa: *Stigmatella brunnea* (McCurdy y Khouw, 1969), *Polyangium cellulosum* (Sarao *et al.*, 1985) y en la raza Cc c127 de *Corallocooccus coralloides* (Irschik y Reinchenbach, 1985a).

En relación con las enzimas de la vía glucolítica, que en estas bacterias parece funcionar en sentido inverso, se ha detectado en *M. xanthus* la presencia de una hexoquinasa dependiente de pirofosfato y no de ATP (Shimkets 1984). En nuestro laboratorio se han encontrado dos actividades hexoquinasa en *M. coralloides* D, una ATP dependiente y otra polifosfato dependiente (González *et al.*, 1990). Dado que *M. coralloides* D acumula polifosfatos durante su crecimiento vegetativo y desarrollo (González *et al.*, 1989), estos podrían ser usados como una fuente de energía para la fosforilación de la glucosa mediante la actividad glucoquinasa. En general *M. xanthus* posee todas las enzimas necesarias para la síntesis de azúcares a partir de aminoácidos (Filer *et al.*, 1977).

Se han detectado en *M. xanthus* todas las enzimas necesarias para el ciclo de

los ácidos tricarboxílicos así como las del ciclo del glioxalato, observándose que este último incrementa su actividad durante la esporulación (Shimkets, 1984).

Finalmente, y a pesar de que en *M. xanthus* los aminoácidos sirven como fuente de carbono, nitrógeno y energía, se conoce muy poco sobre el metabolismo intermediario de estos compuestos. La familia del aspártico y la aspartato-quinasa parecen jugar un papel en el control del desarrollo. La metionina requiere para su síntesis una fuente exógena de vitamina B₁₂ (Bretscher y Kaiser, 1978). Los aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina) deben ser aportados como nutrientes (Umbager, 1978); mientras que los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) pueden ser sintetizados por la propia bacteria (Bretscher y Kaiser, 1978). El estudio de las numerosas actividades transaminasas y deshidrogenasas ligadas al metabolismo de los aminoácidos no ha pasado, en la mayoría de los casos, de su detección en extractos celulares (Shimkets, 1984).

Ciclos de vida

La característica más llamativa de las mixobacterias es que exhiben ciclos de vida y modelos de comportamiento únicos entre los procariotas, lo que sin duda está relacionado con su alto potencial morfogenético. Así, dependiendo de las condiciones físicas y nutricionales en que se encuentren, presentan dos opciones de desarrollo: una es crecer vegetativamente, dividiéndose por fisión binaria transversal, se habla de ciclo vegetativo; la otra es formar los llamados cuerpos fructificantes, en este último caso se habla del ciclo de desarrollo (Dworkin, 1972).

El ciclo vegetativo es muy simple; tras sucesivas divisiones binarias, en medios sólidos, se produce una expansión del enjambre, mientras que en medios líquidos y supuesto un crecimiento disperso, conduce a un aumento de la densidad celular del cultivo. Este crecimiento vegetativo se mantiene siempre que el medio contenga abundancia de nutrientes.

El ciclo de desarrollo presenta un alto potencial morfogenético que tiene lugar a dos niveles: una morfogénesis cooperativa, que conduce a la formación de los cuerpos fructificantes (fructificación) por acción conjunta de cientos de miles de células, y una morfogénesis celular, mediante la cual las células vegetativas sufren una serie de cambios que conducen a la aparición de células de reposo, denominadas mixósporas, que se localizan en el interior de los cuerpos fructificantes (esporulación).

Este complejo ciclo de vida de las mixobacterias es análogo al de los hongos mucosos celulares donde la célula vegetativa es una pequeña célula eucariota. Las diferencias entre los dos grupos en cuanto a organización celular indican que no existe ninguna relación evolutiva entre ellos, por lo tanto se puede considerar este paralelismo como un ejemplo de convergencia evolutiva.

Han sido aislados un gran número de mutantes relacionados con el desarrollo y comprobado que pueden agruparse en tres amplias clases: mutantes que no agregan ni esporulan, es decir, que se comportan como defectivos en la iniciación del desarrollo (Hagen *et al.*, 1978; Morrison y Zusman, 1979; McVittie *et al.*, 1962; Rudd y Zusman, 1979); mutantes que esporulan pero que no agregan adecuadamente (Hágen *et al.*, 1978; Morrison y Zusman, 1979) y, finalmente mutantes que agregan normalmente pero que no forman esporas. Estos resultados sugieren que el desarrollo puede ser dividido en tres etapas: iniciación, agregación con formación de cuerpos fructificantes y esporulación.

El ciclo de vida parece relacionado con una tendencia manifiesta a preservar la comunidad. Esto está basado en que dicho ciclo viene condicionado por la necesidad de captación de nutrientes. Al utilizar como fuente alimenticia macromoléculas sólidas más o menos complejas han desarrollado, evolutivamente, de una parte su movimiento deslizante, y, de otra, sus hábitos sociales pues se requiere un mínimo de densidad en la

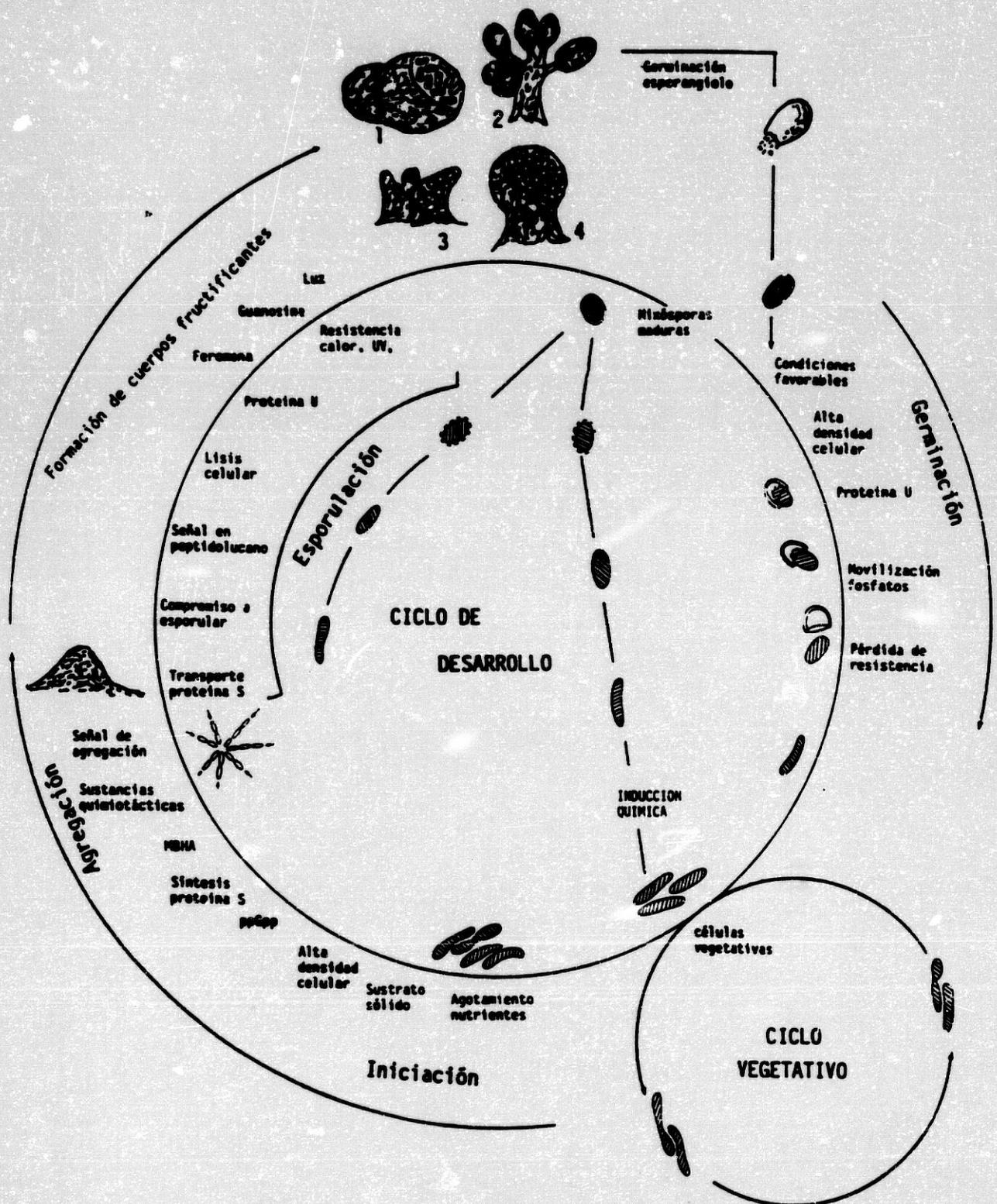


Figura 1.- Ciclos de vida de mixobacterias.

población para asegurar la degradación rápida de las partículas sólidas (Wireman y Dworkin, 1977). La aparición de cuerpos fructificantes está en relación directa con el déficit nutricional (Manoil y Kaiser, 1980a). Los acontecimientos que tienen lugar durante la fructificación obedecen a una secuencia temporal estricta; pocas horas después de la iniciación se observa una fase de agregación que, en condiciones normales, va sucedida de la etapa de esporulación. Esta sucesión de manifestaciones morfoiológicas va acompañada de un programa reproducible de expresión génica (Inouye *et al.*, 1979a; Komano *et al.*, 1980)

Iniciación

El ciclo de desarrollo viene condicionado por la existencia de una/s señal/es intracelular/es que detectarían el déficit nutricional y causarían la secreción de una/s señal/es intercelular/es que sincronizarían la respuesta de la población como un todo.

La privación parcial de los aminoácidos necesarios para el crecimiento vegetativo (alanina, valina, leucina e isoleucina) induce rápidamente el ciclo de desarrollo (Manoil y Kaiser, 1980b; Bretscher y Kaiser, 1978). De igual forma la carencia de otros aminoácidos no esenciales, de una fuente de carbono y energía (piruvato) y de fosfatos inorgánicos también dispara dicho proceso (Manoil y Kaiser, 1980b).

Muchos aminoácidos de la familia del aspártico ejercen un fuerte control sobre la iniciación del ciclo de desarrollo, así, los aminoácidos que modifican la actividad de la aspartatoquinasa, *in vitro*, afectan a la formación de los cuerpos fructificantes. De este modo, los aminoácidos que producen una estimulación de la aspartatoquinasa inhiben el desarrollo de células con carencia nutricional, entre ellos podemos citar la metionina y la isoleucina (Filer *et al.*, 1973; Shabtai *et al.*, 1975; Rosenberg *et al.*, 1973; Campos y Zusman, 1975). Por otro lado los inhibidores de la actividad aspartatoquinasa, tales como treonina y mesodiaminopimélico, inducen el desarrollo de células sin carencia nutricional (Shabtai *et al.*, 1975; Rosenberg *et al.*, 1973;

Campos y Zusman, 1975).

La naturaleza de las señales implicadas en la detección de los niveles de aminoácidos e iniciación del desarrollo permanece sin ser aclarada, habiéndose relacionado con la respuesta estricta y sus mediadores (Manoil y Kaiser, 1980a, 1980b), con la familia de aminoácidos del aspártico y la aspartatoquinasa, (Rosenberg *et al.*, 1973) y con compuestos derivados de la adenina y de nucleótidos cíclicos (Campos y Zusman, 1975; Manoil y Kaiser, 1980c; Passador y McCurdy, 1985).

Agregación

El primer indicativo morfológico de que el programa de desarrollo se ha disparado en *M. xanthus* es la agregación celular. Esta consiste en un movimiento deslizante de las células hacia los centros de agregación frecuentemente mediante una serie de ondas (Shimkets y Kaiser, 1982a). Los agregados crecen posteriormente hasta formar unos montículos y las células de estos se convertirán en mixósporas (Zusman, 1980).

Para que la agregación se realice con éxito, es necesario, además de una carencia nutricional, la necesidad de una superficie sólida, una alta densidad celular y, en algunas especies, la luz. La necesidad de una superficie sólida se entiende fácilmente teniendo en cuenta que la fructificación resulta del movimiento dirigido de un elevado número de células y que las mixobacterias requieren un soporte sólido para desplazarse.

La alta densidad celular es imprescindible ya que una distancia crítica entre célula y célula puede ser necesaria para promover la señal de agregación. La fructificación requiere normalmente la participación de decenas de miles de células, de manera que si no está presente un número suficiente de éstas, la agregación no se da o es muy pobre (Wireman y Dworkin, 1975). Las moléculas implicadas en la atracción de las células hacia los centros de agregación aún no están bien

determinadas. Shimkets y Dworkin proponen que el parámetro que utiliza *M. xanthus* para medir la densidad celular es la concentración extracelular de adenosina. Cuando los otros dos requerimientos se cumplen (superficie sólida y limitación de nutrientes), la adenosina es capaz de inducir la fructificación a baja densidad celular. Además la células excretan adenosina antes de que sea evidente cualquier signo de agregación y su concentración es proporcional a la densidad celular (Shimkets y Dworkin, 1981). Así, la adenosina parece ser la señal principal para la agregación y su secreción no es constitutiva, sino que está regulada por el propio desarrollo; no obstante, al parecer se segregan otras señales químicas no conocidas. Por otro lado, en *M. xanthus* la agregación no es estimulada por la luz.

Las células de *S. aurantiaca*, a densidades menores de la permisiva, son estimuladas para formar cuerpos fructificantes por la luz, una feromona y compuestos derivados de la guanina (Stephens y White, 1980, 1982; Qualls *et al.*, 1978). Una combinación de luz más feromona, o de feromona y guanosina monofosfato, aceleran dramáticamente la agregación.

La interpretación más racional de estos experimentos consiste en suponer que la agregación es nula o defectuosa a concentraciones bajas de células porque estas no pueden generar cantidades suficientes de las señales de agregación.

Se han realizado varios trabajos destinados a identificar proteínas específicas en la cooperación intercelular que se requiere para la agregación. En todos los casos se observa una alteración notable de la superficie celular durante la agregación (Orndorff y Dworkin, 1982; Komano *et al.*, 1982; Maeba, 1983).

M. xanthus, durante la agregación, produce una lectina conocida como MBHA (MixoBacterialHemoAglutinín) que llega a representar el 1-2% de las proteínas del cultivo (Cumsky y Zusman, 1979). La MBHA se encuentra en la superficie de las células y se localiza específicamente en los polos de las mismas. Sus propiedades aglutinantes y su localización sugieren que podría facilitar el contacto y el reconocimiento celular durante la agregación. Sin embargo, mutantes incapaces de

sintetizar esta proteína se agregan y esporulan normalmente, aunque presentan un ligero retraso en el desarrollo (Romeo y Zusman, 1987). Por tanto, el papel de la MBHA en el desarrollo, hoy por hoy, es desconocido, si bien se sabe que está de algún modo relacionado con la movilidad social (Cumsky y Zusman, 1979 y 1981).

De otra parte, se ha intentado conocer las proteínas de superficie de las células en desarrollo mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (Gill y Dworkin, 1986), pero los resultados no son concluyentes.

Durante el proceso de agregación celular descrito, tiene lugar el evento más destacado del ciclo de vida de las mixobacterias: la esporulación. Estos procesos, aunque interrelacionados, son independientes y transcurren paralelamente.

Esporulación

Se trata de la morfogénesis celular en donde una célula vegetativa se convierte en la correspondiente célula de resistencia: las mixósporas. Estas se localizan en los cuerpos fructificantes.

El proceso de esporulación requiere, por un lado, de la síntesis de nuevas proteínas, y, por otro, de una serie de cambios en la forma celular y en el metabolismo. Se ha demostrado que los componentes del peptidoglucano son importantes señales para la esporulación (Shimkets y Kaiser, 1982b).

Morrison y Zusman (1979) aislaron mutantes termosensibles afectados en la fructificación, que parecen estar bloqueados en etapas intermedias del desarrollo. Mientras que algunos de estos mutantes se agregan pero no esporulan ($Agr^+ Spo^-$), otros presentan el fenotipo contrario ($Agr^- Spo^+$). Esta observación, junto a los datos de sus periodos termocríticos, indican que la agregación y la esporulación son rutas separadas en el desarrollo. Es decir, estos dos procesos, aunque interrelacionados, son independientes pero transcurren paralelamente. De esta forma se explicaría el

fenotipo de los mutantes que están afectados tanto en la agregación como en la esporulación ($Agr^- Spo^-$).

Hay pruebas genéticas de que la comunicación intercelular es importante durante la esporulación. Se han aislado mutantes afectados en la esporulación que, sin embargo, cuando se mezclan con células silvestres se vuelven transitoriamente capaces de esporular (Hagen *et al.*, 1978). El rescate del fenotipo mutante puede ocurrir también a través de un filtro que no deja pasar a las células, indicando que la estimulación resulta de la transmisión de sustancias difusibles y no requiere del contacto célula-célula (La Rossa *et al.*, 1983). Estos mutantes condicionales susceptibles de "complementación extracelular", se comportan como incapaces de producir una señal requerida durante la esporulación.

La esporulación es un proceso irreversible a partir de un determinado momento, así, en *M. xanthus* la esporulación es reversible hasta las 32 horas de iniciado el desarrollo; las células, a partir de este momento, se encuentran "comprometidas" a esporular y esporulan aunque se les traslade a un medio rico (Wireman, 1979).

Durante el ciclo normal de desarrollo de *M. xanthus*, *M. fulvus* y *M. virescens*, se ha observado un fenómeno curioso de lisis celular que tiene lugar una vez ocurrida la agregación y justo antes de la esporulación (Wireman y Dworkin, 1975). El fenómeno de esporulación lleva acoplado un proceso de lisis que afecta al 80-90% de las células, y sólo aquellas que sobreviven aparecen como mixósporas en los cuerpos fructificantes maduros (Wireman y Dworkin, 1977).

Este proceso lítico puede interpretarse como un fallo en el intento de esporulación, pero también puede ser una alternativa de desarrollo a la esporulación de forma que los productos resultantes de dicha lisis servirán como estimulantes para la formación o maduración de las esporas.

Los resultados experimentales apoyan la idea de que el número de esporas está determinado por la concentración de los productos de la lisis (Wireman y Dworkin, 1977). La lisis celular libera al medio una serie de sustancias que vienen a paliar el déficit de nutrientes para las células esporulantes.

Se puede aproximar que la lisis celular libera al medio una concentración de aminoácidos entre 2 y 5 mM, y, dado que concentraciones similares de aminoácidos ejercen influencia sobre la iniciación del desarrollo, no es ilógico sugerir que estos productos de lisis influyan en la esporulación (Shimkets, 1987).

Las células esporulantes que están sufriendo morfogénesis son bastante sensibles al choque osmótico y, por tanto, están expuestas a la lisis (Zusman, 1984; O'Connor y Zusman, 1987). Esta fragilidad puede llevar a una sobreestimación en la tasa de lisis durante el desarrollo.

La implicación de señales y la importancia de la lisis en el desarrollo se hace patente en el comportamiento de ciertos mutantes. En ellos, tanto la lisis como el desarrollo están bloqueados y ambos defectos pueden ser rescatados a la vez por adición de componentes del peptidoglucano (Shimkets y Kaiser, 1982b; Janssen y Dworkin, 1985). Se ha propuesto que una de las autocidas mayoritarias que actúan específicamente sobre *M. xanthus*, AMI, podría ser uno de los agentes implicados en el fenómeno de autólisis programada (Varon *et al.*, 1986). Posteriormente, O'Connor y Zusman (1987) llegaron a poner en entredicho la propia existencia del fenómeno de autólisis en *M. xanthus*; achacaban las observaciones previas a un artefacto debido a que las células pasan por un estado de fragilidad física y osmótica durante la esporulación.

La esporulación requiere la existencia de una superficie sólida (Wireman y Dworkin, 1977; Shimkets y Kaiser, 1982b). Sin embargo, esta afirmación no es totalmente general pues presenta dos notables excepciones: en primer lugar, las mixósporas pueden ser químicamente inducidas con glicerol en medio líquido

(Dworkin y Gibson, 1964), y, en segundo lugar, la privación de metionina en medio líquido produce la esporulación de una estirpe de *M. xanthus* (Witkin y Rosenberg, 1970). En cualquier caso, las esporas formadas por estas vías tienen una diferente ultraestructura que las procedentes de los cuerpos fructificantes (Witkin y Rosenberg, 1970; Inouye *et al.*, 1979).

Durante la esporulación las células vegetativas se van recubriendo de una cubierta gruesa y cambian de forma. La excepción la constituyen las especies de *Polyangium* cuyas mixósporas son idénticas a las células vegetativas. Por el contrario, en las especies de *Myxococcus* el cambio de forma es muy acusado dado que las mixósporas tienen forma esférica. En los restantes casos las mixósporas aparecen como formas bacilares acortadas. En todos los casos la tasa respiratoria de las mixósporas es nula. Entre los componentes de las cubiertas de las mixósporas maduras destacan dos proteínas; una, que es sintetizada tempranamente durante el proceso de esporulación, recibe el nombre de proteína S, y, la otra, que se sintetiza tardíamente, el de proteína U (Inouye *et al.*, 1979a, 1979b).

La diferenciación de células vegetativas a mixósporas no es dependiente de la formación de cuerpos fructificantes, ya que Dworkin y Gibson (1964) observaron que la adición de glicerol 0,5 M a cultivos de *M. xanthus* en fase exponencial daba lugar a la producción de mixósporas. Con posterioridad Bacon y Rosenberg (1967) encontraron que otros polialcoholes y el dimetilsulfóxido tenían el mismo efecto que el glicerol.

Las mixósporas obtenidas tras la inducción con los compuestos citados son similares a las que se encuentran en los cuerpos fructificantes por lo que respecta a forma, refringencia y resistencia a los agentes externos, pero son diferentes en otros aspectos. Así por ejemplo, presentan una tasa respiratoria del orden del 20% de la de las células vegetativas (Bacon *et al.*, 1975), acumulan gran cantidad de carbohidratos y su cubierta es mucho más delgada, y, aunque presentan la proteína U, carecen de la proteína S. Esta última diferencia se cree que es debida a que en

la esporulación inducida con glicerol sólo tienen lugar los últimos pasos del proceso de esporulación que se da durante la formación de cuerpos fructificantes (Zusman, 1984), por lo que la síntesis de proteína S, que es temprana, no se efectúa.

Morfológicamente las mixósporas inducidas por glicerol carecen de las tres fuertes cubiertas (Incuye *et al.*, 1979) y, en su lugar, muestran una fina cubierta que no es sensible a la acción de detergentes.

Fisiológicamente las mixósporas inducidas por glicerol tienen una alta tasa respiratoria y acumulan carbohidratos que llegan a ser, después de 24 horas en glicerol, el 20% del peso seco de las células (Bacon *et al.*, 1975).

Una propiedad importante de las mixósporas es su resistencia a la desecación, lo que puede relacionarse con la estabilidad que presentan en sus hábitats naturales. En algunos grupos, *Cystobacteriaceae*, las mixósporas son resistentes a la tracción mecánica y al tratamiento con ultrasonidos y además son muy resistentes a la luz ultravioleta y a las altas temperaturas (Baur, 1905; Reichenbach y Dworkin, 1969; Dworkin, 1969).

Fructificación

El ciclo de desarrollo culmina con la formación de cuerpos fructificantes. La morfología de los cuerpos fructificantes es muy variada en función del género de mixobacterias de que se trate. Reichenbach y Dworkin (1981) publicaron una relación detallada de estos cuerpos fructificantes. La forma, tamaño y estructura de los cuerpos fructificantes es muy variada y han sido utilizados como criterios taxonómicos. Son acúmulos de esporas y mucílago. Los más sencillos son los formados por especies pertenecientes al género *Myxococcus*; los cuerpos fructificantes se presentan en forma de montículos esféricos, columnas o crestas rellenas de mixósporas.

Otras mixobacterias forman cuerpos fructificantes mucho más complejos, así, el género *Stigmatella* presenta cuerpos fructificantes dotados de un pedúnculo del que salen varios esporangiolos y en ellos se observan distintas paredes externas o cubiertas de composición química desconocida. En el género *Chondromyces* el pedúnculo es ramificado y cada rama termina en un racimo de esporangiolos. Los esporangiolos están repletos de mixósporas.

A modo de resumen, la formación de los cuerpos fructificantes viene determinada por una secuencia temporal en la que hay un periodo de agregación celular seguida de una esporulación, y, aunque la agregación normalmente precede a la esporulación no es una precondition necesaria para dicha esporulación. Probablemente ambos procesos presenten rutas separadas en el desarrollo ya que, como se ha comentado anteriormente los mutantes en los que la agregación está bloqueada muestran niveles normales de esporulación y en aquellos otros en los que está bloqueada la esporulación se observan niveles normales de agregación (Morrison y Zusman, 1979; Zusman, 1982).

Germinación

La mayoría de los estudios realizados sobre el ciclo de desarrollo han sido enfocados hacia los procesos de agregación y esporulación, habiéndose abordado pocas veces el estudio de la germinación de las mixósporas y siendo, por tanto, escasos los conocimientos existentes sobre la misma. En todos los casos parece requerirse una alta densidad celular para que el proceso de germinación se efectúe, salvo si la inducción se realiza en medios ricos (Dworkin, 1973). El mecanismo exacto aún no es bien conocido. En cualquier caso, una vez desencadenada la germinación, las mixósporas pierden rápidamente su refringencia, la cubierta se rompe y emerge la nueva célula vegetativa bacilar, dejando atrás la cubierta vacía (Voelz y Dworkin, 1962).

Como se ha indicado, la germinación tiene lugar cuando las mixósporas son

colocadas en un medio rico en nutrientes, por lo que se cree que alguno de estos debe actuar como señal para el desencadenamiento del proceso. Existe evidencia de que en *M. xanthus* el fosfato inorgánico actúa como factor activador de la germinación de las mixósporas obtenidas por inducción con glicerol (Dworkin, 1973). Dworkin comunicó que las esporas de glicerol son capaces de germinar en agua destilada si la densidad celular era superior a 5×10^9 c/ml. A densidades menores a esta, se observa germinación si se añade 1 a 10 mM de fosfato inorgánico. Este requerimiento de una alta densidad celular resulta extraño, pues en la mayoría de los casos conocidos (*Bacillus*, *Dyctiostelium*) se exige la situación contraria para que tenga lugar la germinación (Cotter y Raper 1966). Se ha sugerido que esta característica peculiar de las esporas de *M. xanthus* podría estar relacionada con el sistema de alimentación cooperativo de las mixobacterias. Sin embargo, las mixósporas procedentes de cuerpos fructificantes no parecen responder a esta señal (White, 1975). En *M. coralloides* D la germinación de las mixósporas inducidas con glicerol es independiente de la concentración de fosfato (González *et al.*, 1987).

Más recientemente (Elías, 1989) se ha encontrado que en *M. xanthus*, concentraciones adecuadas de aminoácidos, bien como aminoácidos libres o bien como péptidos, inducen eficazmente la germinación. Las mixósporas no germinan en presencia de otras fuentes de carbono y energía, distintas de los aminoácidos y tampoco responden a la presencia de diversos azúcares. La adición de CaCl_2 provoca una mayor rapidez y sincronía en la germinación. Además, este proceso está sujeto a un programa de expresión génica diferencial (Elías 1989).

Nunca se da el proceso a nivel de células aisladas sino a nivel de toda la comunidad, de forma que la población resultante de la germinación se mantiene unida y se comporta como un nuevo enjambre. En estos enjambres, las células siguen el ciclo de vida vegetativo hasta que se agoten los nutrientes, momento en que se iniciará un nuevo ciclo de desarrollo.

El ciclo de desarrollo: su significado

El complejo ciclo de desarrollo de las mixobacterias ha sido objeto de especulación durante mucho tiempo, y se ha llegado a la conclusión de que su función es asegurar el inicio de un nuevo ciclo a partir de una comunidad y no de una célula aislada. En este sentido, los cuerpos fructificantes serían colonias en reposo.

Ahora bien, ¿por qué es necesario que el ciclo se inicie con una comunidad?

Esta pregunta podría explicarse de la siguiente manera. Las mixobacterias viven en ambientes en los que existen macromoléculas en degradación. Para que una célula aislada pueda captar nutrientes tendrá que producir enzimas de varios tipos y excretarlos al exterior. Dichas enzimas difundirán por el medio y, a una distancia determinada de la bacteria productora, encontrarán un sustrato adecuado para digerir. Los nutrientes resultantes de esta digestión difundirán de manera radial, por lo que sólo una pequeña parte de ellos llegarán a la célula productora de las enzimas, siendo obviamente insuficientes para garantizar el crecimiento de dicha célula.

Si partimos de una comunidad de células, la producción de enzimas será mucho más alta lo que implicará una mayor y más rápida degradación de macromoléculas del medio y, en consecuencia, una mayor disponibilidad de nutrientes en el medio. De esta forma cada célula tendrá acceso a los nutrientes liberados por actividad de toda la comunidad.

Aún cuando las mixósporas pueden germinar aisladamente en medios ricos, este hecho no se da en la naturaleza, en la que, supuesto que existan condiciones favorables, germinan simultáneamente todas las mixósporas contenidas en un cuerpo fructificante o un esporangiolo, con lo que directamente se origina un nuevo enjambre donde se reemprende el crecimiento vegetativo.

Mientras en el medio existan los nutrientes necesarios para garantizar el

desarrollo vegetativo, este se mantendrá en óptimas condiciones. Si se produce un agotamiento de los nutrientes se disparará de nuevo el ciclo de desarrollo.

Además del alto potencial de producción de enzimas hidrolíticas, las células de mixobacterias cuentan con un movimiento por deslizamiento, ante cualquier opción de desarrollo. Así, durante el crecimiento vegetativo la atención de la colonia está enfocada hacia el movimiento y búsqueda de presas microbianas para su hidrólisis. La ausencia de tal fuente dispara el ciclo de desarrollo. Entonces los miembros de la colonia se deslizan hacia puntos de agregación, construyen los cuerpos fructificantes en cuyo interior se diferencian hasta la formación de mixósporas.

De otra parte, el ciclo de desarrollo conlleva el sacrificio de la mayor parte de las células de la comunidad inicial, con el claro objetivo de que unas pocas se puedan constituir en esporas y sobrevivir, al germinar, cuando los nutrientes vuelvan a estar disponibles.

En este sentido, un hecho muy destacado en el proceso de esporulación es la autólisis del 80 % aproximadamente de las células agregadas, de forma que sólo un 20 % llegan a formar mixósporas (Wireman y Dworkin, 1975 y 1977). Esta autólisis masiva parece ser que está ligada al programa de desarrollo, ya que los mutantes SpoC, que no muestran autólisis, no esporulan; la estimulación en estos mutantes de la esporulación se traduce paralelamente en unos niveles normales de autólisis (Shimkets y Kaiser, 1982b). Wireman y Dworkin (1977) han formulado la hipótesis de que, dado que el desarrollo supone un estado de inanición, la muerte y la lisis de la mayor parte de las células tiene por objeto suministrar a los supervivientes suficientes nutrientes para esporular. Esto podría ser considerado, desde un punto de vista sociobiológico, como un caso de altruismo por parte de la población que se sacrifica; aunque también cabe considerarlo como un caso de canibalismo por parte de la población superviviente.

Otra teoría mantiene que algunos de los productos liberados en la lisis podrían

actuar como señales químicas que inducirían la esporulación. Los resultados obtenidos por Shimkets y Kaiser (1982a) apoyan esta hipótesis, ya que pudieron comprobar que los componentes del peptidoglucano son capaces de inducir la esporulación en mutantes SpoC.

Como en el caso anterior, esta última hipótesis también considera la autólisis como un fenómeno de cooperación entre las células de la población; sin embargo, hay que tener en cuenta que las células esporulantes que están sujetas a morfogénesis son osmóticamente delicadas y, por tanto, están expuestas a la lisis, que podría representar sólo un fracaso en el intento de esporular, con poco o ningún papel en el desarrollo (Zusman, 1984). Este proceso de desarrollo supone un gran esfuerzo energético que, parece ser, es suplido por la hidrólisis de los miembros de la comunidad.

Autólisis en cultivos dispersos

Además de la lisis masiva, antes comentada, que tiene lugar durante el ciclo de desarrollo, es característica la autólisis que ocurre durante el ciclo vegetativo en cultivos dispersos de mixobacterias en medios líquidos. En estos cultivos, tras la fase de crecimiento exponencial, entran en una corta fase estacionaria que se continúa con una lisis espontánea que prácticamente lleva a la muerte de todas las células del cultivo. Este fenómeno ha sido descrito en *M. xanthus* (Mason y Powelson, 1958), *M. virescens* (Haskä y Stahl, 1971) y *M. coralloides* D (Fernández-Vivas *et al.*, 1983). Es en ésta última mixobacteria en donde se han llevado a cabo la mayoría de los estudios sobre autólisis vegetativa.

La composición del medio de cultivo influye poderosamente sobre la autólisis; en general, todos los factores que permiten alcanzar más rápidamente altas densidades celulares, hacen que los cultivos entren más tempranamente en fase de autólisis (Arias y Montoya, 1982). Por el contrario, aquellos que influyen

negativamente sobre el crecimiento, retrasan el comienzo de la autólisis (Benhamú *et al.*, 1979).

Estos hechos fueron explicados en base a un posible fenómeno de cooperativismo celular; para que se disparara la autólisis era necesario que los cultivos superaran un nivel crítico de densidad celular y el proceso era más rápido cuanto mayor era la concentración de células alcanzada. Para explicar el mecanismo por el que se llevaría a cabo dicho fenómeno de cooperativismo celular, se encontraron evidencias de que la autólisis es disparada por un factor activador que es liberado al medio durante la fase de crecimiento exponencial y que cuando alcanza una concentración crítica activa las enzimas autolíticas (Arias *et al.*, 1983). De otra parte, el fosfato inorgánico tiene una marcada influencia sobre la autólisis; así, concentraciones de orfosfato de 40 mM inhiben totalmente el proceso (Fernández-Vivas *et al.*, 1983).

Se ha conseguido inducir la lisis mediante el tratamiento de los cultivos en fase de crecimiento exponencial con antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas o de ARN y con agentes desacopladores de la fosforilación oxidativa; resultados que implican que la estabilidad celular está condicionada por una o varias proteínas y que la autólisis está estrechamente relacionada con el estado energético de la membrana (Fernández-Vivas *et al.*, 1985). No se ha encontrado relación entre la concentración de nucleótidos hiperfosforilados y el proceso de autólisis (Fernández-Vivas *et al.*, 1983).

Por otro lado, *M. coralloides* D produce un antibiótico activo frente a bacterias gram positivas (Arias *et al.*, 1979 a, b y c). El antibiótico se produce durante la fase de crecimiento exponencial, alcanzando la máxima concentración al final de la misma y, posteriormente, se dispara el proceso autolítico. Montoya y colaboradores en 1988, encuentran que el antibiótico es la señal desencadenante de la autoólisis de los cultivos dispersos de *M. coralloides* D, cuando alcanza la concentración crítica de 19 µg/ml. Ello coincide con lo propuesto por Arias y colaboradores de 1983, en el sentido de la

existencia de un factor soluble, activador de la autólisis, que sería producido por la propia bacteria. Ello también concuerda con el hecho de que concentraciones elevadas de ortofosfatos que inhiben la autólisis de los cultivos, antes mencionado, inhiben también el desencadenamiento de la misma por el antibiótico (González *et al.*, 1990).

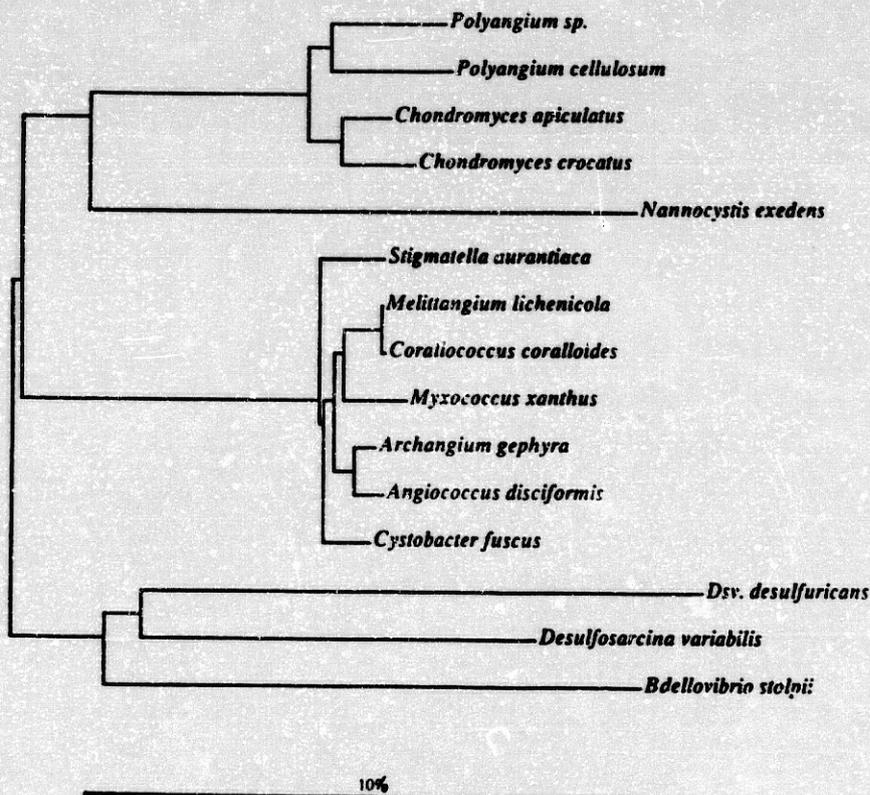
En cuanto al mecanismo por el que el antibiótico, llamado *coralloisina*, desencadena la citada autólisis, sería una consecuencia de la detención de la síntesis de ARN y proteínas (Montoya *et al.*, 1994), lo cual concuerda con lo descrito previamente por Fernández-Vivas y colaboradores (1985).

Filogenia y edad de las mixobacterias

La manera de investigar la filogenia de cualquier organismo sería hacer una comparación de los genes del ARNr, los cuales son los que más firmemente se han conservado en las células a lo largo del proceso evolutivo; ello es perfectamente aplicable al caso de las mixobacterias. El catálogo de oligonucleótidos (Ludwing *et al.*, 1983) y de secuencias (Shimkets y Woese, 1992) de las moléculas del ARN 16S de una variedad de mixobacterias revelan que todas ellas están estrechamente relacionadas y que pueden ser divididas en tres subgrupos diferentes, uno de los cuales incluye una sola especie, *Nannocystis excedens* (Shimkets, 1993). Características estructurales secundarias específicas del ARN 16S también definen estos subgrupos (Shimkets y Woese, 1992).

Por otro lado, otras características diferencian y apoyan este subagrupamiento. Los miembros del subgrupo en donde están encuadradas las especies de *Myxococcus* son células largas, delgadas, que cambian su forma considerablemente durante la formación de mixósporas (Reichenbach y Dworkin, 1991; McCurdy, 1989). Sus colonias absorben el colorante rojo congo. Estas células tienden a contener cetocarotenos monocíclicos con pigmentación rojiza (Reichenbach y Kleining, 1984),

ácidos grasos 2 y 3-hidroxi, y producir antibióticos de diferentes estructuras químicas a diferencia de los otros dos subgrupos (Reichenbach *et al.*, 1988). Además, son las únicas bacterias que se mueven en oleadas (Reichenbach, 1986). En los miembros de los otros dos subgrupos, que incluyen a *Chondromyces* y *Nannocystis*, las células son mucho más cortas y sufren pocos cambios morfológicos durante la formación de mixósporas; sus colonias no absorben el rojo congo, ni tampoco se mueven en oleadas.



[Árbol filogenético de las mixobacterias de acuerdo con Shimkets, 1993]

Existen también diferencias sustanciales en la química de los pigmentos y metabolitos secundarios entre el grupo de *Nannocystis* y los miembros del subgrupo de *Chondromyces*. Los carotenoides glucosilados de *Chondromyces* carecen de los grupo ceto encontrados en los carotenos glucosilados de los miembros del subgrupo

de *Myxococcus*, mientras que *Nannocystis* forma compuestos aromáticos monocíclicos que son exclusivos de estas especies (Reichenbach y Kleining, 1984). Además, las especies de *Nannocystis* son las únicas que sintetizan esteroides y escualeno (Kohl *et al.*, 1983).

Aunque la clasificación taxonómica basada en las secuencias del ARN 16S se encuentra actualmente en un estado de flujo permanente y puede cambiar en un futuro, las distancias filogenéticas entre estos tres subgrupos mixobacterianos encuentran una base sólida para que a cada subgrupo le corresponda la categoría de familia (Shimkets y Woese, 1992)

Los estudios del ARN 16S sugieren que las mixobacterias se encuentran directamente relacionadas con *Bdellovibrio* y las bacterias reductoras del azufre y de sulfatos, que juntas constituyen el subgrupo de las bacterias púrpuras, como fue comentado al principio de esta introducción (Fowler *et al.*, 1986; Oyaizu y Woese, 1985; Shimkets y Woese, 1992).

El subgrupo delta de las bacterias púrpuras es extremadamente amplio ya que engloba a un conjunto de organismos fisiológicamente muy diversos sin ninguna característica fenotípica en común. Las bacterias reductoras del azufre y sulfatos son organismos anaerobios estrictos, heterótrofos, capaces de oxidar una variedad de compuestos orgánicos como donadores de electrones y de reducir el azufre y el sulfato. *Bdellovibrio* incluye bacterias gram negativas, aerobias estrictas, de muy pequeño tamaño, con forma de vibrio y parásitas de otras bacterias gram negativas, en las que penetran y se anclan en el espacio periplásmico, desde donde destruyen a la célula que han parasitado. Las mixobacterias son aerobias estrictas, que se mueven por desizamiento y bajo condiciones adecuadas forman unas estructuras macroscópicas, conocidas como cuerpos fructificantes.

La comparación de secuencias del ARN 5S también avalan una relación filogenética entre las mixobacterias y *D. vulgaris* bacteria sulfato reductora (Van den

Eynde, *et al.*, 1990). Estos resultados sugieren que las mixobacterias y las especies de *Bdellovibrio* son descendientes aerobios de una bacteria ancestral reductora del azufre o sulfato (Woese, 1987).

Aunque el grado de evolución del ARN 16S no es el mismo para todas las líneas evolutivas, la estimación del grado promedio de cambio puede ser usada como una aproximación para las edades de los grupos bacterianos. La molécula de ARN 16S parece adquirir sustituciones de nucleótidos a razón de un 1% por cada 50 millones de años (Ochman y Wilson, 1987).

De acuerdo con ello, la edad mínima de las mixobacterias puede ser estimada a partir del momento en que los tres subgrupos de mixobacterias comienzan a separarse entre sí. Estos cálculos no tienen en cuenta *Nannocystis* que debió presentar un ritmo bastante acelerado en comparación a otras mixobacterias (Shimkets y Woese, 1992). El antepasado común de los subgrupos de mixobacterias debió tener una divergencia en la secuencia de nucleótidos de un 13% aproximadamente, lo que corresponde a un tiempo de divergencia de 650 millones de años. La edad máxima de las mixobacterias puede ser estimada a partir del momento en que las mixobacterias se separan de otras bacterias relacionadas, como las bacterias reductoras del azufre y sulfato, lo cual corresponde a un tiempo de divergencia de 800 millones de años.

Por lo que respecta al subgrupo delta, la edad mínima a partir de la rama más antigua dentro del subgrupo (Devereux *et al.*, 1989), puede corresponder a un tiempo de divergencia de 750 millones de años. La edad máxima para el subgrupo delta puede ser estimada a partir del 22% de divergencia en las secuencias entre *E. coli* y las bacterias sulfatorreductoras (Devereux *et al.*, 1989), lo que corresponde a un tiempo de divergencia de aproximadamente 1100 millones de años.

La sustitución de nucleótidos en el ARN 5S puede ser igualmente usada para calcular la edad de las mixobacterias, aunque hay muy pocas secuencias 5S con las

que hacer comparaciones, particularmente con las bacterias sulfato reductoras. El ARN 5S parece acumular sustituciones de nucleótidos dos veces más rápido que el ARN 16S, a razón de divergencia de un 1% por cada 25 millones de años (Ochman y Wilson, 1987). El antepasado común de las mixobacterias debió tener una disparidad de nucleótidos de un 26% aproximadamente entre los miembros de los subgrupos de mixobacterias (Van den Eynde *et al.*, 1990), para un tiempo mínimo de divergencia de 650 millones de años. El ancestral común de las mixobacterias y *D. vulgaris* es un 30% de diferencia, para un tiempo máximo de divergencia de 750 millones de años. La máxima edad del subgrupo delta en total, parece ser de 1070 millones de años a juzgar por un 42% de diferencia entre el antepasado común y los miembros del grupo.

Resumiendo, estos resultados sugieren que las mixobacterias tienen una edad de 650 a 800 millones de años y que el subgrupo delta puede rondar entre 750 y 1100 millones. Puesto que no se ha descubierto ninguna mixobacteria anaerobia o reductora del sulfato, la mixobacteria ancestral probablemente adquirió un sistema de respiración aerobio durante este periodo de tiempo. Esto parece estar de acuerdo con la aparición de altas tensiones de oxígeno capaces de soportar el crecimiento aeróbico. El origen de la fotosíntesis oxigénica por cianobacterias hace 2800 millones de años fué la primera etapa en la evolución de una forma aerobia (Schopf *et al.*, 1983). El oxígeno alcanzó el 1% de los niveles actuales hace aproximadamente 1700 millones de años y luego se acumuló lentamente hasta los niveles actuales. Los microorganismos aerobios comenzaron a aparecer hace 1700 millones de años y posteriormente empezaron a extenderse en múltiples formas.

Las mixobacterias presentan un tamaño de genomio bastante más alto que otros miembros del subgrupo delta, lo que sugiere que la expansión del tamaño del genomio acompañó en la evolución de las mixobacterias. La replicación de un genomio tan grande pudo suponer sobre la célula un incremento en la carga metabólica que habría sido compensado por un cambio desde una respiración anaerobia a una respiración aerobia más favorable bioenergéticamente. La naturaleza

de las fuerzas que acompañaron la evolución del genomio con la evolución del desarrollo de las mixobacterias no está del todo aclarada (Shimkets, 1993)

Un paso primitivo hacia formas de vida multicelulares

Las primeras formas de vida terrestre se desarrollaron hace 3500 millones de años en condiciones anaeróbicas (Schopf, 1978). Las formas de vida pluricelulares más antiguas tienen 700 millones de años (Glaesner, 1976). Según estos datos parece claro que, la mayor parte del tiempo, la vida en la Tierra ha sido unicelular y no eucariota.

Las mixobacterias pueden representar uno de los primeros intentos evolutivos hacia las formas de vida multicelulares. Todas las mixobacterias conocidas viven en agregados multicelulares y están muy relacionadas por su composición de G+C y sus secuencias de ARNr 16S. Todas son aeróbicas.

Como ya ha sido comentado en esta introducción las bacterias reductoras del azufre y del sulfato y *Bdellovibrio* son las eubacterias más próximas a las mixobacterias. Estas eubacterias no viven en típicos agregados multicelulares, por tanto debemos pensar que la multicelularidad surgió después de que las mixobacterias y las eubacterias más próximas divergieran, pero antes de que los tres subgrupos de mixobacterias se separaran en su evolución.

Parece ser que las mixobacterias pueden haberse separado de las formas bacterianas más primitivas hace unos 1100 millones de años, es decir, en el mismo momento en que la atmósfera se transformó en aerobia. Recientes datos fósiles apoyan esta edad para las formas más primitivas de las mixobacterias (Lanier, 1987).

Podemos pensar que la forma de agregado multicelular de las mixobacterias existió antes que cualquier eucariota multicelular. Este origen tan primitivo es

consistente con muchas de las propiedades de las mixobacterias, por ejemplo, su alimentación cooperativa puede haber sido una ventaja selectiva en su evolución hacia las formas multicelulares. De hecho, sus presas más comunes, otras bacterias, han existido antes que cualquier célula eucariota. De otra parte, las mixobacterias son ubicuas de suelos de todo el mundo.

La semejanza entre las mixobacterias y los hongos mixomicetos son un ejemplo de evolución convergente en dos tipos de organismos que ocupan el mismo nicho ecológico (Kaiser, 1986). Esta evolución convergente sugiere que las diferencias estructurales y funcionales entre células procariotas y eucariotas han sido secundarias ante las semejanzas del metabolismo y las limitaciones de la función y estructura proteica para proporcionar la respuesta de estos organismos ante fuerzas de selección semejantes.

Ecología

A pesar de su apariencia, un tanto exótica, y de su complejo ciclo de desarrollo, las mixobacterias son microorganismos muy comunes. En rangos de pH entre 5 y 8 y en condiciones de aireación, prácticamente todos los suelos del mundo, sin reparar en el clima, presentan alguna mixobacteria. Su distribución ha sido estudiada muy ampliamente (Krzemienievska y Krzemieniewski, 1927 a y b; Noren, 1952; Sabados-Sarié, 1957; Jeffers, 1964; Rückert, 1979; Dawid, 1979).

Si bien son básicamente microorganismos del suelo, también son capaces de colonizar otros hábitats, especialmente aquellas zonas ricas en comunidades microbianas como es la rizosfera de las plantas (Agnihotrudu *et al.*, 1959), los excrementos de herbívoros, madera y materia orgánica en descomposición (Peterson, 1959). Algunas especies parece que se han especializado en nichos particulares como ocurre en el caso del género *Haploangium*, el cual sólo ha sido observado en cortezas de árboles en descomposición; no se ha podido cultivar y no se conoce si es un organismo celulolítico (Reichenbach, 1993).

Procedentes del suelo, las mixobacterias son fácilmente lavadas por el agua y procedentes de las mixósporas de los cuerpos fructificantes, pueden vivir y multiplicarse (Jeffers, 1964; Gráf, 1975; Hook, 1977). Aparentemente las mixobacterias no se han adaptado a ningún medio marino.

Una especie, *Poliangium parasiticum* ha sido descrita como un parásito obligatorio de las algas verdes del género *Cladophora* (Geittler, 1925).

Su tendencia al agrupamiento hace muy difícil determinar su número en su medio ambiente. Sabados-Sarié (1957) ha estimado que los suelos ricos contienen 8×10^4 células/gr, Singh (1947) ha mostrado el mismo número en el suelo y más de 5×10^5 células/gr en compuestos en descomposición.

En muchos estudios sólo el número de diferentes especies existentes en ciertos suelos ha sido documentado. Probablemente el número de células citado anteriormente subestima el número real. Un cuerpo fructificante contiene entre 10^3 y 10^6 mixósporas (Reinchenbach, 1993).

Los estudios de algunas especies dan una idea sobre la distribución en distintas zonas climáticas. Particularmente las grandes poblaciones de mixobacterias se han observado en climas cálidos, semiáridos y áridos; en estos climas la resistencia de las mixósporas a la desecación les da una fuerte ventaja en la selección (Singh y Singh, 1971; Brockman, 1976; Rückert, 1978).

También se ha encontrado una microflora rica en climas tropicales (Krzemieniewska y Krzemieniewski, 1930; Kühlwein, 1960; McCurdy, 1969a; Dawid, 1978). En estos casos, sin embargo, la pobre calidad del suelo, por ejemplo su pH ácido, puede ser limitante.

En climas fríos y en ambientes subárticos y árticos, incluidas las altas montañas, el espectro de las especies se vuelve uniforme consistiendo

particularmente en *Myxococcus* y *Corallococcus*, si bien su abundancia también es alta (Kühlwein, 1960; Brockman y Boyd, 1963; Rückert, 1973).

Hay otras diferencias curiosas en la distribución de las especies, de este modo, *S. aurantiaca* es un microorganismo muy común en la zona climática de Norte América donde ha sido regularmente encontrada en la corteza de los árboles en descomposición (McCurdy 1969a; Reichenbach y Dworkin, 1969), mientras que en Europa sólo se ha documentado un caso a partir del suelo (Dawid, 1979).

Chondromyces crocatus parece ser un microorganismo omnipresente en la rizosfera de la India (Agnihotrudu *et al.*, 1959), mientras que en 20 años de aislamiento a partir de muestras de suelos de todo el mundo se ha obtenido únicamente de una muestra de suelo recogida en Madeira lo que hace pensar que algunas especies están adaptadas a nichos especiales.

Algunas mixobacterias como *Myxococcus*, *Corallococcus sp.* y *N. excedens* son aparentemente muy flexibles con respecto a los hábitats que pueden poblar. Quizás con la excepción de los climas fríos, *N. excedens* es la más común de todas las mixobacterias a pesar de no ser nunca mencionada en los estudios sobre la ecología de estas.

Muchas mixobacterias son sensibles al NaCl como ocurre en el caso de *M. virescens* (Rückert 1978b) mientras que algunas cepas de *N. excedens* son capaces de crecer razonablemente bien en presencia de un 0,8% de sales.

Algunas mixobacterias han sido aisladas a partir de excrementos, principalmente de animales herbívoros; de hecho la fuente clásica de las mixobacterias son los excrementos de los conejos, y, por tanto hace mucho tiempo que se cree que estos microorganismos dependen de ciertos factores contenidos en estos sustratos complejos. Todas las mixobacterias encontradas en los excrementos son fácilmente aisladas a partir del suelo y pueden crecer fácilmente en los medios

estándar que contienen peptona y extractos de células.

De lo expuesto anteriormente se deduce el enorme atractivo de las mixobacterias en muy diversos campos. Entre los procariotas son los más complejos, tanto estructuralmente como en comportamiento social, pudiendo representar una de los primeros intentos evolutivos, como se indicó en el apartado anterior, hacia formas multicelulares.

BIOMINERALIZACIÓN

Expresado de una manera simple el término biomineralización indica el proceso mediante el cual los seres vivos convierten iones en solución en minerales sólidos. A esta definición incompleta debemos añadir que esta conversión es el resultado de las actividades celulares que hacen posibles los cambios físico-químicos necesarios para la formación del mineral y el crecimiento de los cristales. El resultado final es claramente evidente pues un gran número de microorganismos, animales y plantas forman una gran variedad de minerales. Algunos están finamente esculpidos mientras que otros impresionan por su aspecto macizo, pero, en cualquier caso, la mayoría están íntimamente relacionados con funciones muy específicas de los seres vivos que inducen su formación (Simkiss y Wilbur, 1989).

El tema de la biomineralización es tan variado como la gama de organismos que forman estructuras mineralizadas y se encuentra relacionado con una gran variedad de disciplinas.

La biomineralización ocupa un lugar muy importante en los estudios biológicos y médicos de los organismos que han desarrollado esqueletos mineralizados y está obviamente relacionada con los procesos intra y extracelulares que ocurren tanto en estados normales como patológicos.

También está estrechamente relacionada con la Paleontología, de hecho la mayoría de las clases de minerales de los esqueletos de seres vivos aparecieron repentinamente en el Cámbrico y, desde entonces, sólo los corales, algunas algas y los vertebrados han desarrollado nuevos esqueletos en el hábitat marino (Simkiss y Wilbur, 1989).

Por otro lado, existe cierta relación con la actividad oceanográfica debido a que la conversión de iones del medio externo en sedimentos minerales, por parte de los organismos vivos, influirá en la química de los océanos y de las aguas dulces (Simkiss y Wilbur, 1989).

Los estudios sobre biomineralización tomaron gran auge en los años 60 y 70 debido fundamentalmente al aumento de la disponibilidad y uso de los microscopios electrónicos de transmisión y de barrido, que han suministrado abundante información sobre la ultraestructura de los materiales mineralizados de animales, plantas y microorganismos (Lowenstan, 1981).

Una segunda razón para este auge procede de los estudios bioquímicos y físico-químicos sobre el transporte en las membranas y los análisis de materia orgánica asociada con la materia de los esqueletos. Ambas aproximaciones encajan directamente con las crecientes ideas de la biología molecular y han recibido un impulso añadido a partir del uso de los radioisótopos y de la comprensión de la biología molecular (Simkiss y Wilbur, 1989).

Visiones generales de varias áreas de la investigación de la biomineralización se encuentran en simposios de los últimos 20 años (Watabe y Wilbur, 1976; Omori y Watabe, 1980; Simpson y Volcani, 1981; Nancollas, 1982; Westbroek y de Jong, 1983; Leadbeater y Riding, 1986), y en los textos de Simkiss y Wilbur (1989), Lowenstan y Weiner (1989) y Ehrlich (1990).

Clases de biominerales y organismos que los forman

Los minerales de origen biológico conocidos sobrepasan en la actualidad el número de 60, (Lowenstam y Weiner, 1983; Lowenstam, 1981; Wilson y Jones, 1984; Jones y Wilson, 1986), lo que supone un gran aumento sobre los descritos por Lowenstam en 1963.

De los biominerales descritos en 1983, la mayoría continen calcio como principal catión seguidos por los que contienen hierro (Lowenstam y Weiner, 1983; Mann, 1983).

Si se agrupan en función de los aniones, los más abundantes son los fosfatos seguidos por los óxidos y los carbonatos (Lowenstam y Weiner, 1983; Mann, 1983).

Aproximadamente el 25% de los biominerales están hidratados y otro 25% son amorfos. Esto puede ser un hecho importante si consideramos los mecanismos de formación mineral (Mann, 1983).

Los organismos con capacidad de formar minerales están presentes en todos los grupos, desde las bacterias a los cordados, si bien existe una disparidad manifiesta entre los distintos taxones en cuanto a la formación de minerales (Mann, 1983)

Los minerales de calcio y silicio son con mucho los más comunes en cuanto a su distribución en los organismos. Por otro lado los sulfatos y ciertos óxidos sólo se han encontrado, hasta ahora, precipitados por bacterias. Los oxalatos y los fosfatos tienen una distribución más amplia y los polimorfos de carbonato cálcico, calcita y aragonito, son los que presentan mayor distribución (Mann, 1983).

Funciones biológicas de los minerales

La deposición mineral juega un importante papel en la formación de los esqueletos siendo esta función evidente en los organismos unicelulares, así como en muchos phylla de invertebrados. Los principales minerales componentes de los esqueletos son CaCO_3 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y silicatos (Mann, 1988). Además del papel normal en la formación de los esqueletos, la inclusión de depósitos metálicos parece ser que modifica las propiedades físicas de un gran número de tejidos. Los esqueletos más fuertes y ligeros de fosfatos y carbonatos son, por lo general, compuestos bien ordenados de polímeros orgánicos entremezclados con la fase mineral. En otros casos el componente mineral es menos preciso; así, algunos poliquetos tienen mandíbulas reforzadas por depósitos de Ca y Zn, de una composición incierta (Bryan y Gibbs, 1980).

Una segunda función de los depósitos biominerales es que actúan como sistema de almacenamiento a partir del cual los iones pueden ser reutilizados durante periodos de especial demanda fisiológica. Esto ocurre durante la amortiguación de los líquidos corporales bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, en el momento de la reparación del esqueleto, cuando la mineralización del esqueleto tiene lugar siguiendo la muda y en épocas de reproducción y formación de la cáscara del huevo (Simkiss y Wilbur, 1989).

Claramente los depósitos minerales no sólo están disponibles para el organismo sino que pueden ser movilizadas ante una gran variedad de estímulos (Simkiss y Wilbur, 1989).

Dentro de los organismos multicelulares la capacidad para la mineralización depende en primer lugar de los tejidos específicos y no directamente del organismo en sí. Esta especificidad es clara pero vale la pena enfatizarla puesto que llama la atención acerca de las diferencias celulares que indican si la mineralización ocurrirá o no.

La especificidad celular está bellamente ilustrada por aquellos organismos en los cuales un mineral es depositado por células en una región, mientras que un tipo de mineral diferente se forma simultáneamente por células en otra parte del mismo organismo. Un ejemplo familiar es el depósito de CaCO_3 en el caparazón de un molusco por el epitelio del manto mientras la magnetita y la sílice son depositados por el epitelio que forma los dientes de la rádula (Lowenstam, 1962; Funham *et al.*, 1969).

El sistema puede ser aún más sutil ya que puede ocurrir que las mismas células puedan formar alternadamente depósitos de diferentes orientaciones cristalinas como ocurre en la secreción de los caparazones lamelares cruzados de algunos moluscos (Simkiss y Wilbur, 1989).

Se puede concluir, pues, que los fenómenos implicados en los depósitos minerales varían claramente, tanto por lo que se refiere a las células que se ven implicadas, como por lo que se refiere a los productos que originan.

Principios generales de Biomineralización

Todos los sistemas celulares tienen tres propiedades comunes:

1.- Constan, en su mayor parte, de proteínas disueltas en una solución salina e incluídas dentro de membranas lipídicas.

2.- Por razones osmóticas y otras más sutiles la composición de las sales difiere entre la parte interna y la externa de las membranas lipídicas.

3.- Para mantener una estabilidad osmótica las células transportan activamente iones a través de las membranas.

Entre los cationes divalentes el magnesio se acumula intracelularmente mientras que el calcio es expulsado a través de la membrana celular. Los iones

HCO_3^- y PO_4^{3-} se mueven a menudo también a través de estas membranas celulares y actúan como los principales amortiguadores inorgánicos de las células (Simkiss y Wilbur, 1989).

En muchos organismos la forma soluble de los silicatos Si(OH)_4 es transportada hacia fuera por procesos metabólicos asociados a la membrana. Así pues los principales componentes de los minerales que se forman por actividad de los seres vivos están implicados en la biología normal de la célula y comparten las propiedades de ser disponibles, escasamente solubles y no tóxicos en el estado sólido (Simkiss y Wilbur, 1989).

Hay que imaginar poco para darse cuenta de que, dadas estas propiedades, la selección natural favorecería pronto esas combinaciones que producen una variedad de productos mineralizados, si estas suponen alguna ventaja para la supervivencia.

El transporte de iones por la membrana y la formación de soluciones supersaturadas, los efectos de las proteínas y los polisacáridos en la formación y crecimiento de cristales y el acotamiento de un espacio por las superficies de membrana son los procesos fundamentales asociados con la mayoría de las formas de biomineralización (Simkiss y Wilbur, 1989).

Los procesos básicos para la biomineralización residen, sin embargo, dentro de la mayoría de las células y es interesante observar su gran variedad de expresión ya que los procesos son tan variados que han permitido que la biomineralización pueda contemplarse como algo tremendamente interesante para su estudio (Simkiss y Wilbur, 1989).

En resumen, por tanto, aparece que determinados organismos de un grupo taxonómico dado pueden depositar determinados biominerales y otros no (Simkiss y Wilbur, 1989).

Los depósitos pueden ser considerados como un poco más que paredes celulares rígidas o bien pueden ser esqueletos altamente resistentes. Dentro de un organismo biomineralizado el proceso de mineralización se restringe a tejidos u órganos específicos.

Aquí hay dos clases de especificidad, una que se relaciona con el control del tipo de mineral depositado y la otra con el metabolismo del tejido u órgano que ocasiona el depósito mineral y explota sus propiedades.

Los sistemas que determinan estas dos clases de especificidad son desconocidos, pero a partir de estudios del mecanismo empleado por varios grupos biológicos se pueden considerar dos aspectos de biomineralización (Simkiss y Wilbur, 1989), estos son:

1.- Si los mecanismos necesarios para formar un simple tipo mineral son similares o no en los diferentes taxones.

2.- Si los tipos de diferentes minerales son depositados y usados o no por sistemas con propiedades comunes.

Depósitos minerales

El punto de partida para el depósito de cristales es la supersaturación de un fluido con la subsiguiente nucleación y crecimiento de un mineral específico dentro de él.

La composición detallada en iones y el contenido orgánico e inorgánico del medio en el que los cristales se forman es bastante compleja y, en un grado considerable, desconocida excepto en vacuolas de plantas (Simkiss y Wilbur, 1989).

Los mecanismos básicos de la formación de los cristales en sistemas simples

están tan bien caracterizados que se pueden aplicar con gran confianza.

La biomineralización depende del producto iónico de los iones que forman el mineral de manera que un aumento del anión o del catión puede implicar el inicio de la biomineralización (Clark, 1948). Por otro lado para que se forme un mineral tiene que existir una concentración de iones que excedan el producto de solubilidad (Clark, 1948).

La participación de los microorganismos en los procesos de biomineralización es un hecho conocido y probado experimentalmente. Entre los compuestos descritos como resultado de la biomineralización se pueden citar, entre otros, los siguientes:

Carbonato cálcico, CaCO_3 , tanto en forma de calcita (Shinano, 1972; Boquet *et al.*, 1973; Doetsch y Cook, 1973; Ramos-Cormenzana, 1975; Aguilar *et al.*, 1978; Morita, 1980) como de aragonito (Black, 1933; Oppenheimer, 1961; Greenfield, 1963; Mc Callum y Guhathakurta, 1970; Krumbein, 1974; Billy, 1980).

Estroncionita, SrCO_3 (Ramos-Cormenzana, 1975).

Dolomita, CaMgCO_3 (Rivadeneira *et al.*, 1986).

Estruvita, $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Robinson, 1889; Beavon y Heatley, 1962).

Fosfato cálcico, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Hutchison, 1961).

Apatito, $\text{Ca}_5(\text{F,OH})(\text{PO}_4)_3$ (Ennever *et al.*, 1974 b).

Bobierita, $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (Rivadeneira *et al.*, 1987).

Algunos autores como Ramos-Cormenzana afirman que al modificar adecuadamente las condiciones del medio de cultivo pueden formarse otros

compuestos que aún no han sido considerados.

Diversos investigadores aceptan el papel de los microorganismos en la biomineralización en hábitats naturales, si bien existen ciertas controversias sobre la intervención bacteriana en dichos fenómenos naturales. Dichas controversias pueden quedar totalmente descartadas a favor de la actividad bacteriana si observamos que la formación de estruvita se realiza en zonas ricas en materia orgánica de origen animal, guanos, estiércol etc... De hecho los yacimientos naturales de dicho mineral se relacionan con depósitos de guano (por ello también llamado Guanita), por ejemplo, en las cuevas de Skipton, cerca de Ballarat en Australia; además en las tierras pantanosas (minas de abonos) de Hamburgo y Braunschweig (Klockmann-Randohr, 1961).

Algunos autores afirman que los microorganismos tienen una actividad geológica que fue importante para la deposición de minerales en el pasado (Kusnetzov *et al.*, 1962).

La formación de depósitos de azufre elemental en condiciones marinas se relaciona con la actividad de las bacterias del azufre (Kusnetzov, 1963) e igualmente se puede afirmar referido a los depósitos de azufre en diversos ambientes naturales (Domka y Gasiowek, 1975; Trudinger, 1976).

La actividad bacteriana puede relacionarse con la génesis de los depósitos de calcita, yeso, azufre etc... (Doetsch y Cook, 1973). Según ellos la formación de depósitos minerales como consecuencia de fenómenos de biomineralización puede realizarse bien de manera directa o bien de manera indirecta.

I.- Mecanismos directos serían :

a) Mineralización superficial de microorganismos muertos.

b) Procesos de óxido-reducción provocados por la actividad metabólica bacteriana que conducen a la formación de compuestos insolubles.

II.- Mecanismos indirectos serían:

a) La formación de productos insolubles puede deberse a la intervención de productos finales del metabolismo bacteriano en reacciones químicas secundarias.

b) La precipitación de determinados compuestos podría deberse a alteraciones del pH.

La formación de calizas está relacionada con las alteraciones del pH o con las modificaciones en la concentración de iones HCO_3^- que se encuentran en disolución, consecuencias ambas de la actividad bacteriana (Brock, 1973).

Las variaciones de pH en los ambientes naturales son consecuencia de la actividad bacteriana y estos cambios de pH actúan sobre los procesos de precipitación de los carbonatos que están relacionados principalmente con los cambios experimentados por la concentración de iones H^+ (Stainer *et al.*, 1984).

Se ha encontrado relación entre la descomposición bacteriana de materia orgánica y la precipitación de CaCO_3 (Chilingar *et al.*, 1967).

Formación de CaCO_3 por bacterias

La formación de CaCO_3 es uno de los procesos biogeoquímicos de mayor relevancia. Este compuesto se presenta como Calcita o como Aragonito, la primera es típica de los sedimentos de aguas dulces mientras que el segundo lo es de sedimentos marinos (Mc Callum y Guhathakurta, 1970).

Depósitos de CaCO_3 de gran importancia se localizan en los sedimentos

marinos de la zona de Bahamas en las costas de Florida (Estados Unidos). Estos depósitos, para algunos investigadores, son debidos a procesos físicos o químicos, mientras que otros piensan en la implicación del metabolismo bacteriano en su formación. Entre los partidarios de esta segunda opción podemos citar a Drew (1911 y 1913) que indica que las bacterias desnitrificantes eran las causantes de la deposición de CaCO_3 en los sedimentos de la gran Bahama. A partir de estos sedimentos aisló una bacteria desnitrificante, *Bacterium calcis*, y demostró que era capaz de precipitar carbonatos en medios de cultivo artificiales provistos de KNO_3 y una sal orgánica de calcio. A partir de estos estudios concluye que las bacterias desnitrificantes eran las responsables de los depósitos de CaCO_3 en ambientes marinos al aumentar el pH del agua de mar provista de KNO_3 , siendo este compuesto indispensable.

En 1963, Greenfield obtuvo aragonito inoculando un medio artificial de agua de mar con una bacteria aislada de las costas de Florida. Sugiere que los microorganismos son capaces de absorber cantidades considerables de Ca^{2+} y de Mg^{2+} durante su metabolismo o bien adsorberlos en la superficie de células muertas. Esto podría indicar que dichos microorganismos servirían como núcleos de cristalización de los cristales de aragonito. Según él, la fuente de carbono sería el CO_2 desprendido en el metabolismo bacteriano, y el amoníaco, producido también metabólicamente, elevaría el pH hasta un valor de 8,0. Además al disolver los cristales con HCl diluido observó que el núcleo de estos lo ocupaba una bacteria muerta.

Por otra parte, Krumbein (1974) observa que el Aragonito prefiere a la célula como lugar inicial de cristalización, ya que al disolver los agregados cristalinos solo quedaban células muertas y materia orgánica amorfa.

Posteriormente, al realizar estudios de cristalogénesis bacteriana, Adolphe y Marechal (1980), apuntan que la formación de CaCO_3 no se debe a la agrupación de minerales alrededor de la célula bacteriana, sino que el crecimiento del cristal refleja

el crecimiento bacteriano.

En 1980 Morita sugiere que las bacterias actúan como núcleos de cristalización sobre los que se produciría posteriormente una precipitación abiológica, en la que pueden intervenir los microorganismos al provocar cambios en el medio (alteración del pH, producción de CO_2 etc..) como consecuencia de su actividad metabólica.

Novitsky (1981) rebate estas afirmaciones y afirma que la precipitación activa de CaCO_3 por bacterias marinas nunca ha sido demostrada.

Rivadeneira *et al.* (1985c) estudian la influencia de la temperatura en la formación bacteriana de CaCO_3 y afirman que influye directamente por la acción que ejerce sobre el metabolismo bacteriano.

Los mismos autores (1985b) indican que la presencia de iones PO_4^{3-} en el medio ejerce un efecto inhibitor sobre la precipitación de carbonato.

Formación de fosfatos por bacterias

El fósforo se presenta fundamentalmente en la naturaleza en forma de fosfato, soluble e insoluble.

Los fosfatos insolubles se presentan comunmente como apatito ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F,Cl,OH})$), donde el radical libre puede estar representado por F, Cl u OH o por combinación de ellos. También se presenta como sales de Ca, Al, Fe y Mg.

El apatito se encuentra en ambientes marinos mientras que las sales de Ca, Al, Fe y Mg son frecuentes en suelos y sedimentos.

Hutchison (1961), encontró que una cepa de *Staphylococcus aureus* precipitaba fosfato cálcico en diferentes medios de cultivo sólidos y sugirió que la

el crecimiento bacteriano.

En 1980 Morita sugiere que las bacterias actúan como núcleos de cristalización sobre los que se produciría posteriormente una precipitación abiológica, en la que pueden intervenir los microorganismos al provocar cambios en el medio (alteración del pH, producción de CO_2 etc..) como consecuencia de su actividad metabólica.

Novitsky (1981) rebate estas afirmaciones y afirma que la precipitación activa de CaCO_3 por bacterias marinas nunca ha sido demostrada.

Rivadeneira *et al.* (1985c) estudian la influencia de la temperatura en la formación bacteriana de CaCO_3 y afirman que influye directamente por la acción que ejerce sobre el metabolismo bacteriano.

Los mismos autores (1985b) indican que la presencia de iones PO_4^{3-} en el medio ejerce un efecto inhibitorio sobre la precipitación de carbonato.

Formación de fosfatos por bacterias

El fósforo se presenta fundamentalmente en la naturaleza en forma de fosfato, soluble e insoluble.

Los fosfatos insolubles se presentan comúnmente como apatito ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F,Cl,OH})$), donde el radical libre puede estar representado por F, Cl u OH o por combinación de ellos. También se presenta como sales de Ca, Al, Fe y Mg.

El apatito se encuentra en ambientes marinos mientras que las sales de Ca, Al, Fe y Mg son frecuentes en suelos y sedimentos.

Hutchison (1961), encontró que una cepa de *Staphylococcus aureus* precipitaba fosfato cálcico en diferentes medios de cultivo sólidos y sugirió que la

cristalización estaba relacionada con una elevación del pH. Piensa que se establece una diferencia entre el centro de la colonia y el medio circundante de forma que al difundir los iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} desde el medio a la colonia precipitarían por efecto del pH; por esta razón los cristales se forman intracolonialemente.

Ennever *et al.* (1974 a) Relacionan los fosfolípidos con la formación de apatito "in vitro", y dicen que actúan como productos intermediarios de la precipitación. Esta última afirmación puede guardar relación, en el caso de *M. coralloides* D, con el hecho de que los microorganismos pertenecientes al género *Myxococcus* presenten más cantidad de fosfolípidos en la membrana externa que otras bacterias Gram negativas, Ondorff y Dworkin (1980).

Precipitación de estruvita por bacterias

La estruvita es el fosfato magnésico mayoritario asociado con actividad biológica en ambientes naturales. Boggild (1911) lo encontró en sedimentos marinos ricos en materia orgánica. También se ha observado en suelos de cementerios, de establos y en depósitos de guano, todos ellos lugares ricos en materia orgánica, suelos que, por otra parte, son adecuados para el crecimiento y desarrollo de las *Myxobacterias*.

Algunos autores opinan que la formación de estruvita es un proceso químico común ya que esta se forma cuando los iones magnesio, amonio y fosfato se encuentran en solución, Palache *et al.* (1951).

Hands Schuh y Orgel (1973b) afirman que al adicionar fosfatos al agua de mar, si esta contiene más de 0,01 M de iones NH_4^+ , se produce precipitación de estruvita. Sugieren que su precipitación puede deberse a un simple proceso de evaporación ocurrido en épocas pasadas.

La precipitación bacteriana de estruvita es conocida desde que Robinson la

describió en 1889 al observar su formación por una cepa a la que llamó bacteria pútrida fluorescens. También encontró producción de cristales de estruvita en cultivos puros de *Bacillus*, de un hongo y de una levadura. Robinson propuso que dicho mineral es consecuencia de la liberación al medio por los microorganismos de iones NH_4^+ , ya que este mineral es consecuencia de la combinación de dichos iones con el fosfato de magnesio existente en dicho medio de cultivo. Robinson asocia este fenómeno con la aparición de estruvita en la naturaleza.

En medios líquidos y sólidos *S. aureus* produce estruvita y esta precipitación se debe a un aumento de la concentración de NH_3 en el medio de cultivo (Beavon y Heatley, 1962). Estos mismos autores investigaron la influencia de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} en la formación de estruvita. Según ellos la adición de Mg^{2+} al medio de cultivo tenía como consecuencia la aparición de cristales de mayor tamaño y más numerosos mientras que la adición de Ca^{2+} tiene un efecto inhibitor en la formación de dichos cristales, llegándose incluso a impedir su formación cuando la concentración de esta ión es alta.

En 1975 Shinano y Sakai estudian el efecto de la concentración de iones magnesio en la precipitación de carbonatos por *Pseudomonas calci-precipitans* y obtienen estruvita al elevar la concentración de Mg^{2+} respecto a la de Ca^{2+} .

Cuando se alcaliniza el medio de cultivo por adición de vapores de NH_3 se observa la formación de estruvita, pero cuando esa alcalinización se efectuaba por adición de trietilamina dicha precipitación no se producía por lo que se deduce que los iones NH_4^+ son esenciales para la precipitación de dicho compuesto cristalino (Beavon y Heatley, 1962).

Estos autores también realizaron estudios con otras especies bacterianas y también encontraron precipitación de estruvita para el caso de *Pseudomonas*, *Proteus* y *E. coli*.

En 1970 Malone y Towe obtuvieron precipitación de estruvita a partir de cultivos bacterianos de agua de mar sometidos a distinta aireación, observando que la aireación influía de forma positiva sobre la precipitación de estruvita.

Rivadeneira *et al.* en 1983 estudiaron la precipitación de estruvita por 96 cepas bacterianas del suelo encontrando solo cuatro cepas que eran buenas formadoras de dicho mineral y, además, que los iones Ca^{2+} dificultan e inhiben la formación de estruvita y que se produce un desprendimiento de iones NH_4^+ , tanto en las cepas buenas formadoras como en las que no lo eran lo que induce a pensar que además de dichos iones deben existir otros factores implicados en la formación de estruvita.

Ferron Vilchez *et al.* en 1984 investigan la producción de estruvita por 71 cepas aisladas del agua dulce y relacionan la producción con el medio de cultivo utilizado.

En 1984 Postgate obtuvo cristales de estruvita de un cultivo de *Desulfovibrio*.

Lucas y Prevot, en 1984 y 1985, obtienen precipitación de estruvita en medios marinos y lo atribuyen a la actividad bacteriana.

Rivadeneira *et al.* (1985a), al estudiar la producción de estruvita por *Azotobacter*, observaron que solo se produce si se adiciona amonio al medio de cultivo y sugieren que la cantidad de estruvita depende de la cantidad de amonio existente en dicho medio de cultivo.

En 1989, los mismos autores, estudian la producción de estruvita por *Yersinia* y encuentran que se produce una óptima precipitación cuando se cultivan entre 25°C y 37°C.

En 1988, Adroher *et al.* describen la formación de estruvita por *Trypanosoma cruzi* y también la relacionan con la producción de NH_4^+ por el microorganismo.

En 1988, Pérez-García *et al.* estudian la producción de estruvita por distintos géneros de bacterias, concluyendo lo siguiente: La precipitación de estruvita es mejor si se adiciona al medio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La precipitación se favorece si se adiciona al medio fosfato bipotásico a concentración de 2 g/l. El pH idóneo es 7.5. Las temperaturas óptimas son inferiores a 30°C.

OBJETIVOS

De acuerdo con estos antecedentes y dado que en nuestro laboratorio se venía observando la aparición de cristales, durante experiencias de mantenimiento y conservación de ciertas razas de *M. coralloides* D, nos animamos a aislarlos y caracterizarlos. Para profundizar en el estudio de los mismos se marcaron los siguientes objetivos.

A.- Estudios sobre la producción de cristales por *M. coralloides* D.

1.- Investigación de los componentes inorgánicos del medio para la formación de cristales, estudiando para ello los parámetros siguientes:

- Concentración idónea de Fosfato.
- Fuente de magnesio.
- Relación óptima de $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$.

2.- Investigación de la influencia de factores físico-químicos sobre la precipitación de los cristales, tales como:

- Efecto del pH.
- Modalidad de cultivo, producción en medios líquidos estáticos y en agitación y en medios sólidos.

B.- Aislamiento, purificación y caracterización de los cristales.

1.- Aislamiento y purificación de los cristales obtenidos en diferentes medios de cultivo y condiciones experimentales ensayadas.

2.- Caracterización de los cristales purificados empleando para ello diversas

técnicas microanalíticas como son.

- Difracción de Rayos-X.
- Microscopía electrónica de barrido.
- Microanálisis EDX
- Microscopía electrónica de transmisión.

C.- Estudio de la influencia bacteriana en la precipitación de estruvita

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

1.- Microorganismo

La cepa utilizada en la presente Tesis Doctoral ha sido *Myxococcus coralloides* D (*Corallocooccus coralloides* según Reichenbach, 1981) obtenida, tras sucesivos pases en medios líquidos y capaz de crecer de manera dispersa, a partir de la raza silvestre, por Arias y Montoya (1978).

Esta cepa se caracteriza por presentar una rápida y pronunciada lisis al final de la fase exponencial de crecimiento, cuando es cultivada en medios líquidos.

2.- Medios de cultivo

2.1.- Medios de mantenimiento y conservación

2.1.1.- Medio Agar-Levadura

En este medio la mixobacteria utilizada fructifica muy bien, por lo que ha sido utilizado fundamentalmente para la conservación de *M. coralloides* D durante largos periodos de tiempo ya que en los cuerpos fructificantes se encuentran las mixósporas.

Su composición es la siguiente:

Levadura prensada de panadería	1%
Agar purificado (Merck)	2%
Agua destilada	
pH	7,2

Para su preparación, la levadura prensada se suspende, previamente, en una pequeña cantidad de agua destilada mediante la conveniente agitación, a fin de prevenir la formación de grumos. El pH se ajusta con una solución de NaOH en agua destilada al 10%.

2.1.2.- Medio CTA

Este medio, cuya composición se describe a continuación, también se ha usado para la conservación del microorganismo, aunque en él no se produce fructificación. A pesar de ello, el microorganismo se mantiene viable durante varias semanas. La siembra se efectuó con asa de platino en estría.

Su composición es la siguiente:

Bacto-Casitone (Difco)	1%
Agar purificado (Merck)	2%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1%,
en tampón fosfato potásico 10 mM a pH 7,2.	

2.1.3.- Medio CT

Este medio líquido, se ha usado para recrecimientos sucesivos del microorganismo durante periodos cortos de tiempo. Por esta razón sólo fue usado en este sentido para la realización de experiencias de corta duración.

Su composición es similar a la del medio CTA pero en él se ha prescindido del

agar, y en el cual el pH es 6,5.

El mantenimiento del crecimiento vegetativo de *M. coralloides* D se llevó a cabo mediante transferencias periódicas en este medio, dado que esta bacteria muestra una buena capacidad para crecer en medio líquido de forma dispersa.

2.1.4.- Glicerol

Para poder asegurar el mantenimiento y conservación de este microorganismo se procedió de la siguiente manera: células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento eran recogidas por centrifugación y resuspendidas en medio CT adicionado de glicerol al 50%, el cual induce la formación de mixósporas. Estas pueden ser mantenidas congeladas durante años a -80°C .

2.1.5.- Tierra estéril

Por último, el mantenimiento durante años también se consigue mediante su conservación en tierra estéril, para lo cual se esteriliza tierra rica en materia orgánica tamizada, a la que se adicionan 5 ml de cultivo de *M. coralloides* D de 50 horas por cada 20 g de tierra, dejando secar, posteriormente, por evaporación.

2.2.- Medios de crecimiento bacteriano y producción de cristales

Para la producción de cristales se han utilizado medios líquidos y sólidos, partiendo de la composición básica de los medios de cultivo universales usados para *M. coralloides* D, el medio CT, cuya composición se ha indicado en el apartado 2.1.3., y el medio TT, cuya composición se detalla más adelante, y en los que se han introducido variantes en cuanto a:

Distintos valores de pH.

Distintas concentraciones de fosfatos.

Distintas fuentes de magnesio.

Distintas relaciones fosfato/magnesio.

2.2.1.- Medios líquidos

Todos los medios descritos a continuación fueron utilizados en experimentos encaminados a la producción de cristales y, el medio CT también se utilizó, como se ha descrito en el apartado 2.1.3., para el mantenimiento del microorganismo.

Medio CT

Su composición ya ha sido descrita.

a) Variantes en cuanto al pH utilizado:

Medio CT-1 pH 6,0

Medio CT-2 pH 6,8

Medio CT-3 pH 7,2

Medio CT-4 pH 7,6

Medio CT-5 pH 8,0

b) Variantes en cuanto a la $[\text{PO}_4^{3-}]$ utilizada:

Medio CT-6 $[\text{PO}_4^{3-}]$ 5 mM

Medio CT-7 $[\text{PO}_4^{3-}]$ 20 mM

Medio CT-8 $[\text{PO}_4^{3-}]$ 30 mM

Medio CT-9 $[\text{PO}_4^{3-}]$ 50 mM

c) Variantes en cuanto a la fuente de magnesio utilizada:

Medio CT-10.-

De composición similar al medio CT en el que se ha sustituido el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 6,5.

Medio CT-11.-

De composición similar al medio CT en el que se ha sustituido el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por de $(\text{MgCO}_3)_4 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pH 6,5

Medio CT-12.-

De composición similar al medio CT en el que se ha sustituido el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por de $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{-COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pH 6,5.

Nota.- En todos los medios de los apartados 2.2.1 a, b y c, la $[\text{Mg}^{2+}]$ fue de 4,06 mM.

d) Variantes en cuanto a la relación $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$

Medio CT-13.-

En él la relación $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$ es 10mM/10mM.

Medio CT-14.-

En él la relación $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$ es 10mM/15mM.

Medio CT-15.-

En él la relación $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$ es 10mM/20mM.

Medio CT-16.-

En él la relación $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$ es 5mM/10mM.

Medio CT-17.-

En él la relación $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$ es 15mM/10mM.

Medio CT-18.-

En él la relación $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$ es 20mM/10mM.

En el medio CT, a partir del cual se han desarrollado todas las variantes de este apartado, la relación $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$ es 10 mM/4,06 mM.

Medio TT

Su composición es la misma que la del medio CT pero en este caso se sustituye el Bacto-Casitone (Difco) por una cantidad igual de Trypticase peptona (BBL).

a) Variantes en cuanto al valor de pH utilizado:

Medio TT-1	pH 6,0
Medio TT-2	pH 6,8
Medio TT-3	pH 7,2
Medio TT-4	pH 7,6
Medio TT-5	pH 8,0

b) Variantes en cuanto a la $[\text{PO}_4^{3-}]$ utilizada:

Medio TT-6	$[\text{PO}_4^{3-}]$ 5 mM
Medio TT-7	$[\text{PO}_4^{3-}]$ 20 mM
Medio TT-8	$[\text{PO}_4^{3-}]$ 30 mM
Medio TT-9	$[\text{PO}_4^{3-}]$ 50 mM

2.2.2.- Medios sólidos

Los medios descritos a continuación fueron utilizados en aquellos casos en los que se pretendía obtener crecimiento vegetativo de *M. coralloides* D así como en algunas experiencias destinadas a la obtención de cristales en medio sólido.

Medio CTA. Descrito anteriormente**Medio TTA**

Su composición es la misma que la del medio CTA pero en este caso se sustituye el Bacto-Casitone (Difco) por Trypticase peptona (BBL) en igual proporción.

3.- Técnicas de cultivo

3.1.- Condiciones de cultivo

Cabe resumir que se realizaron en medios sólidos y líquidos, y en estos últimos en reposo y en agitación. La incubación se realizó a 28°C y, en todos los casos, los cultivos se llevaron a cabo en aerobiosis.

Las condiciones de cultivo, y según los distintos experimentos a que iban destinados, se detallan a continuación:

3.1.1.- Cultivos en medios líquidos

a) Cultivos en agitación

a.1) En tubos de ensayo de 10 x 130 mm, con 3 ml de medio. La agitación se efectuó en agitador Certomat-R, Brawn, a 160 rpm.

La inoculación se efectuó con 0,1 ml de cultivo de 50 horas.

a.2) En matraces erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio. La agitación se efectuó en agitador New-Brunswick, a 220 rpm. La inoculación se hacía con 3,3 ml de cultivo de 50 horas.

b) Cultivos en reposo

Los cultivos en reposo se llevaron a cabo tanto en tubos de ensayo como en matraces, y la inoculación se efectuó de igual manera que en los casos de cultivos en agitación.

3.1.2.- Cultivos en medio sólido

Se llevaron a cabo en placas de Petri de 90 mm de diámetro adicionadas de

20 ml de los distintos medios de cultivo. Para la obtención de cristales la inoculación se hizo depositando, sobre la superficie del medio, gotas de 5 μ l de un cultivo de 50 horas en agitación.

3.1.3.- Cultivos con membranas de celofán

Las técnicas que se describen en este apartado son originales de este trabajo y se han desarrollado para la investigación presentada en esta memoria. Se han utilizado membranas de celofán (Sadipal), tanto en medios líquidos como en medios sólidos, que permiten la difusión de distintos iones y componentes del medio de cultivo, pero no de las células.

a) Líquidos

Se prepararon matraces erlenmeyer de 250 ml con 80 ml de medio de cultivo. Las bolsas de celofán eran preparadas aparte y en las que se introducían 20 ml del mismo medio que, una vez cerradas herméticamente, se depositaban en el matraz (véase Figura 2a). A continuación se llevaba a cabo la esterilización en autoclave de la forma habitual.

La inoculación se hacía con 3,3 ml de un cultivo de 50 horas, como en los casos descritos anteriormente. Esta técnica permitía el crecimiento de la bacteria en el medio de cultivo exterior a la bolsa de celofán, e impedía el desarrollo de la misma en su interior.

b) Sólidos

Con la misma finalidad, se puso a punto una técnica consistente en depositar sobre la superficie del medio de cultivo una lámina de celofán, de las mismas características que el mencionado para medios líquidos, previamente esterilizada, y efectuar la inoculación depositando gotas de 5 μ l de cultivo de 50 horas sobre la

superficie del celofán (véase Figura 2b).

Para determinar la variación del pH del medio al otro lado de la lámina de celofán, se introdujo una variante, consistente en adicionar un indicador de pH, el rojo fenol al 0,2% que se preparó de la siguiente forma: se disuelven 0,2 g de rojo fenol en 56,4 ml de una solución de NaOH 0,01 N y se completa hasta 100 ml con agua destilada. De la disolución resultante se añaden 6 ml por litro de medio de cultivo. El rojo fenol tiene la particularidad de virar del amarillo al rojo cuando el pH aumenta, para valores de pH comprendidos entre 6,8 y 8,4.

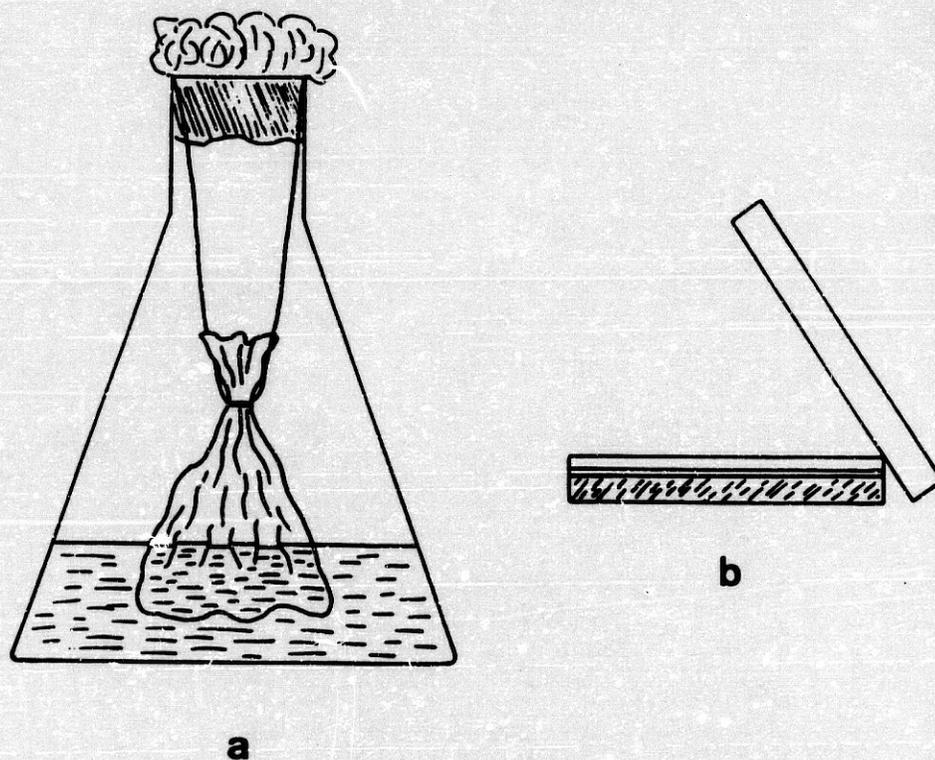


Figura 2.- Técnicas de cultivo utilizando membranas de celofán. a) medios líquidos. b) medios sólidos

3.2.- Medidas de crecimiento bacteriano

Se llevaron a cabo, a intervalos de tiempo variables según los distintos experimentos, determinándose medidas de tipo turbidimétrico, mediante la medida de los valores de absorción a 650 nm en un Spectronic 20 D. Las determinaciones se hicieron en cultivos líquidos en tubos de ensayo.

3.3.- Medidas de pH

Se efectuaron con un pHmetro Crison micro pH 2001.

4.- Técnicas de recuperación, aislamiento y purificación de los cristales

4.1.- Producidos en medios sólidos

Se cultivó *M. coralloides* D en placas de Petri adicionadas de los distintos medios de cultivo.

Se llevaron a cabo bajo dos formas distinta de cultivo:

La primera de ellas, inoculando directamente sobre el medio de cultivo, de manera que los cristales aparecían parcialmente incluidos en el medio y para su recuperación era necesario fundir dicho medio a 100°C durante 10 minutos. Una vez fundido, se procedía a realizar distintos lavados con agua destilada hasta que los cristales quedaban limpios de restos de medio, se colocaban en una placa de Petri que previamente se había tarado y se dejaban secar a temperatura ambiente hasta eliminar toda el agua. Posteriormente se volvía a pesar la placa y, por diferencia de pesadas se obtenía el peso de cristales producido por los cultivos correspondientes.

La segunda, en el caso de haber usado lámina de celofán sobre la superficie

del medio, daba como resultado que los cristales sólo se producían sobre la superficie del celofán, con lo cual la recuperación era más sencilla, pues bastaba con retirar la lámina de celofán y lavarla, en vaso de precipitados, con agua destilada, hasta que se desprendían los cristales. Estos, después se sometían a varios lavados con agua destilada para eliminar los restos bacterianos. Posteriormente se procedía igual que en el caso anterior.

4.2.- En medios líquidos

Cuando *M. coralloides* D era cultivado en medio líquido se seguía el siguiente método. Los tubos o matraces se decantaban para eliminar el medio de cultivo sobrante y los cristales se lavaban repetidas veces con agua destilada hasta que quedaban limpios. Se recogían posteriormente en placa de Petri y se seguía el mismo proceso que en el caso de los medios sólidos.

La recogida de los cristales se realizaba a los 10-12 días, en el caso de cultivos en agitación, y a los 20-22 días, en el caso de los cultivos en reposo.

5.- Identificación de los cristales

5.1.- Técnicas de Microscopía

5.1.1.- Microscopía óptica

Se utilizó un microscopio Leitz binocular.

También se utilizó una lupa binocular de la marca Wild Heerbrugg.

El equipo de fotografía utilizado también fue de la marca Wild Heerbrugg.

5.1.2.- Microscopía electrónica

a) Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido se utilizó con dos finalidades: realizar microanálisis por energía dispersiva de rayos X y observación de alta resolución.

Las muestras fueron vaporizadas con carbono y analizadas en un microscopio electrónico de barrido (Zeiss DSM-950) equipado con un sistema de microanálisis por energía dispersiva de rayos-X EDX (Link QX 2000). Las muestras fueron excitadas a 20 Kv y los espectros recogidos a través de ventana de Berilio.

Cuando se trataba de observar la morfología de los cristales, las muestras se metalizaron con oro, lo que permite la obtención de fotografías de más calidad.

b) Microscopía electrónica de transmisión

Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión EM 902 Zeiss de 80 Kv, dotado de equipo de difracción en las pruebas encaminadas a localizar los posibles puntos de inicio de la cristalización. Para ello se tomaron muestras de cultivos de *M. coralloides* D de 15, 30 y 45 horas, en las cuales aún no había comenzado la lisis y tampoco eran visibles los cristales. En cada caso se preparó una muestra sin diluir y otra diluida al 10% en agua destilada. Las muestras se sometieron a un proceso de incubación en rejillas de cobre de malla 300, recubiertas de una lámina de formvar. Una vez lavadas en agua destilada se les hizo una tinción negativa con acetato de uranilo al 1% durante 30 segundos y se procedió a su observación con TEM y a la realización de difracción de electrones.

5.2.- Análisis de Difracción de Rayos-X

Para la identificación de los cristales, las muestras fueron analizadas por

difracción de Rayos-X (DRX). Se ha utilizado un difractómetro Philips PW 1730, dotado de contador de centelleo y discriminador de altura de impulsos, operando bajo las siguientes condiciones: 35 Kv de tensión, 40 mA de intensidad, anticátodo de Cu, monocromador de grafito, curvatura de ventana de 1° y velocidad de exploración $2^\circ/\text{min}$, sensibilidad 10 y constante de tiempo 2. El estudio se ha realizado sobre muestra total aplicando el método de polvo, sobre portamuestras plano. Los diagramas se han rodado entre 2 y $65^\circ 2\theta$. Las muestras fueron molidas en mortero de ágata.

Sobre los difractogramas se realizó la identificación de las fases cristalinas presentes, de acuerdo con los patrones de referencia de los perfiles de difracción (McClune, 1989).

Apéndice.- Relación de impurezas reseñadas en distintos productos utilizados en la preparación de los medios de cultivo.

Fosfato potásico monobásico

N	0,005%
Cl	0,005%
S	0,01%
As	0,0001%
Ca	0,05%
Fe	0,003%
Pb	0,003%

Fosfato potásicodibásico.

N	0,001%
Cl	0,001%
S	0,005%
As	0,0001%
Ca	0%
Fe	0,001%
Pb	0,005%

Sulfato magnésico

Cl	0,005%
P	0,001%
NH ₄ ⁺	0,005%
As	0,0001%
Ca	0,01%
Cu	0,002%
Fe	0,001%
Ni	0,002%
Pb	0,002%

Acetato magnésico

Cl	0,005%
P	0%
NH ₄ ⁺	0%
As	0,0003%
Ca	0,05%
Cu	0%
Fe	0,001%
Ni	0%
Pb	0,001%
N	0,001%
S	0,01%
Ba	0,005%
Mn	0,005%
K	0,05%
Na	0,1%

Carbonato magnésico

Cl	0,05%
P	0,005%
NH ₄ ⁺	0%
As	0%
Ca	0%
Cu	0,01%
Fe	0%
Ni	0,01%
Pb	0,01%
N	0%
S	0,1%

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- Producción de cristales por *Myxococcus coralloides* D en los medios de cultivo habituales de esta bacteria

En estos experimentos, que se pueden considerar como introductorios al trabajo desarrollado en esta memoria, se investigó la producción de cristales en los medios usados habitualmente para el crecimiento de esta bacteria. Así, se ensayó la producción en medios líquidos CT y TT y sólidos CTA y TTA.

Los cultivos líquidos se llevaron a cabo en agitación y reposo, en matraces erlenmeyer de 250 ml y los sólidos en placas de Petri. La incubación se realizó a 28°C.

En todos los casos se detectó producción de cristales, que eran incoloros y transparentes, y cuya aparición se observaba, a simple vista, a los 4 o 5 días de incubación en los medios sólidos, y a partir de la lisis de los cultivos en los medios líquidos. En caso de cultivos en agitación pueden ser visibles a partir de las 70 horas, y en el caso de cultivos estacionarios su aparición se retarda hasta, al menos, 10 días. Estos cristales eran insolubles en agua y solubles en HCl diluido (HCl al 10%).

La recogida y purificación se llevó a cabo como se describe en el apartado 4 de Material y Métodos. Esto llevó consigo que, en el caso de los cristales producidos en medios sólidos, al ser calentados a 100°C durante 10 minutos, para fundir el agar, los cristales se volvieran opacos.

En todos los casos los cristales se estudiaron para caracterizarlos, utilizándose, según se describió en el apartado 5 de Material y Métodos, las siguientes técnicas:

Microscopía óptica.

Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDX).

Difracción de rayos X.

Los resultados de las pruebas de microanálisis y difracción de rayos-X se dan en el apartado 3 de esta sección de Resultados. Como se verá allí se trataba de estruvita, y los cristales producidos en medios sólidos, como consecuencia del proceso de extracción, se amorfizaron.

En los medios sólidos ensayados, CTA y TTA, los cristales se observan (Figura 3), fundamentalmente, en la parte superior del medio de cultivo, parcialmente incluidos en el agar y más o menos cubiertos del cultivo bacteriano. Además, la casi totalidad de ellos aparecen en el área cubierta por la gota depositada. Como puede verse en las figuras 3a y 3b, la morfología es diferente dependiendo de que se utilice, como fuente de carbono y nitrógeno, Bacto-Casitone en el caso del medio CTA o Tripticasa peptona en el del medio TTA. En los medios líquidos también se puede observar diferente morfología en los cristales producidos en medios CT y TT (Figura 4) y según se hayan obtenido en agitación o en reposo.

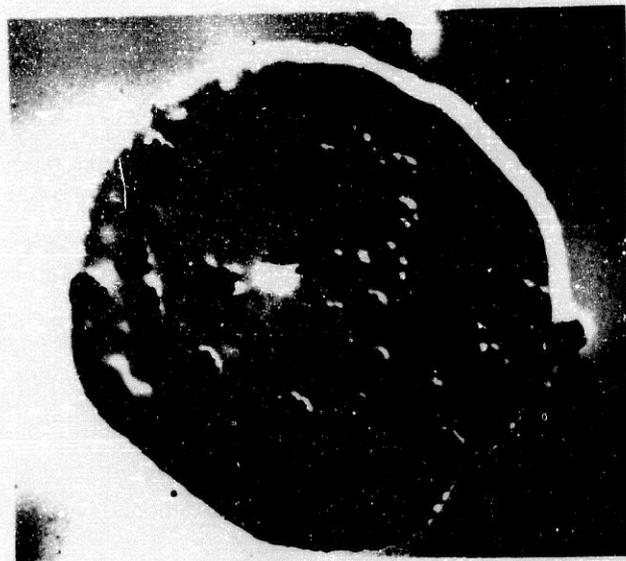
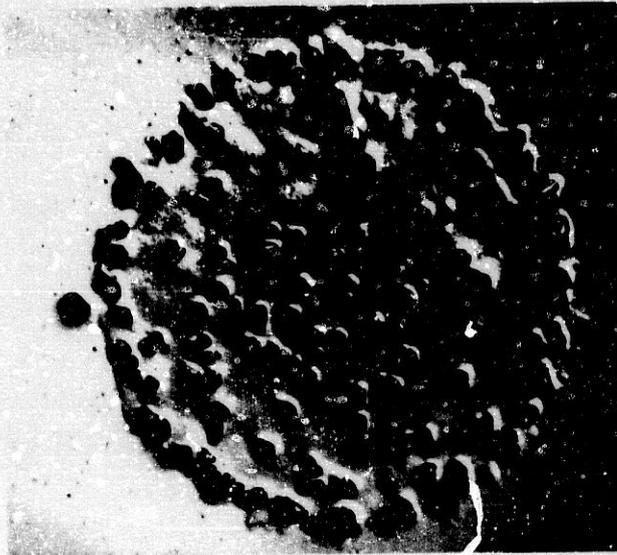


Figura 3.- Cristales producidos en medios sólidos. a) En medio CTA. b) En medio TTA. (amplificación x 17,6). Puede observarse que los cristales aparecen en el área cubierta por el crecimiento bacteriano.

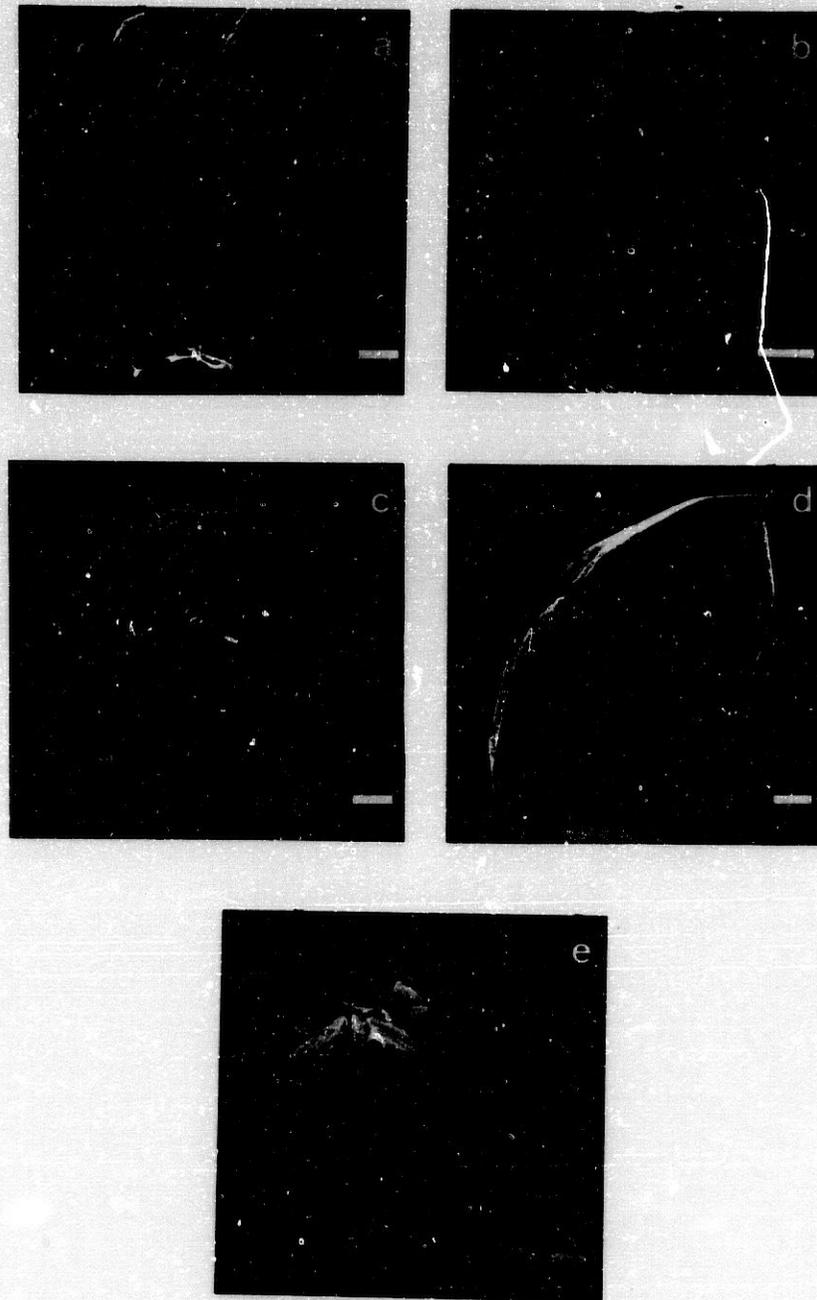


Figura 4.- Cristales producidos en medios líquidos según se observan con SEM (ZEISS, DSM 950). a) En medio TT con agitación. b) y c) En medio TT sin agitación. d) En medio CT sin agitación. e) En medio CT con agitación. Barras: a: 20 μm ; c, e: 50 μm ; b, d: 100 μm .

A la vista de estos resultados y, en concreto, el hecho de la amorfización de los cristales provenientes de medios sólidos debido al proceso de extracción, para los estudios posteriores, se decidió utilizar medios líquidos.

En los apartados siguientes se estudiará la influencia de las condiciones culturales y otros aspectos en la producción de cristales de estruvita por *M. coralloides* D.

2.- Influencia de las condiciones culturales en la producción de cristales por *M. coralloides* D

Para el desarrollo de las experiencias reseñadas en este capítulo se utilizaron, en paralelo, tubos de ensayo y matraces erlenmeyer. Los cultivos en tubos tenían como objeto de llevar a cabo las medidas de densidad óptica encaminadas a obtener las curvas de crecimiento en agitación, y los cultivos matraces para la posible obtención de cristales, en agitación y reposo, salvo los casos que se indican más adelante y como se ha descrito en el apartado 3 de Material y Métodos.

En todos los casos, la inculación se hacía a partir de un cultivo de *M. coralloides* D de 50 horas, utilizando como inóculo 0,1 ml en el caso de los tubos y 3,3 ml en el caso de los matraces. Los datos obtenidos corresponden a la media de, al menos, cinco medidas. También en todos los experimentos reseñados se llevaron, en paralelo, controles sin inocular.

En este apartado se dan los resultados de la influencia de las condiciones culturales ensayadas sobre el crecimiento y la producción cuantitativa de cristales. Los estudios cualitativos de los mismos se dan en el apartado 3 de esta sección de Resultados.

2.1.- Influencia del pH

Para llevar a cabo este estudio se escogieron los medios CT y TT, ambos con una concentración de fosfatos de 10 mM, que es la molaridad habitual de los medios de cultivo de esta bacteria.

Las variantes de pH ensayadas fueron 6,0; 6,5; 6,8; 7,2; 7,6 y 8,0, tanto en los medios variantes del medio CT como en los variantes del medio TT. Para ello se cultivó *M. coralloides* D en los medios CT, CT-1, CT-2, CT-3, CT-4 y CT-5, por un lado y en los medios TT, TT-1, TT-2, TT-3, TT-4 y TT-5 por otro. Se obtuvieron las curvas de crecimiento de *M. coralloides* D y se realizó un estudio cualitativo y cuantitativo de los cristales producidos. Las curvas de crecimiento obtenidas se dan en las figuras 5 y 6.

Como puede verse, para el crecimiento de esta bacteria los medios más idóneos son el medio CT, en el caso de los medios con Bacto-Casitone, y el medio TT en el de los medios con Tripticasa peptona. En ambos el pH inicial es 6,5. La lisis se retarda en aquellos medios en los que el pH inicial es mayor y además se observa menor crecimiento bacteriano cuando nos alejamos de los valores próximos a pH 6,5; de manera que a pH de 8,0 el microorganismo apenas crece.

En cuanto a la cantidad de cristales producidos, también coincide, que las condiciones de cultivo que propician una mayor producción se dan en el medio CT.

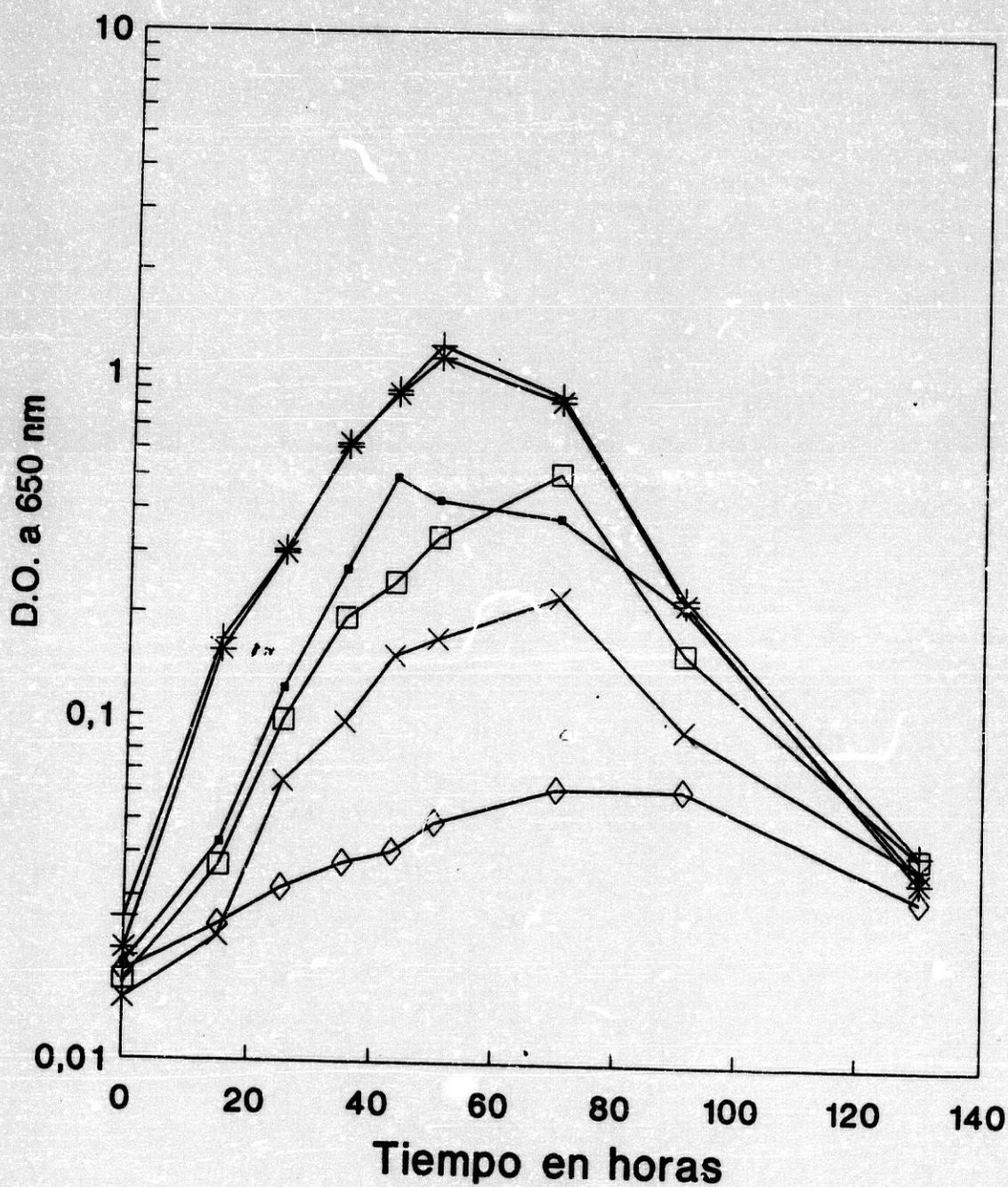


Figura 5. Curvas de crecimiento de *Myxococcus coralloides* D en los medios CT pH 6,5 (+), pH 6,0 (=), pH 6,8 (+), pH 7,2 (□), pH 7,6 (x) y pH 8,0 (◇).

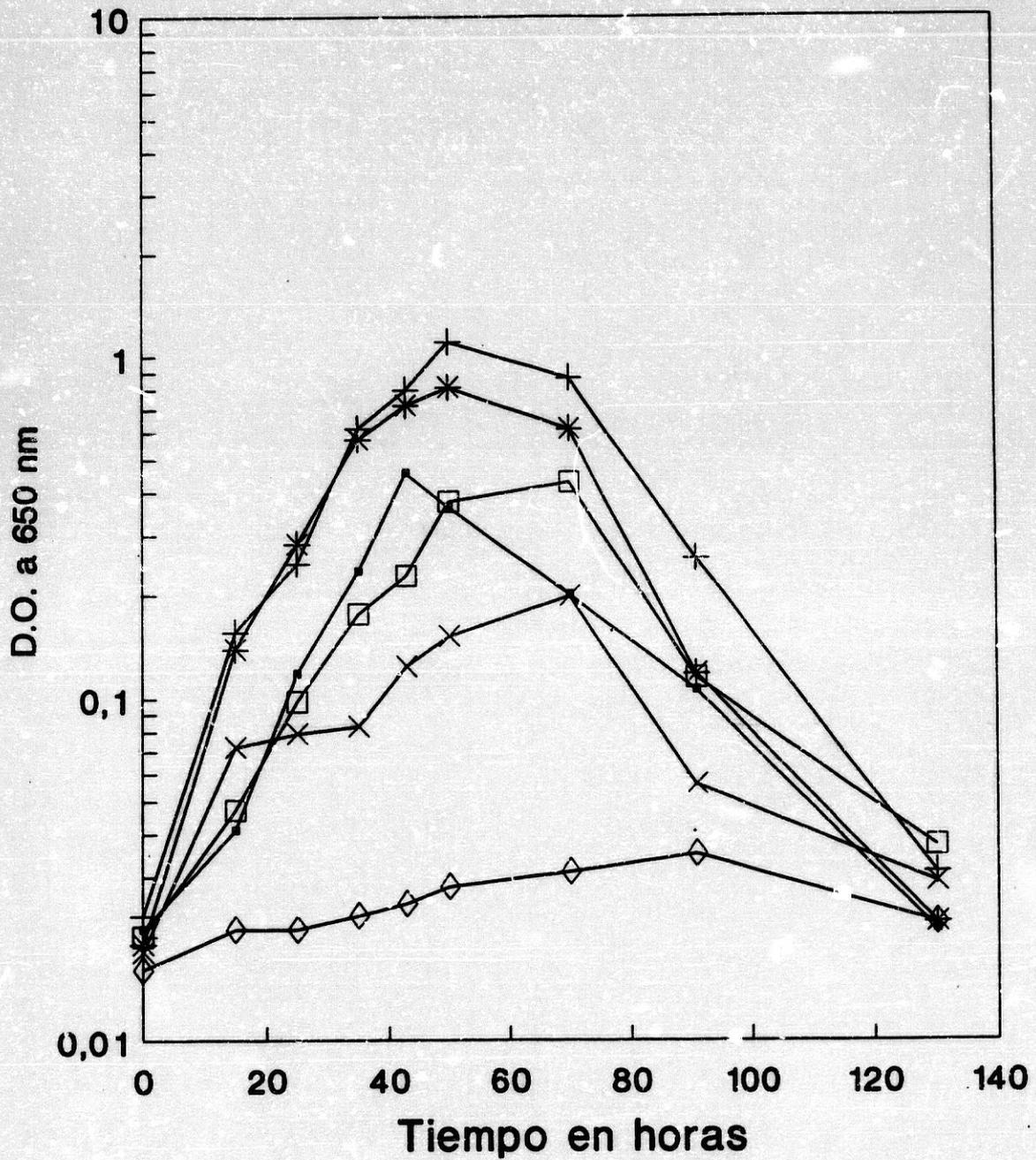


Figura c.- Curvas de crecimiento de *Myxococcus coralloides* D en los medios TT pH 6,5 (+), pH 6,0 (■), pH 6,8 (*), pH 7,2 (□), pH 7,6 (x) y pH 8,0 (◇).

En la Tabla 1, se dan los datos más relevantes para la comparación del comportamiento del microorganismo a los distintos valores de pH ensayados.

Medios	pH inicial	pH final	Máxima D.O. 650 nm	Inicio de lisis	g cristales/ 100 ml
CT-1	6,0	8,0	0,498	43 h	0,08
CT	6,5	8,6	1,217	50 h	0,120
CT-2	6,8	8,6	1,120	50 h	0,10
CT-3	7,2	8,0	0,520	70 h	0,08
CT-4	7,6	7,6	0,228	70 h	0,04
CT-5	8,0	8,0	0,063	91 h	trazas
TT-1	6,0	7,2	0,456	43 h	0,07
TT	6,5	8,8	1,103	50 h	0,11
TT-2	6,8	8,6	0,814	50 h	0,098
TT-3	7,2	7,8	0,429	70 h	0,07
TT-4	7,6	7,7	0,198	70 h	0,03
TT-5	8,0	8,0	0,035	91 h	trazas

Tabla 1.- Resumen de los resultados obtenidos en medios de cultivo en los que varía el pH inicial. En las diferentes columnas se muestran la variación de pH, el máximo crecimiento alcanzado, el comienzo de la lisis y la cantidad de cristales obtenidos. En todos los casos la $[PO_4^{3-}]$ era 10 mM.

Como puede observarse, en todos los medios ensayados se produjo una alcalinización, pues las medidas de los valores de pH tomadas después de la lisis así

lo mostraban, siendo dicha alcalinización más acusada en aquellos medios de cultivo en los que el pH inicial era más ácido, particularmente en los medios con pH 6,5.

Comparando los resultados obtenidos en los medios con Bacto-Casitone con aquellos otros obtenidos en los medios con Tripticasa peptona se puede observar que en los primeros se produce un mayor crecimiento. En los tubos sin inocular, empleados como control comparativo, no se observó la aparición de cristales.

2.2.- Influencia de la concentración de fosfato

Se han ensayado medios de cultivo con concentraciones de fosfato que van de 5 mM hasta 50 mM. Los medios utilizados fueron CT, CT-6, CT-7, CT-8 y CT-9 en los que la fuente de carbono y nitrógeno era Bacto-Casitone y TT, TT-6, TT-7, TT-8 y TT-9 en los que dicha fuente era Tripticasa peptona. Las curvas de crecimiento se dan en las figuras 7 y 8.

Como puede observarse, en cuanto al crecimiento, las condiciones óptimas se obtienen a concentraciones de fosfatos de 10 mM, tanto en aquellos medios que llevan Bacto-Casitone como en aquellos otros que van adicionados de Tripticasa peptona.

La lisis se adelanta en aquellos cultivos con concentraciones de fosfato menores de 10 mM y se retarda en aquellos otros con concentraciones superiores. Además, dicha lisis es más lenta cuanto mayor es la concentración inicial de fosfatos, y la cuantificación indica que las mejores cantidades de cristales se obtienen en los medios en los que el crecimiento fue mayor, y que coincidían con aquellos que tenían una concentración de fosfatos de 10 mM.

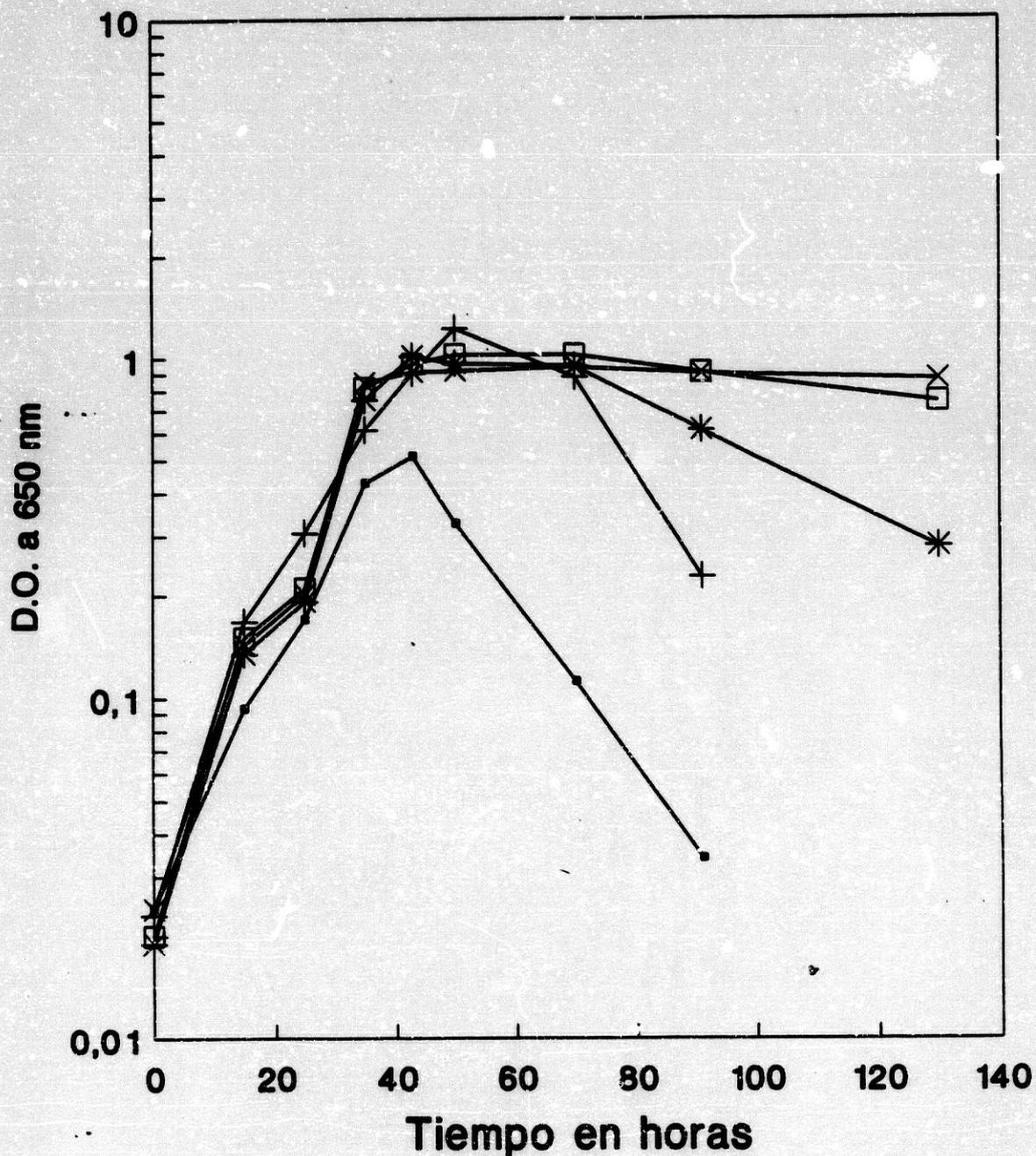
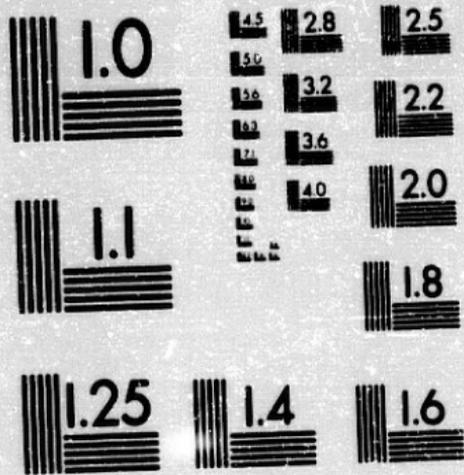
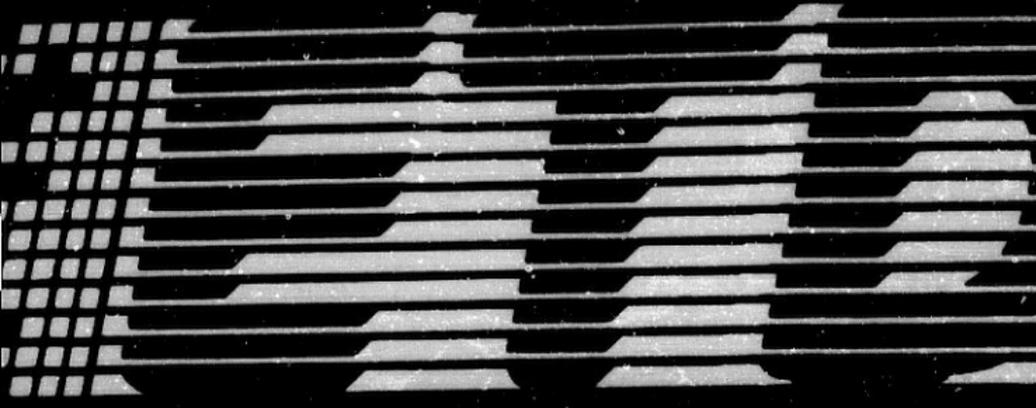
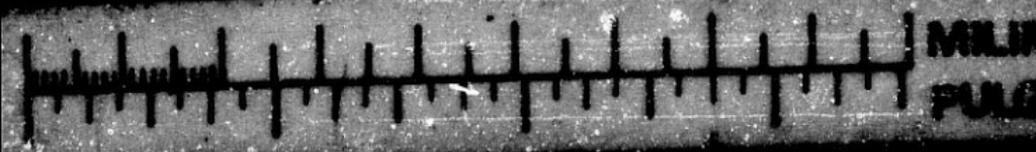


Figura 7.- Curvas de crecimiento de *Myxococcus coralloides* D en los medios CT 10 mM (+); CT-6, 5 mM (■); CT-7, 20 mM (*); CT-8, 30 mM (□) y CT-9, 50 mM (x).



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

1:24



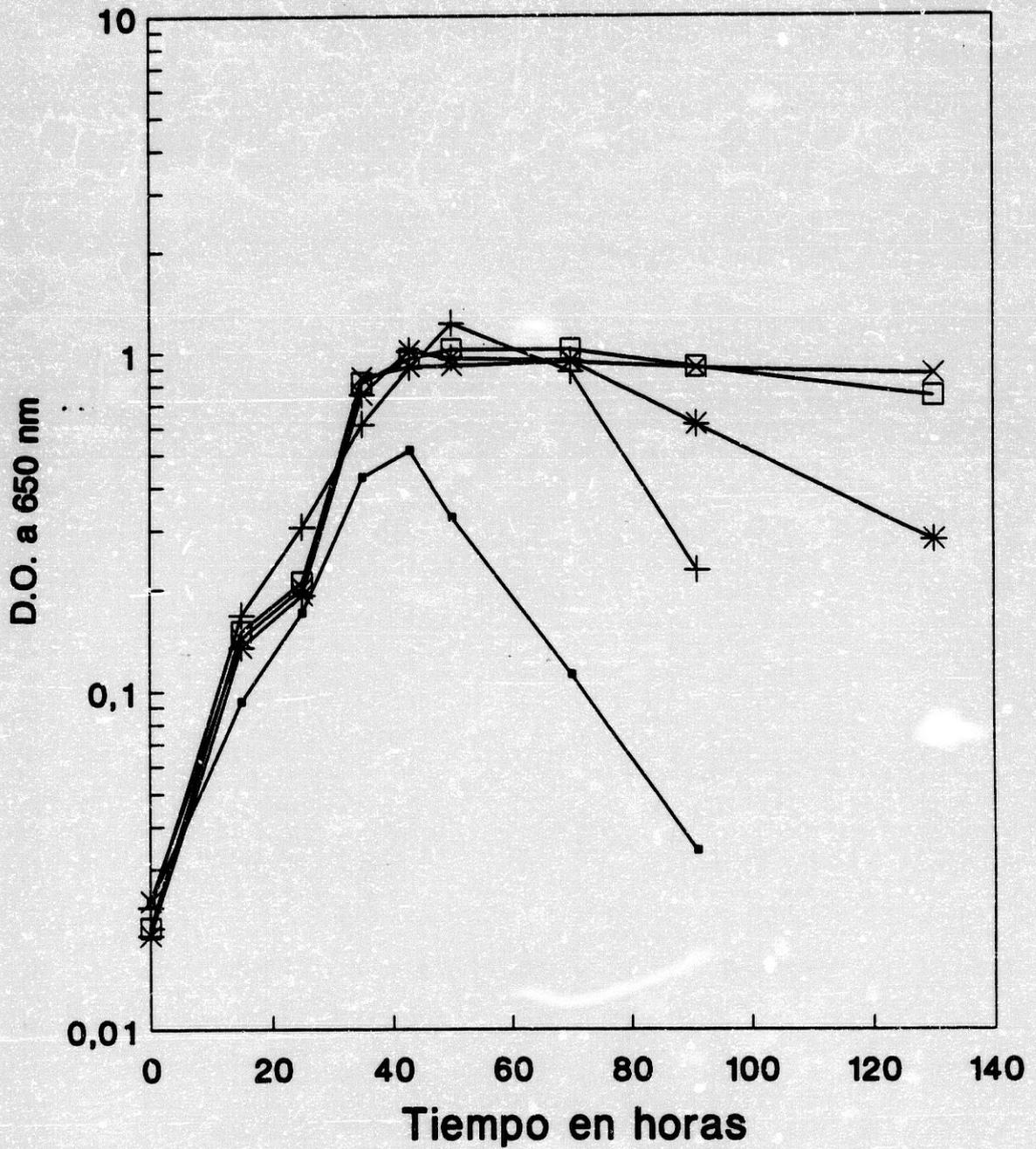


Figura 7.- Curvas de crecimiento de *Myxococcus coralloides* D en los medios CT 10 mM (+); CT-6, 5 mM (■); CT-7, 20 mM (*); CT-8, 30 mM (□) y CT-9, 50 mM (x).

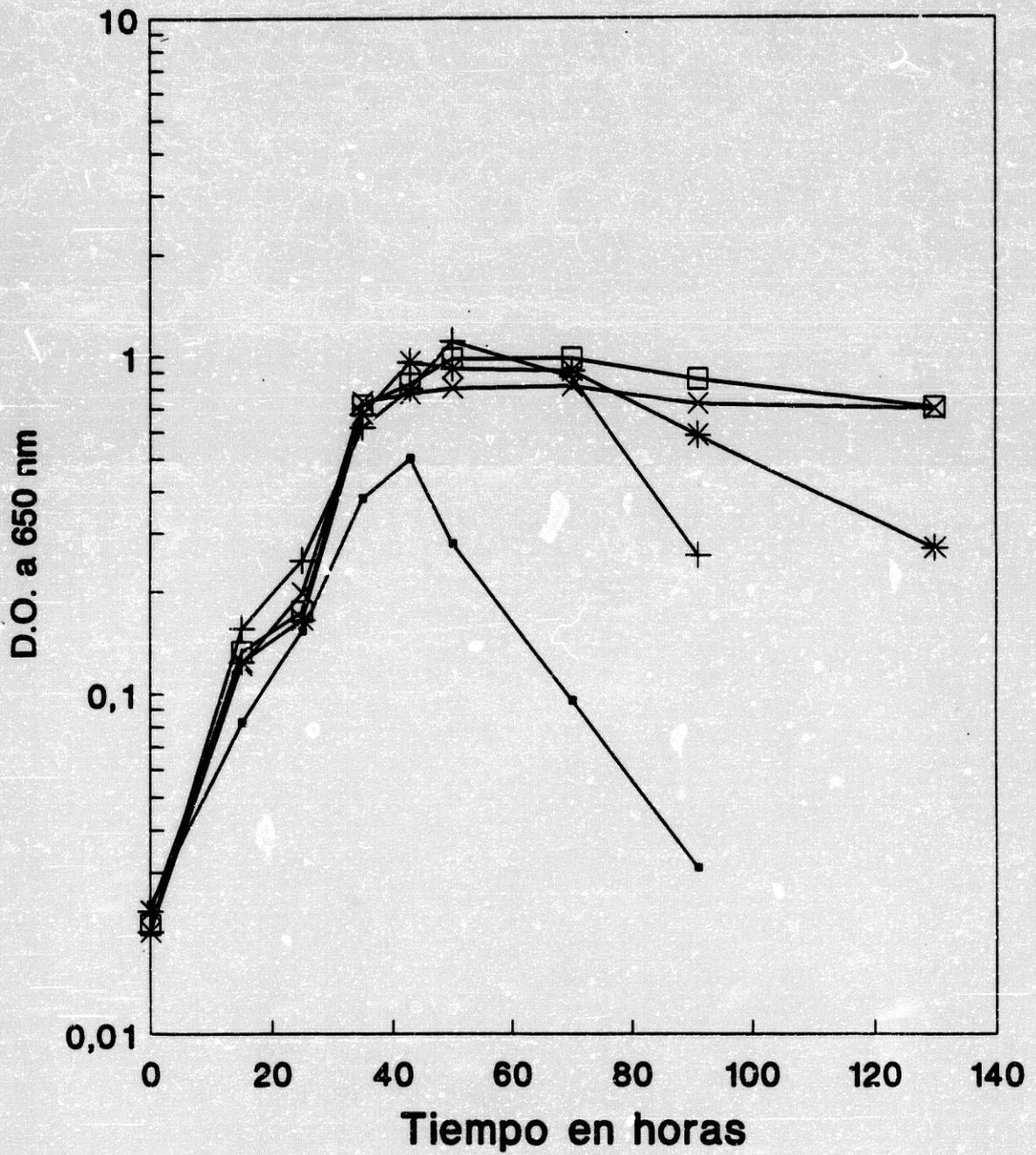


Figura 8.- Curvas de crecimiento de *Myxococcus coralloides* D en los medios TT 10 mM (+); TT-6, 5 mM (■); TT-7, 20 mM (+); TT-8, 30 mM (□) y TT-9, 50 mM (x).

En la Tabla 2, se recogen, para mayor claridad y facilidad de comparación los resultados de los experimentos de este apartado.

Medios	[PO ₄ ³⁻]	pH final	Máxima D.O. 650 nm	Inicio de lisis	g cristales/ 100 ml
CT-6	5 mM	8,4	0,512	43 h	trazas
CT	10 mM	8,6	1,217	50 h	0,120
CT-7	20 mM	8,2	1,008	70 h	0,080
CT-8	30 mM	7,4	1.020	70 h	trazas
CT-9	50 mM	7,4	0,937	70 h	trazas
TT-6	5 mM	8,3	0,498	43 h	trazas
TT	10 mM	8,4	1,103	50 h	0,10
TT-7	20 mM	8,2	0,956	70 h	0,065
TT-8	30 mM	7,5	0,982	70 h	0,025
TT-9	50 mM	7,5	0,812	70 h	trazas

Tabla 2.- Resumen de los resultados obtenidos en diferentes medios de cultivo en función de la [PO₄³⁻]. En las diferentes columnas se muestran las variaciones de pH, la máxima D.O. alcanzada, el comienzo de la lisis y la cantidad de cristales obtenidos. El pH inicial fue en todos los casos 6,5.

2.3.- Influencia de la fuente de magnesio

Para los ensayos de este apartado se utilizaron como fuentes de magnesio las siguientes sales: sulfato, cloruro, carbonato y acetato de magnesio. El objeto era comparar el comportamiento del microorganismo en cuanto a la producción de

cristales, según cual fuera la fuente de magnesio utilizada, con la fuente utilizada habitualmente en el medio CT, el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Este compuesto, como se ha descrito previamente, se emplea a una concentración de 0,1%, lo que equivale a un aporte de ion Mg^{2+} al medio de cultivo de 4,06 mM. Al objeto de poder realizar la comparación del comportamiento sobre la base de un mismo aporte de magnesio, las distintas fuentes ensayadas fueron las siguientes:

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$[\text{Mg}^{2+}]$ 4,06 mM
MgCO_3	$[\text{Mg}^{2+}]$ 4,06 mM
$\text{Mg}(\text{CH}_3\text{-COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$[\text{Mg}^{2+}]$ 4,06 mM

que se corresponden con los medios CT-10, CT-11 y CT-12 respectivamente, según se describió en el apartado 2.2.1. de Material y Métodos. Los resultados obtenidos de estos experimentos se muestran en la Figura 9. Como puede verse el crecimiento óptimo se da con el medio CT, y también es en ese medio, cuya fuente de magnesio es el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, en el que se obtiene la mayor producción de cristales. (Ver tabla 3).

La lisis se produce en el mismo tiempo en el medio CT-10 que en el medio CT, sin embargo en el medio CT-12, cuya fuente de magnesio es el $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{-COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, la lisis se retarda considerablemente, no comenzando hasta las 91 horas después de la inoculación. En el medio CT-11, cuya fuente de magnesio es el MgCO_3 , se observa un crecimiento muy pobre en comparación con el del medio CT, y además, la lisis se retarda aún más que en el caso anterior, no comenzando hasta las 130 horas después de la inoculación.

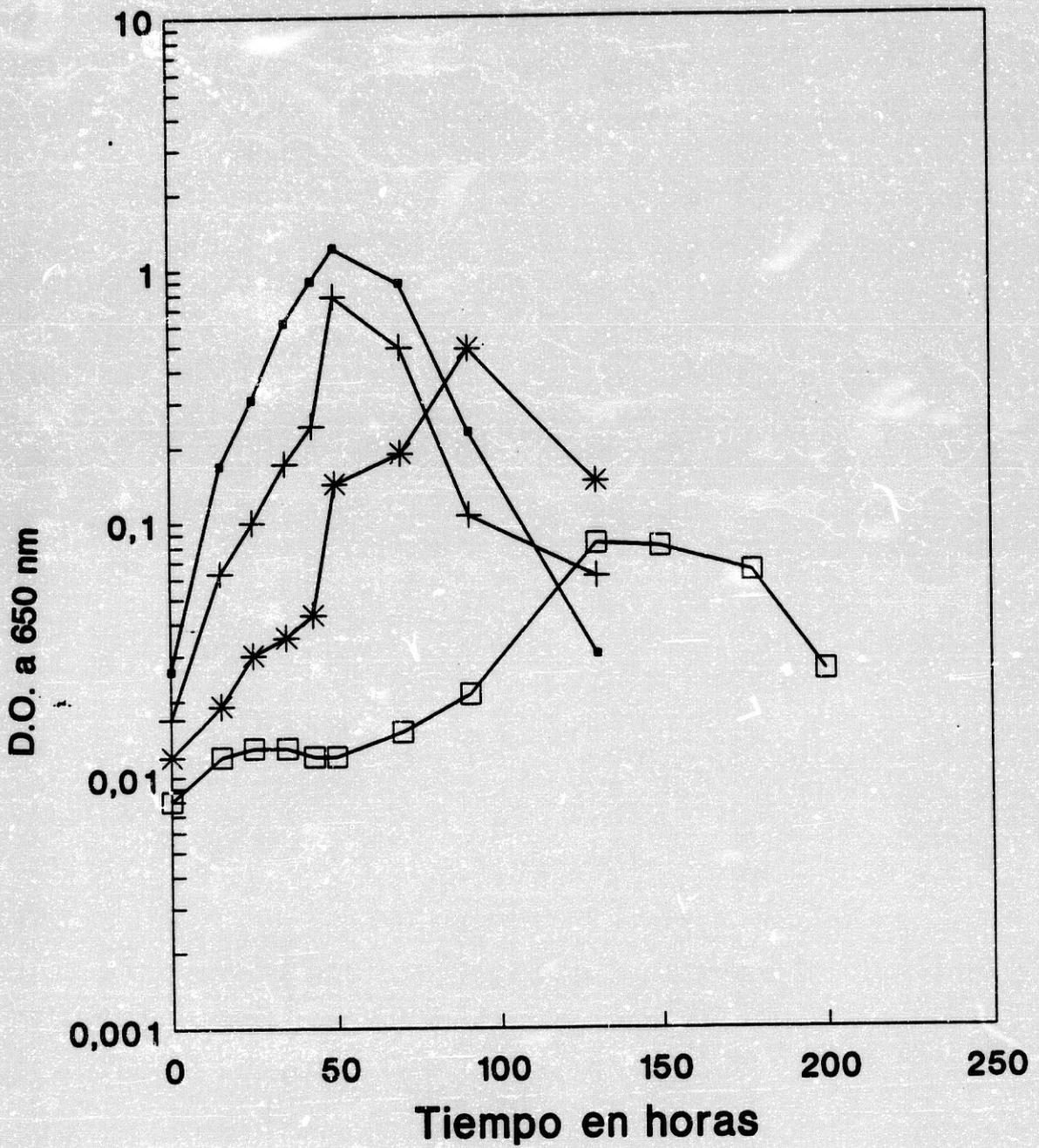


Figura 9.- Curvas de crecimiento de *Myxococcus coralloides* D en los medios CT, CT-10, CT-11 y CT-12, cuyas fuentes de magnesio son respectivamente sulfato (■), cloruro (+), carbonato (□) y acetato de magnesio (*).

En la Tabla 3 se da un resumen de los datos principales del comportamiento de *M. coralloides* D en este grupo de experimentos, para facilitar su comparación.

Medio	Fuente magnesio	pH final	Máxima D.O. 650 nm	Inicio de lisis	g cristales/ 100 ml
CT	sulfato	8,6	1,217	50 h	0,12
CT-10	cloruro	8,6	0,780	50 h	0,09
CT-11	carbonato	7,7	0,082	130 h	trazas
CT-12	acetato	7,9	0,483	91 h	0,055

Tabla 3.- Resumen de los resultados obtenidos en medios de cultivo en los que varía la fuente de magnesio. En las diferentes columnas se muestran la variación del pH, el máximo de D.O. alcanzada, el comienzo de la lisis y la cantidad de cristales obtenidos. Todos los medios de cultivo utilizados en estos ensayos tenían pH inicial 6,5. y una concentración de fosfato de 10 mM.

2.4.- Influencia de la relación $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$

Para comprobar la influencia de la concentración relativa de iones fosfato y magnesio en el medio de cultivo sobre la producción de cristales, se eligió en primer lugar, como fuente de magnesio, sulfato magnésico, ya que, como se deduce de los experimentos del apartado 2.3., es la fuente de magnesio más idónea para la producción de cristales por esta mixobacteria, y en segundo lugar las siguientes relaciones $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$: 1/0,4; 1/1; 1/1,5; 1/2; 0,5/1; 1,5/1 y 2/1; correspondientes a los medios CT, CT-13, CT-14, CT-15, CT-16, CT-17 y CT-18, y que se corresponden, también respectivamente, con las relaciones de molaridad siguientes: 10 mM/4,06 mM, 10 mM/10 mM, 10 mM/15 mM, 10 mM/20 mM, 5 mM/10mM, 15 mM/10 mM y 20 mM/10 mM, según se describió en el apartado 2.2.1. de Material y

Métodos. Las curvas de crecimiento obtenidas pueden verse en la figuras 10 y 11.

En la Tabla 4 pueden encontrarse los datos más relevantes de este grupo de experimentos para llevar a cabo su comparación.

Medio	[PO ₄ ³⁻]	[Mg ²⁺]	Relación [PO ₄ ³⁻]/[Mg ²⁺]	pH final	Máxima D.O. 650 nm	Inicio Lisis	g cristales/ 100 ml
CT	10 mM	4 mM	1/0,4	8,6	1,217	50 h	0,12
CT-13	10 mM	10 mM	1/1	7,4	0,798	70 h	0,05
CT-14	10 mM	15 mM	1/1,5	7,0	0,719	70 h	0,052
CT-15	10 mM	20 mM	1/2	7,0	0,877	70 h	0,063
CT-16	5 mM	10 mM	0,5/1	7,45	0,777	70 h	0,09
CT-17	15 mM	10 mM	1,5/1	6,77	0,980	70 h	0,06
CT-18	20 mM	10 mM	2/1	6,74	1,025	70 h	0,081

Tabla 4.- Resumen de los resultados obtenidos en medios en los que varía la relación [PO₄³⁻]/[Mg²⁺]. En las diferentes columnas se muestra la variación de pH, la [PO₄³⁻], la [Mg²⁺], la proporción entre ambos iones, la máxima D.O. alcanzada, el inicio de la lisis y la cantidad de cristales obtenidos.

El pH inicial en todos los casos fue 6,5. La fuente de magnesio utilizada fue sulfato magnésico.

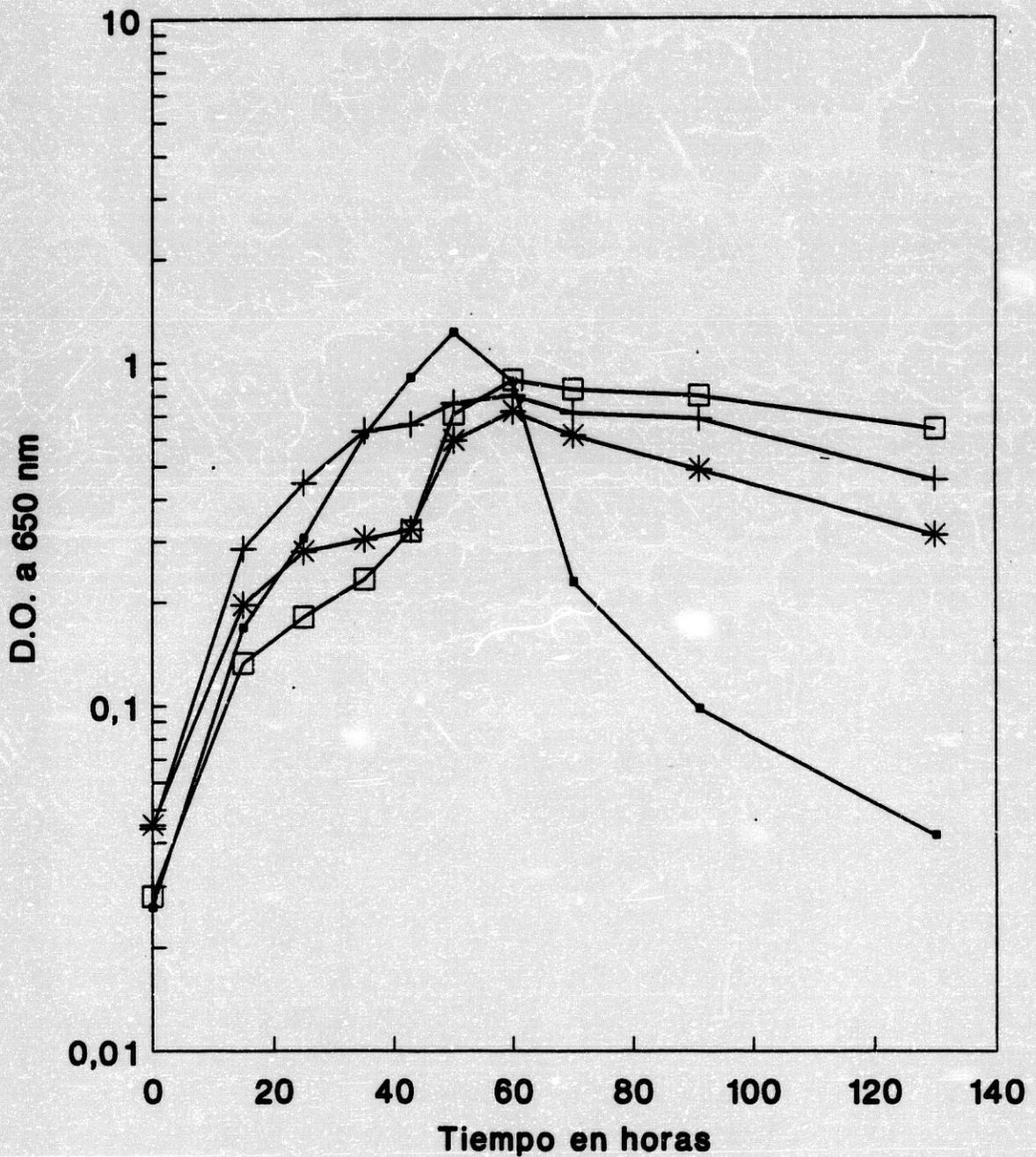


Figura 10.- Curvas de crecimiento de *Myxococcus coralloides* D en los medios CT, CT-13, CT-14 y CT-15, cuyas relaciones de molaridad $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$ son respectivamente: 10 mM/4,06 mM (■), 10 mM/10 mM (+), 10 mM/15 mM (*) y 10 mM/20 mM (□).

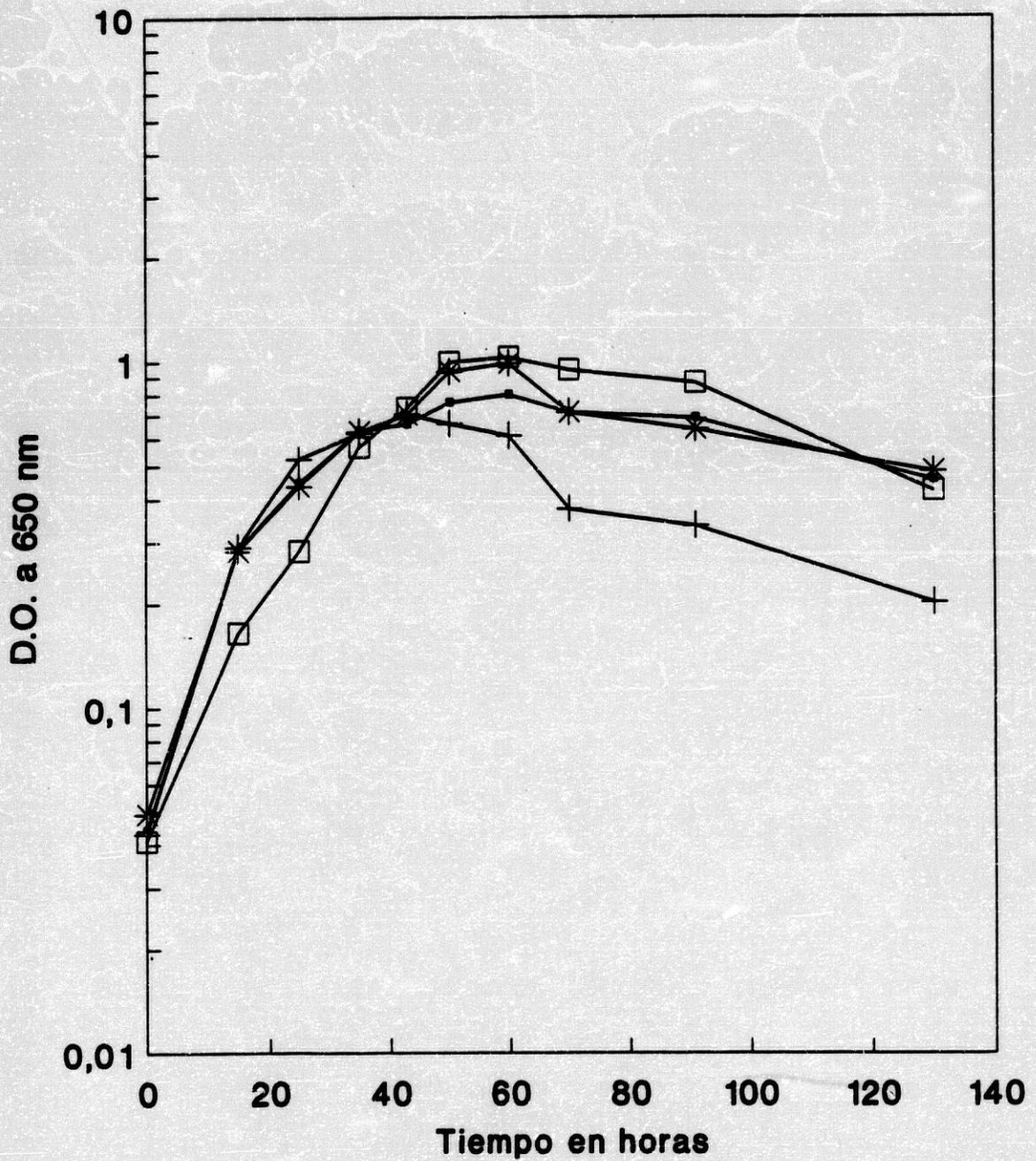


Figura 11.- Curvas de crecimiento de *Myxococcus coralloides* D en los medios CT-13, CT-16, CT-17 y CT-18, cuyas relaciones de molaridad $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$ son respectivamente: 10 mM/10 mM (■), 5 mM/10 mM (+), 15 mM/10 mM (*) y 20 mM/10 mM (□).

3.- Identificación de los cristales producidos. Estudios microanalíticos

Para llevar a cabo la identificación de los cristales producidos, se utilizaron las siguientes técnicas:

Difracción de rayos X.

Microanálisis mediante EDX-SEM.

Observación mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Mediante estas técnicas se han estudiado los cristales producidos en todos los medios, excepto en los casos de los medios CT-5, CT-6, CT-8, CT-9, CT-11, TT-5, TT-6 y TT-9, en que sólo se realizó microanálisis (EDX) y observación con SEM debido a que la pequeña cantidad de cristales que se producían no permitía llevar a cabo la difracción de rayos X.

Para poder obtener la cantidad de cristales requerida para los estudios de difracción de rayos X, se procedió a cultivar la bacteria en matraces erlenmeyer de 250 ml de capacidad a los que se adicionaban 100 ml del medio de cultivo correspondiente, llevándose a cabo, en cada caso, cultivos de entre 3 y 5 matraces.

En principio los cultivos se iniciaron llevando en paralelo matraces en agitación y otros en reposo con el mismo medio de cultivo. No obstante, se observó que los cristales producidos en agitación aparecían mucho más impregnados de los restos procedentes de la lisis celular y que era, en algunos casos, imposible limpiarlos, por lo que se decidió realizar los experimentos restantes sólo en reposo.

En la Tabla 5 se indica los cultivos que se realizaron en agitación y en reposo o sólo en reposo, para la obtención de los cristales. Cabe destacar las siguientes observaciones. En los cultivos en reposo, y puesto que la bacteria produce velo, este puede observarse sobre la superficie del medio de cultivo, permaneciendo aún después de producirse la lisis de las células. Pues bien, los cristales, aunque en su

mayoría se depositaban en el fondo del matraz, también se observaban flotando en la superficie inmersos en el velo mencionado. No obstante, un ligero movimiento del matraz, provocaba su precipitación al fondo.

Medio	Agitación	Reposo	Medio	Agitación	Reposo
CT	+	+	CT-15	-	+
CT-1	+	+	CT-16	-	+
CT-2	+	+	CT-17	-	+
CT-3	+	+	CT-18	-	+
CT-4	+	+	TT	+	+
CT-5	+	+	TT-1	+	+
CT-6	-	+	TT-2	+	+
CT-7	-	+	TT-3	+	+
CT-8	-	+	TT-4	+	+
CT-9	-	+	TT-5	+	+
CT-10	-	+	TT-6	-	+
CT-11	-	+	TT-7	-	+
CT-12	-	+	TT-8	-	+
CT-13	-	+	TT-9	-	+
CT-14	-	+			

Tabla 5.- Métodos de cultivo utilizados para la producción de cristales en los distintos medios de cultivo líquidos. El signo - indica que no se realizó cultivo en esas condiciones. El signo +, cultivos realizados.

En cuanto a cultivos en medios sólidos, debido a que para extraer los cristales del medio de cultivo, era necesario fundir el agar, y que, como se indicó en el apartado 1 de esta sección de Resultados, este proceso los deshidratava, no se llevaron a cabo variantes para la obtención en este tipo de medios, salvo la utilización de membranas de celofán, cuyos resultados se describen mas adelante en el apartado 6.

En relación a la difracción de rayos X, en todos los casos se encontró que se trataba de estruvita, y en algunos casos, que se estudian en el apartado 4 de esta sección de Resultados, aparecían pequeñas cantidades de otros minerales. Los difractogramas de rayos X correspondientes a la estruvita se muestran en las figuras 12, 13, 14 y 15. En la Figura 16, se muestra un difractograma de estruvita amorfizada.

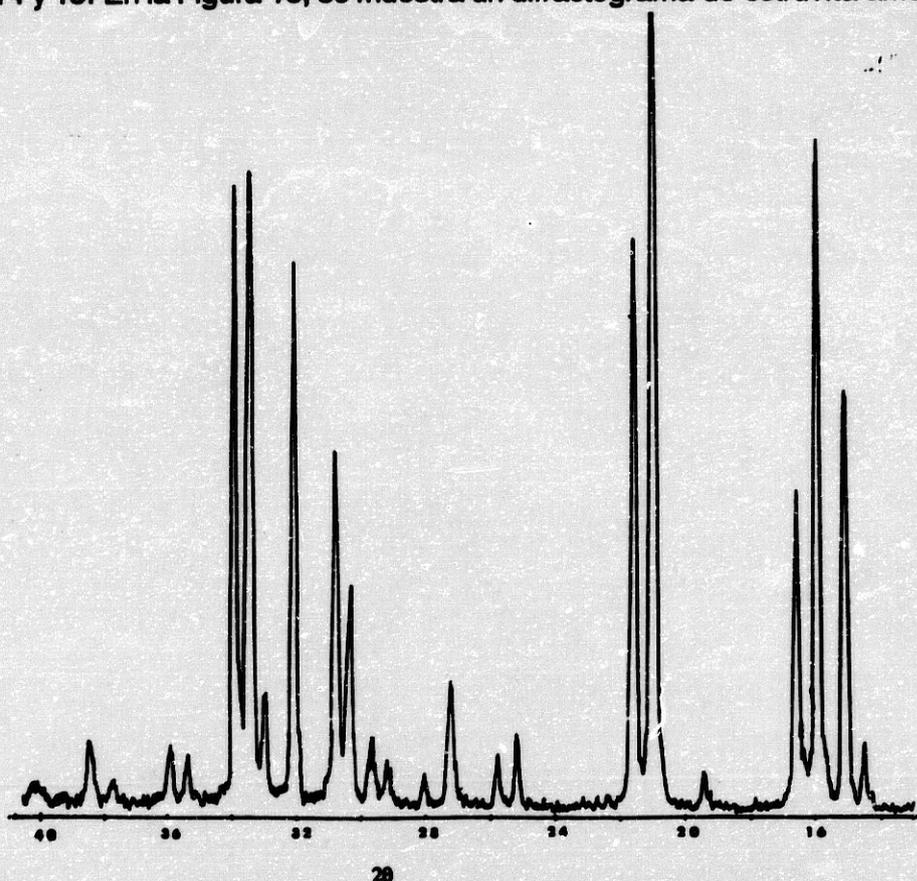


Figura 12.- Difractograma de rayos X de cristales obtenidos cultivando *Myxococcus coralloides* D en medio CT en agitación.

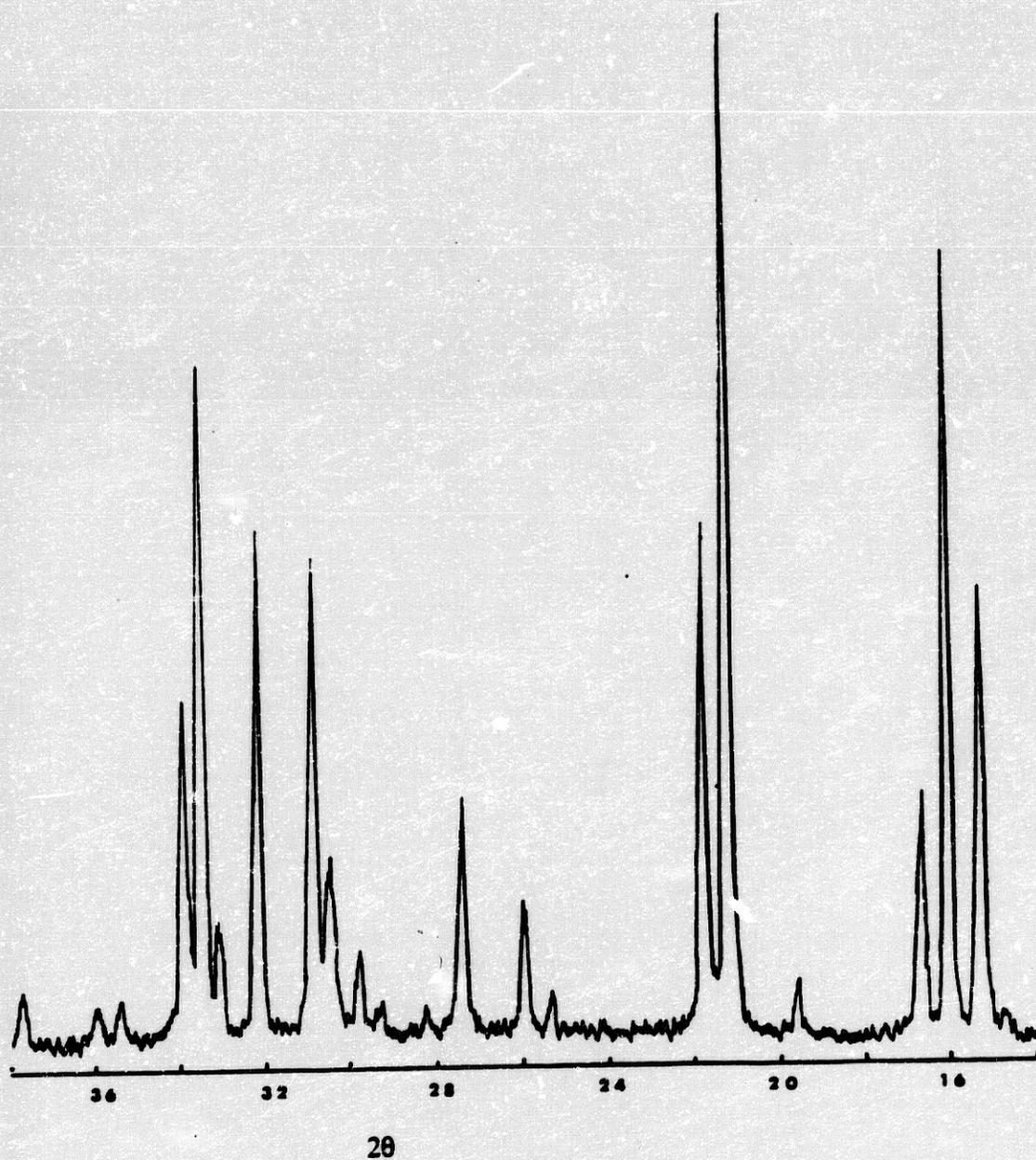


Figura 13.- Difractograma de rayos X de cristales obtenidos cultivando *Myxococcus coralloides* D en medio CT en reposo.

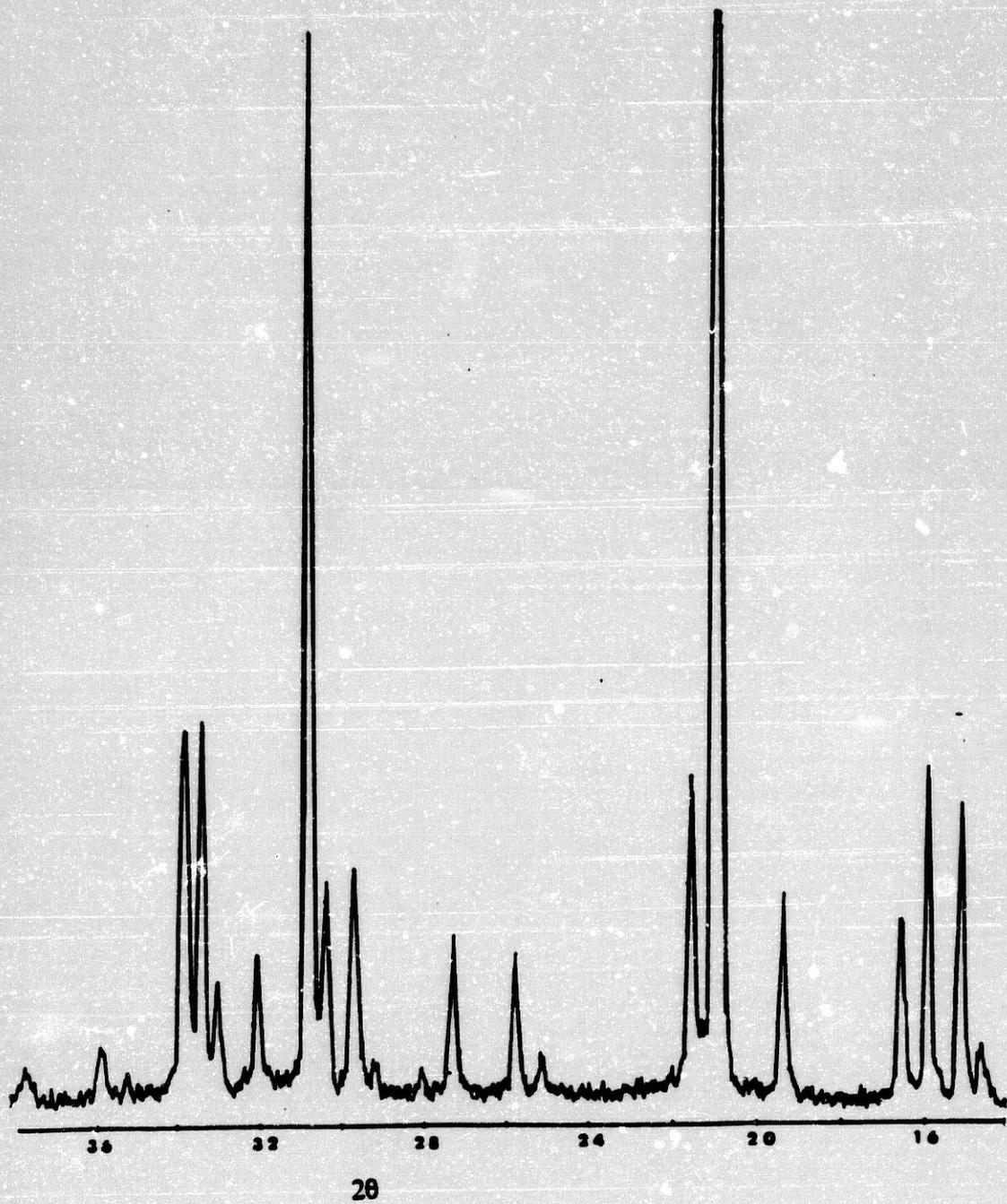


Figura 14.- Difractograma de rayos X de cristales obtenidos cultivando *Myxococcus coralloides* D en medio TT en agitación.

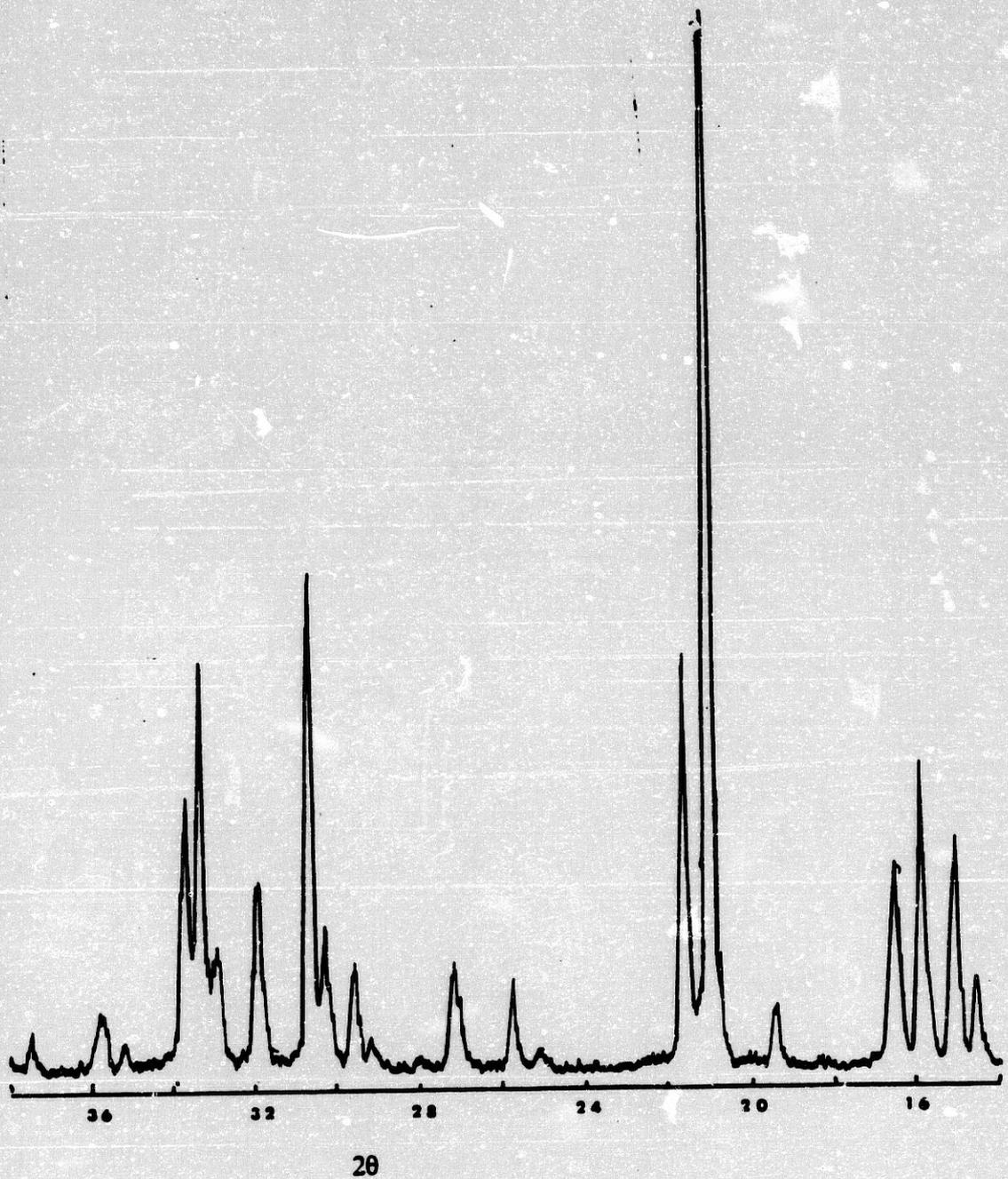


Figura 15.- Difractograma de rayos X de cristales obtenidos cultivando *Myxococcus coralloides* D en medio TT en reposo.

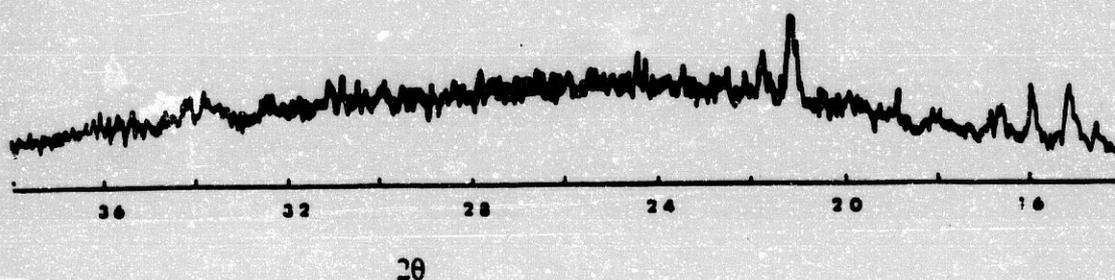


Figura 16.- Difractograma de rayos X de cristales obtenidos cultivando *Myxococcus coralloides* D en medios sólidos.

En cuanto a la observación con SEM, se encontraron, según los casos, morfologías típicas de cristales de estruvita, y, en muchas ocasiones, junto con las formas cristalinas aparecían formas como pelos, túbulos o cintas. Dichas formas no cristalinas se observaron en los medios CT-2, CT-4, TT y TT-2.

Los distintos tipos de cristales observados se tratan en el apartado 5 de esta sección de Resultados.

En la Tabla 6 se indica el origen de los distintos cristales analizados, así como las pruebas de identificación realizadas en cada caso.

Medio	DRX	EDX	SEM	Medio	DRX	EDX	SEM
CT	+	+	+	CT-16	+	+	+
CT-1	+	+	+	CT-17	+	+	+
CT-2	+	+	+	CT-18	+	+	+
CT-3	+	+	+	CTA	+	+	+
CT-4	+	+	+	TT	+	+	+
CT-5	-	+	+	TT-1	+	+	+
CT-6	-	+	+	TT-2	+	+	+
CT-7	+	+	+	TT-3	+	+	+
CT-8	-	+	+	TT-4	+	+	+
CT-9	-	+	+	TT-5	-	+	+
CT-10	+	+	+	TT-6	-	+	+
CT-11	-	+	+	TT-7	+	+	+
CT-12	+	+	+	TT-8	+	+	+
CT-13	+	+	+	TT-9	-	+	+
CT-14	+	+	+	TTA	+	+	+
CT-15	+	+	+				

Tabla 6.- Origen de los cristales y pruebas de identificación realizadas en cada caso. El signo +, indentificación realizada; -, no realizada.

En la Figura 17, se dan los distintos diagramas de dispersión de rayos X. Los diagramas 17a y 17h corresponden a los cristales obtenidos en todos los medios de cultivo. Sin embargo, en el caso de las formas tubulares, pilliformes o de cintas, los elementos que aparecen son, junto con el P y el Mg propios de la estruvita, Al, Si, S, Cl, Na y Ca. Ya no se trata por tanto de estruvita, sino de concreciones de otros iones que adoptan las formas observadas. Los diagramas obtenidos se dan en la figura 17 (17b a 17g). Las observaciones mediante SEM correspondientes a estas formas no cristalinas se muestran en la Figura 18.

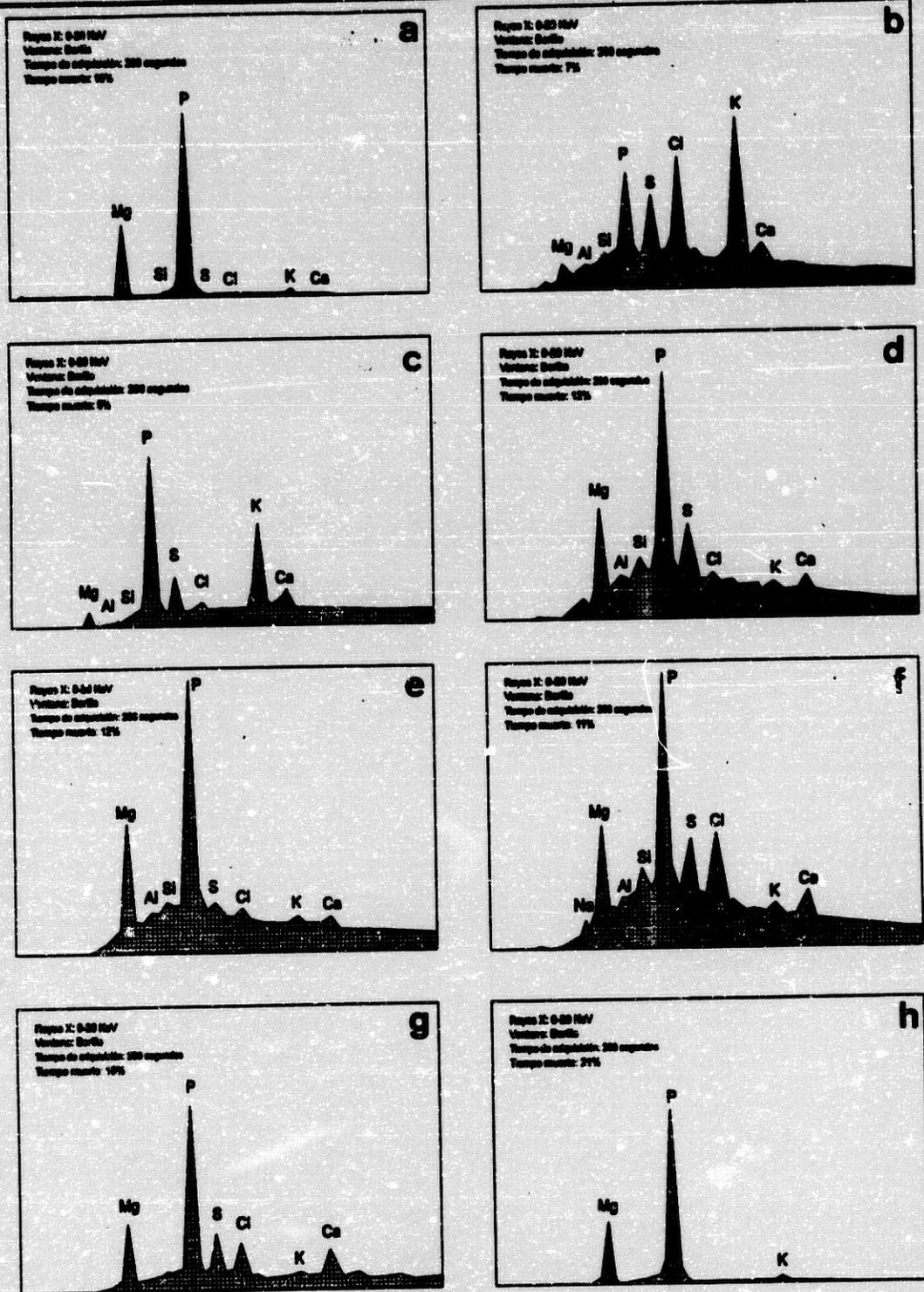


Figura 17.- Diagramas de dispersión de rayos X de cristales y formas no cristalinas producidas por *Myxococcus coralloides* D. a, diagrama general de formas cristalinas. b, c, d, e, f, g corresponden con las formas no cristalinas de la Figura 18 (b-1, b-2, c, d, a-1, a-2, respectivamente). h, corresponde a la Figura 18, a-3.

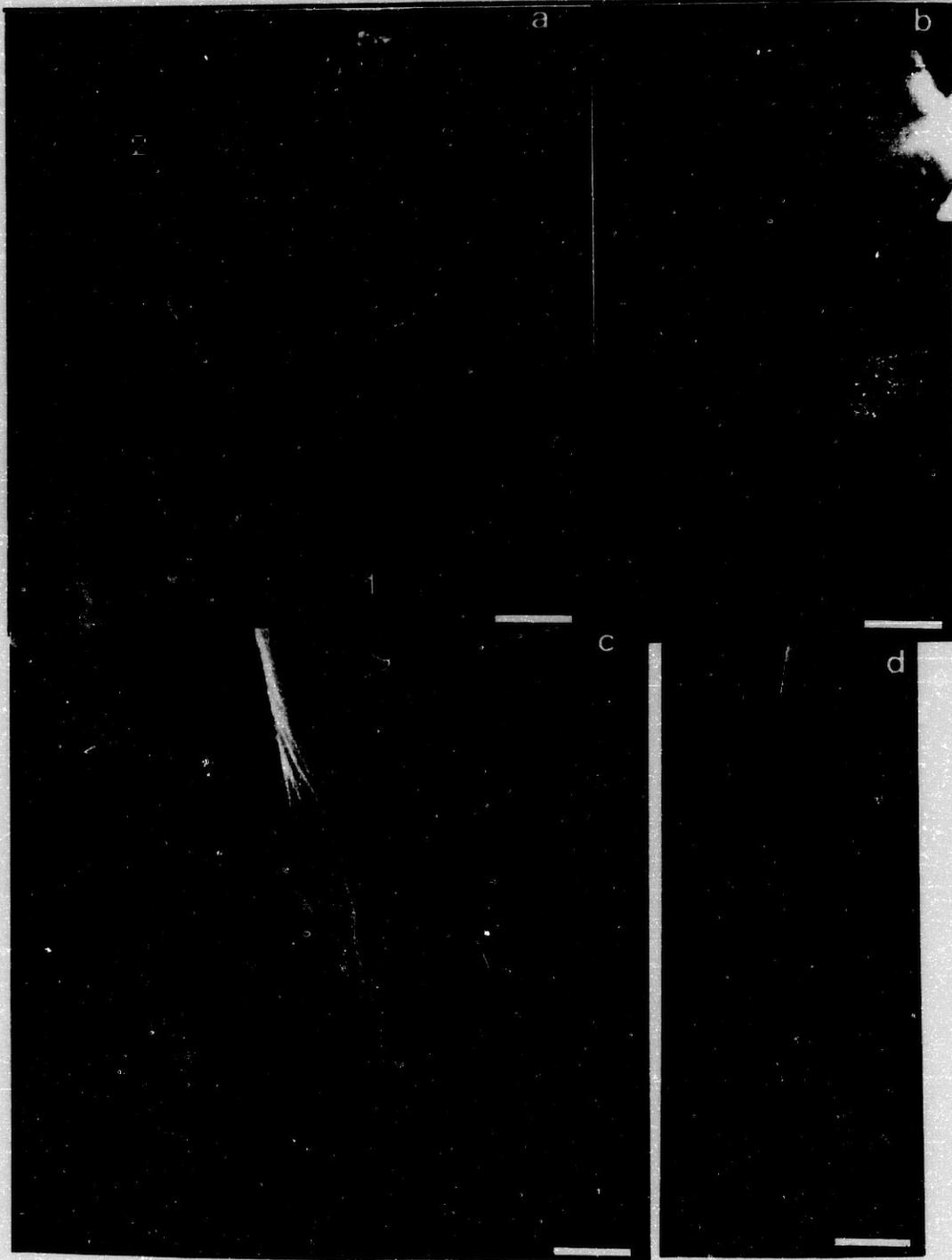


Figura 18.- Formas no cristalinas observadas junto con los cristales producidos por *Myxococcus coralloides* D. En a, se puede detectar junto con los cristales una forma más o menos tubular (1) y unas formaciones amorfas (2). En b, también una forma tubular o piliforme (1) y una formación que parece cristalina (2).

4.- Otros fosfatos y sulfatos distintos de la estruvita producidos por *M. coralloides* D

En algunos casos se identificaron en los difractogramas de los cristales producidos, algunos picos y/u hombros pertenecientes a otras formas cristalinas. Los casos en que se detectaron correspondieron siempre a cristales producidos en reposo. Las formas cristalinas identificadas han sido, junto con la estruvita, newberyita, taylorita y schertelita.

En la tabla 8 se indican las condiciones de cultivo en que se han detectado estos minerales.

MINERALES	MEDIOS
Newberyita	CT-2 y CT-15
Schertelita	CT-2 y CT-15
Newberita y Schertelita	CT-2 y CT-13
Taylorita y Schertelita	CT-2

Tabla 8.- Otros minerales que aparecen junto con la estruvita en los medios de cultivo estáticos.

En las figuras 19, 20, 21 y 22 pueden verse los difractogramas correspondientes a estos minerales. De estos difractogramas puede deducirse que el porcentaje de los mismos frente a la estruvita debe ser bajo, posiblemente del orden del 5%. De todos los cultivos estáticos estudiados, la newberyita y la schertelita eran detectadas en el 43% de los casos y la taylorita solo en el 14%.

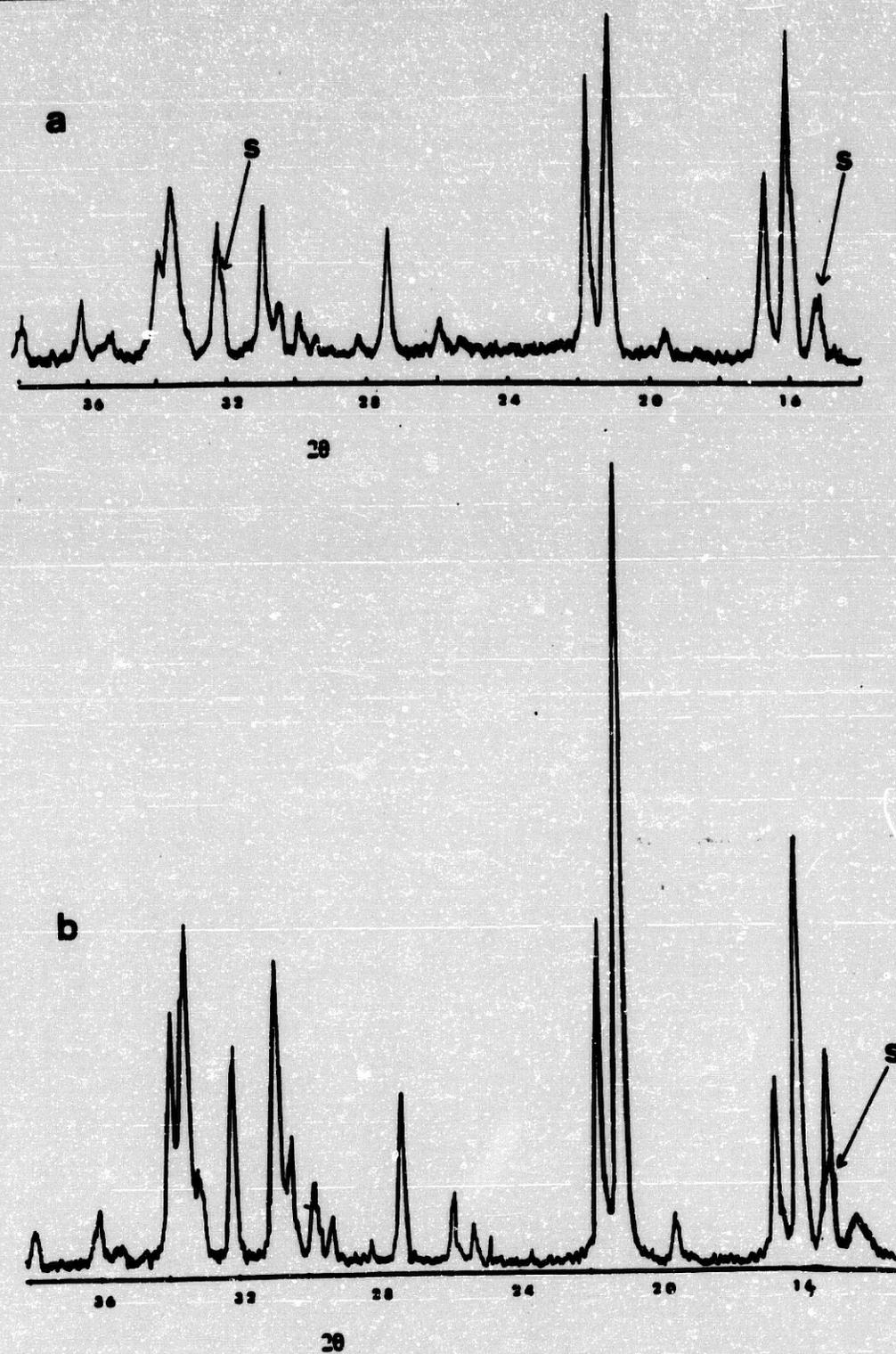


Figura 19.- Difractogramas de RX en los que se observan picos correspondientes a schertelita. a) cristales obtenidos en medio CT-2, b) cristales obtenidos en medio CT-15.

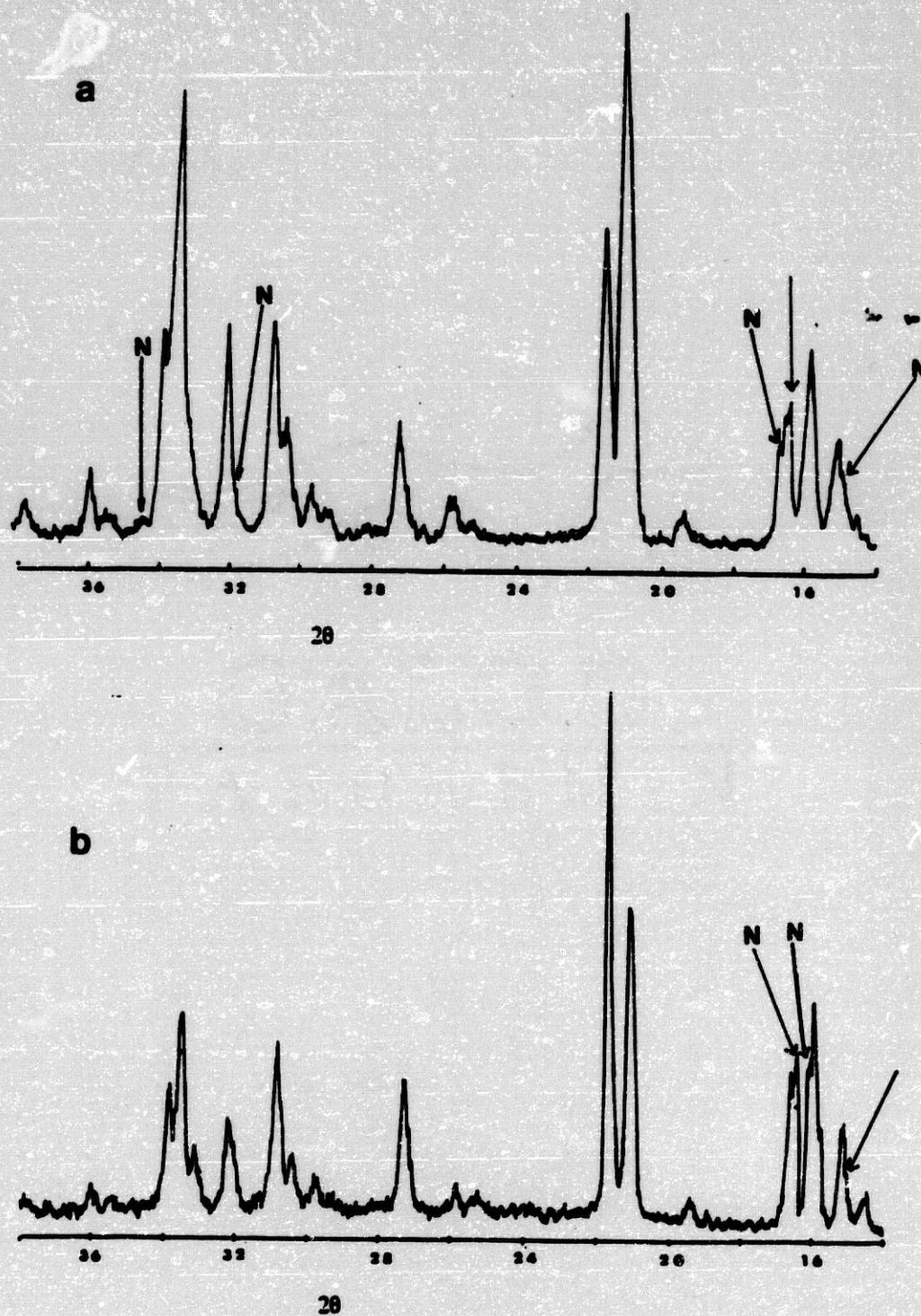


Figura 20.- Difractogramas de RX en los que se observan picos correspondientes a newberyita. a) cristales obtenidos en medio CT-2. b) cristales obtenidos en medio CT-15.

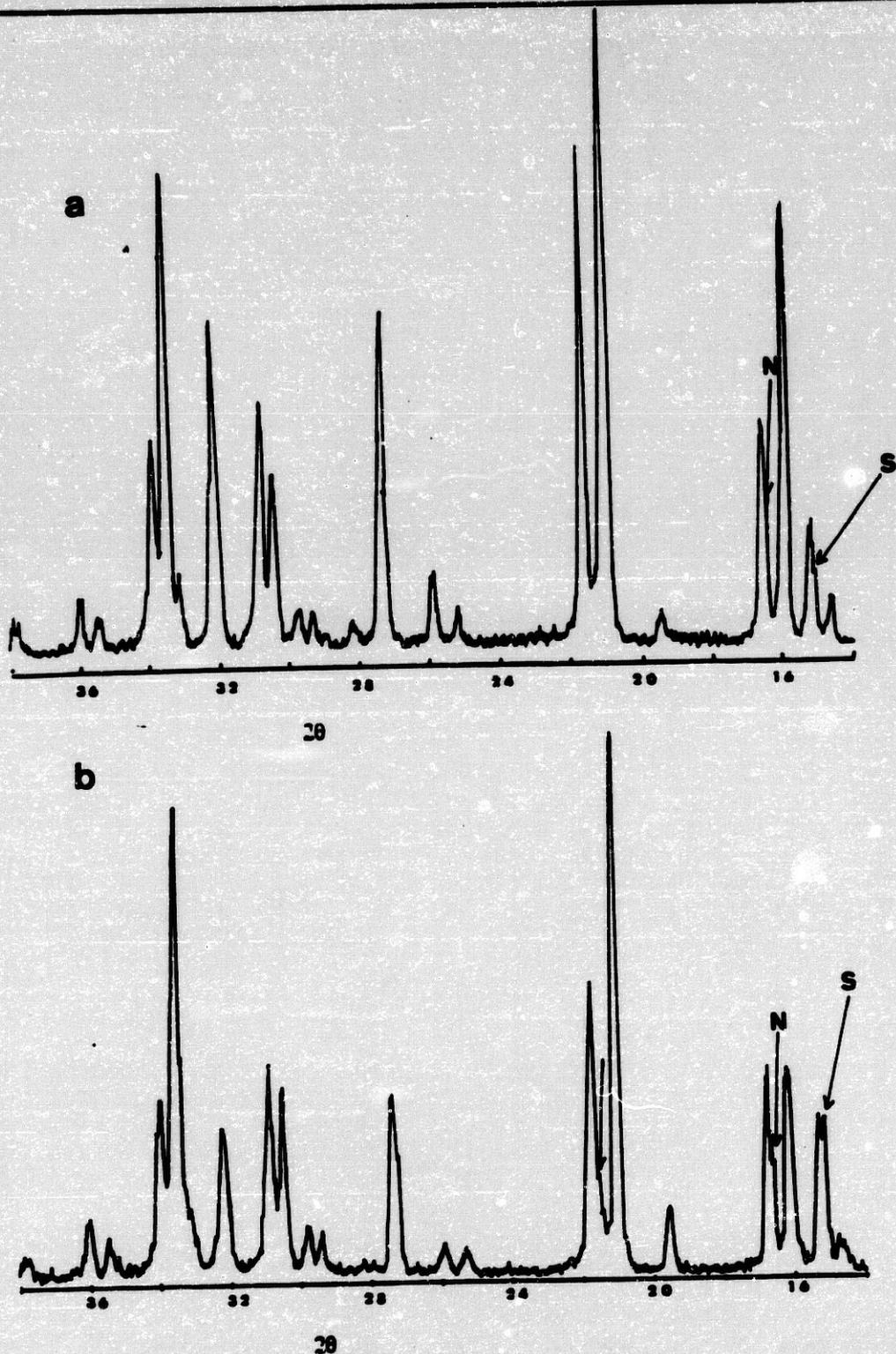


Figura 21.- Difractogramas de RX en los que se observan picos correspondientes a schertelita y otros a newberyita. a) cristales obtenidos en medio CT-2. b) cristales obtenidos en medio CT-13.

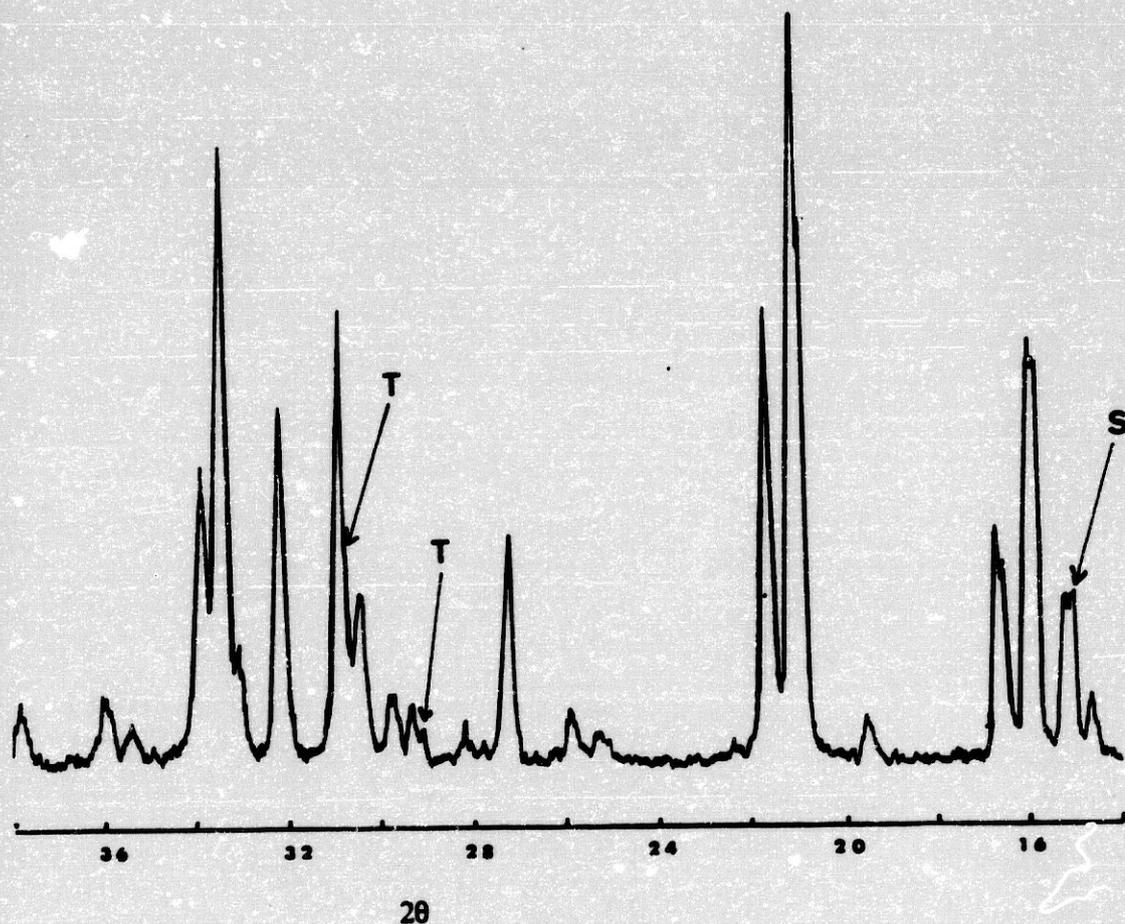


Figura 22.- Difractograma de RX en el que se observan picos correspondientes a schertellita y otros a taylorita de cristales obtenidos en medio CT-2.

5.- Morfologías de estruvita encontradas.-

Las distintas morfologías observadas se muestran en las figuras 4, 18 a, 23, 24, 25, 26 y 27.

Las figuras 4 a y 23 g e i corresponden a cristales obtenidos en medios TT y TT-7 respectivamente, en agitación, y las figuras 4 b y c, 25 d, 26 b y 26 f y g a cristales obtenidos en medios TT, TT-2, TT-7 y TT-8 respectivamente, en reposo.

Los cristales procedentes de cultivos en agitación aparecen, en su mayoría, con el aspecto de los que se ven en la figura 23 i, donde pueden observarse restos de cultivo que enmascara la superficie de los cristales. En el caso de los cultivos en medio TT y sus variantes, las morfologías observadas con más frecuencia son las agrupaciones que semejan rosetas, como las de las figuras 4 a, 23 i, y 25 d, sin que se observen notables diferencias entre los cultivos en reposo y en agitación. Las formas de las figuras 4 b y 4 c sólo se observaron en cultivos en medio TT en reposo.

La morfología de la figura 23 g (donde se ve un cristal aislado) corresponde con el tipo de cristales que se produce en los medios variantes del medio TT a concentraciones de fosfato 0,02 M y superiores, en agitación.

Las morfologías de las figuras 26 b y 26 g y, con menos frecuencia, la de la figura 26 f, son las producidas en las variantes del medio TT con concentraciones de fosfatos de 0,02 M y superiores, en reposo.

Las figuras 4 e, 23 b, 23 c y d, corresponden a cristales obtenidos en los medios CT, CT-2 y CT-7 respectivamente, en agitación.

Los restantes cristales mostrados se obtuvieron en medios CT y distintas variantes de este, en reposo.

Las morfologías que aparecen con más frecuencia en reposo, son las de las figuras 4 d, 24 c y d y 27 c, y algo menos frecuentemente la de la figura 25 b.

Cuando la concentración de fosfato es superior a 0,01 M, predominan las de las figuras 26 a, c, d, e y h. Las morfologías de las figuras 23 e y f y 27a son las encontradas con mayor frecuencia en medios con concentraciones de fosfato superiores a 0,01 M. Son también frecuentes en medios sólidos con película de celofán.

Las formas de la figura 23 a y 25 a se encuentran con frecuencia en las variantes del medio CT, con pHs 7,6 y superiores. También, a veces, en medios sólidos con y sin celofán. Las agrupaciones de la figura 23 h son muy frecuentes a concentraciones de fosfato superiores a 0,01 M.

En cuanto a los cristales producidos en medio CT y sus variantes en agitación, las morfologías obtenidas con más frecuencia son del tipo de las mostradas en 4 e y 23 b. Al aumentar la concentración de fosfato por encima de 0,01 M predominan cristales aislados del tipo de los mostrados en 23 c y d.

Las figuras 24 a y b muestran cristales que han aparecido exclusivamente en medio CT-11, y los de las figuras 27 b y d sólo en CT-12 y CT-10 respectivamente.

Como puede verse, en el caso de la utilización del medio CT y sus variantes, se encuentra mayor diversidad de morfologías que en el medio TT y las suyas.

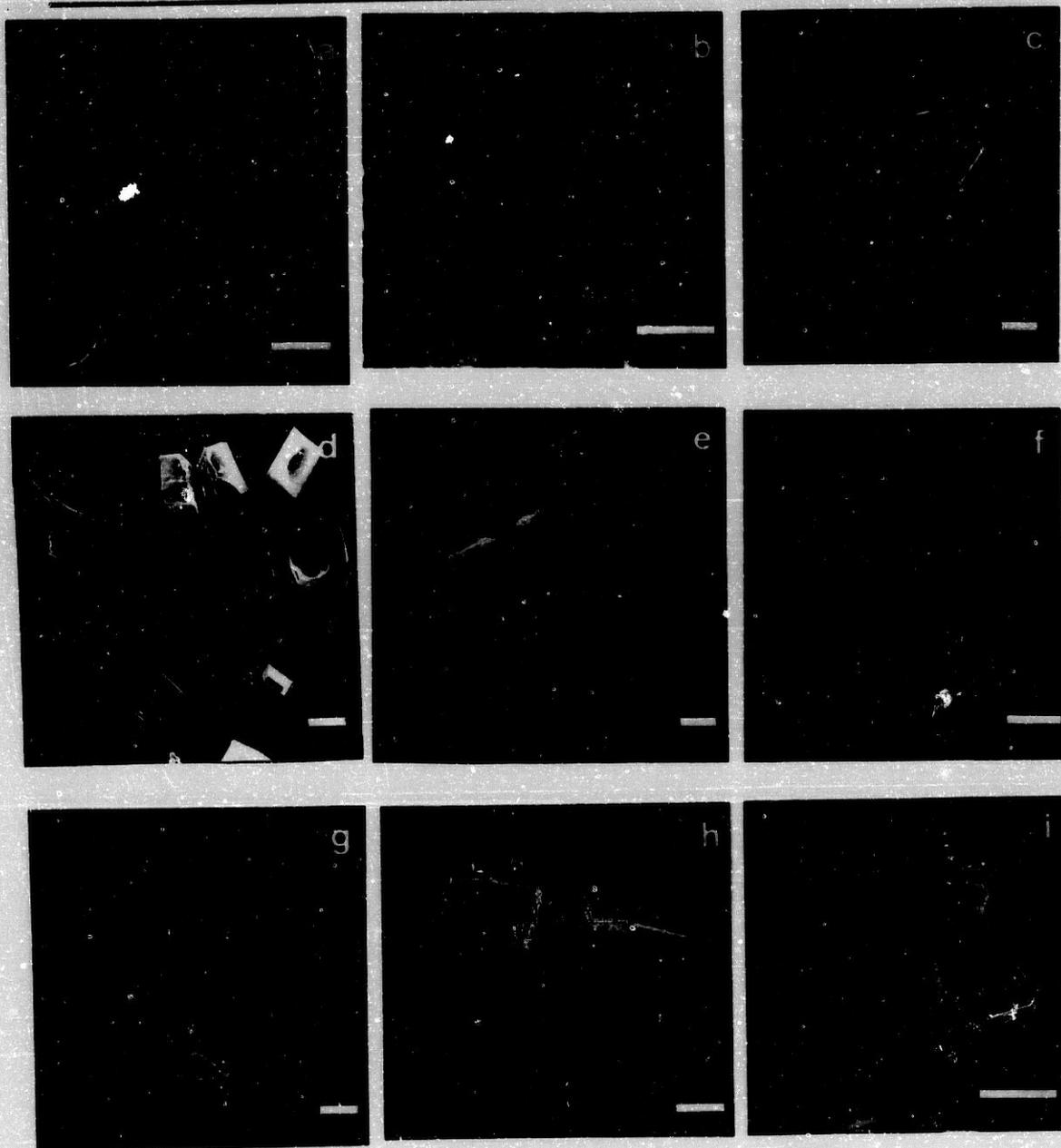


Figura 23.- Variante morfológicas de estruvita producidas por *M. coralloides*
D. a) En medio CT-4 en reposo, b) en medio CT-2 en agitación, c y d) en medio CT-7 en agitación, e, f y h) en medio CT-7 en reposo, g e i) en medio TT-7 en agitación.
Barras: a, c, h: 100 μm ; b, f: 20 μm ; d, i: 500 μm ; e: 200 μm ; g: 5 μm .

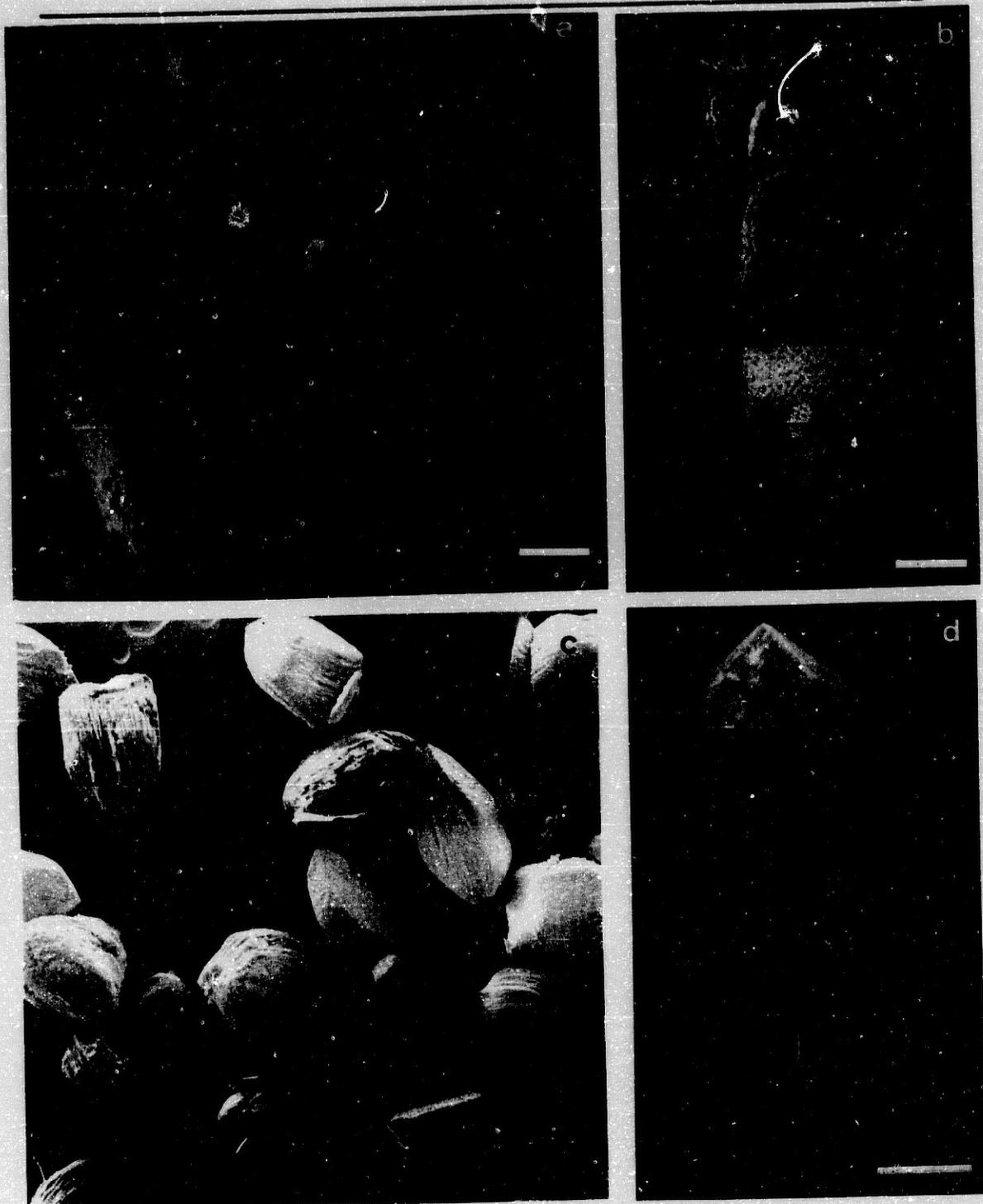


Figura 24.- Variantes morfológicas de estruvita producidas por *M. coralloides*
D. a y b en medio CT-11 en reposo; c y d en medio CT-2 en reposo. Barras: a, b,
d: 100 μm ; c: 200 μm .

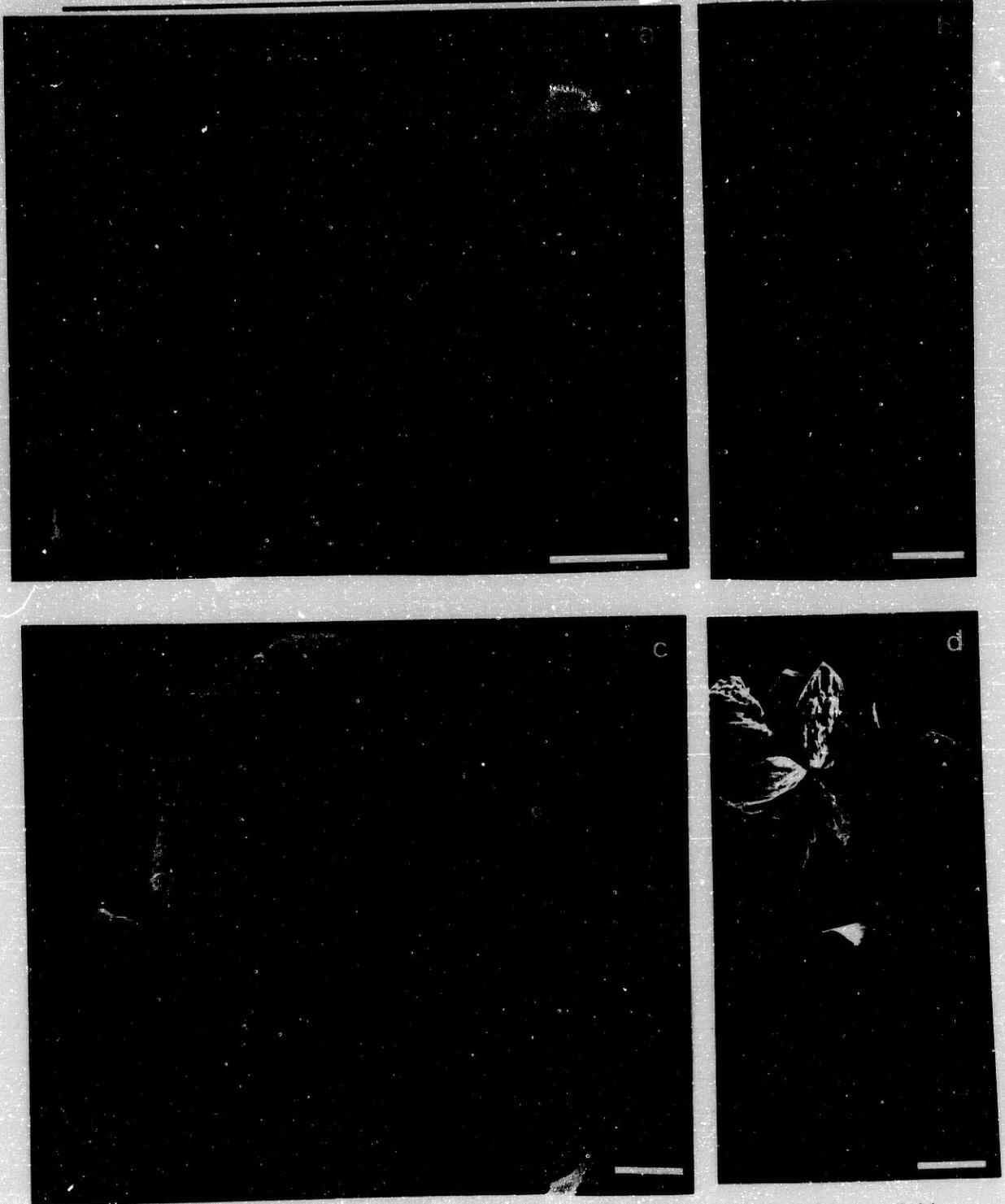


Figura 25.- Variantes morfológicas de estruvita producidas por *M. coralloides*. D. a en CT-4 en reposo; b en CT-7 en reposo; c y d en CT-2 en reposo. Barras: a, b: 200 μm ; c: 10 μm ; d: 100 μm .

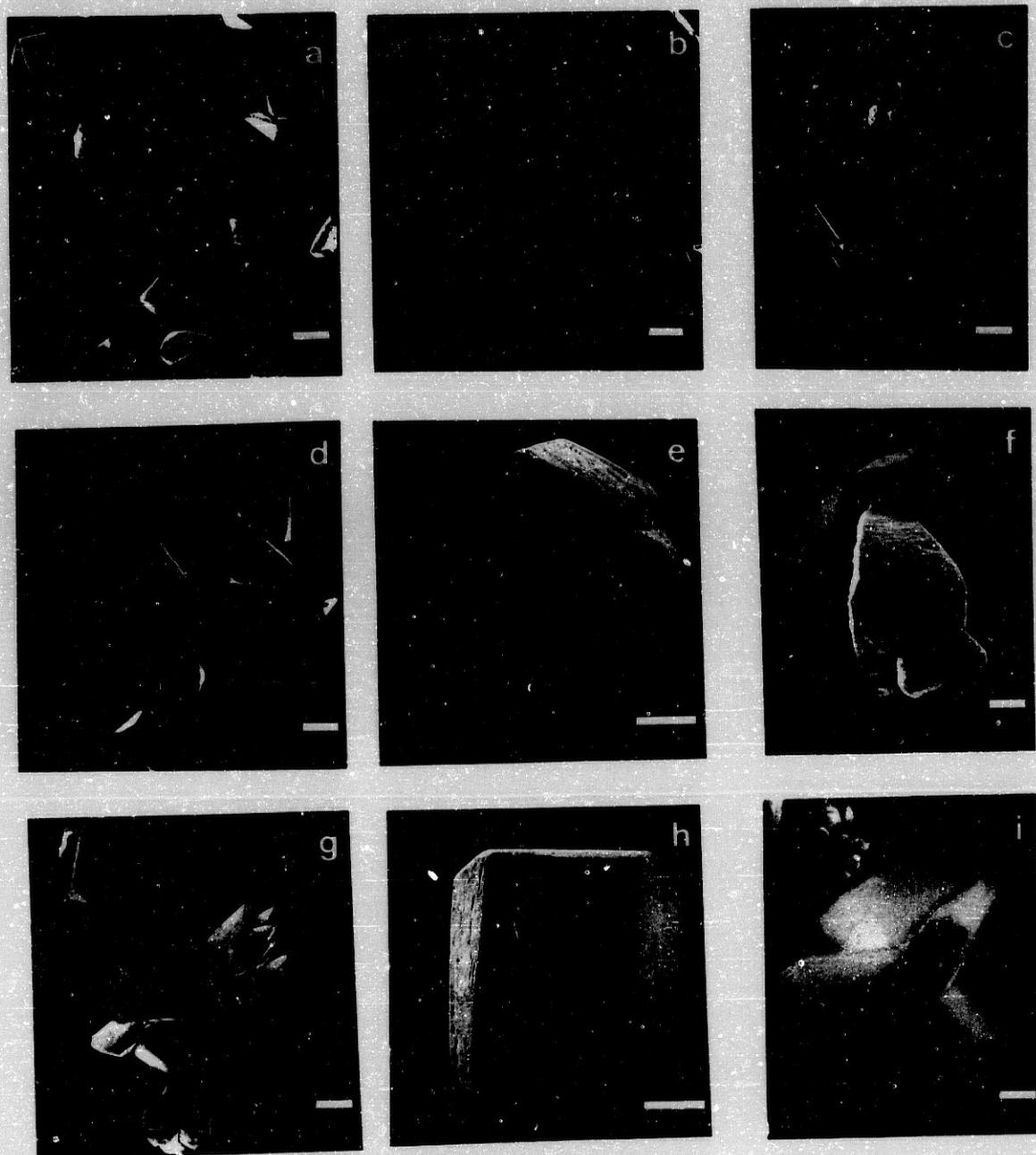


Figura 26.- Variantes morfológicas de estruvita producidas por *M. coralloides* D. a en medio CT-17 en reposo; b en medio TT-7 en reposo; c en medio CT-18 en reposo; d en medio CT-15 en reposo; e en medio CT-7 en reposo; f y g en medio TT-8 en reposo; i en medio CT-11 en reposo. Barras: a, e, g y h: 500 μm ; b, c, d, f, i: 200 μm



Figura 27.- Variantes morfológicas de estroviota producidas por *M. coralloides*. D. a en medio CT-7 en reposo; b y c en medio CT-12 en reposo; d en medio CT-10 en reposo. Barras: a, d: 200 μm ; b: 500 μm ; c: 100 μm .

6.- Obtención de estruvita utilizando membranas de celofán

Se utilizaron dos variantes según se describió en Material y Métodos:

a) Láminas de celofán sobre medios sólidos.

b) Bolsas de celofán en medios líquidos.

Estos experimentos iban encaminados a poner de manifiesto si para la cristalización de la estruvita era precisa la presencia de la bacteria o bastaba con los productos de su metabolismo.

6.1.- Medios sólidos

Las placas conteniendo el medio de cultivo CTA, y sobre su superficie la lámina de celofán, se inocularon con gotas de 5 μ l sobre la misma (véase Figura 2a). Para estas inoculaciones se utilizaban cultivos en medio líquido y agitación de 50 h. Simultáneamente se inocularon, de la misma manera, placas conteniendo el mismo medio CTA que había sido adicionado de un indicador, rojo fenol, en la proporción adecuada. Tras tres días de incubación comenzaron a aparecer cristales que se fueron desarrollando hasta los cinco días. En las placas con indicador comenzó a virar el color del medio hasta llegar a rojo. De acuerdo con este cambio de color, la apreciación fue de que el pH final alcanzado era de 8,0. La bacteria creció sobre el celofán.

Lo más interesante de estos experimentos fue que los cristales sólo se desarrollaron sobre el celofán, no detectándose en ningún caso cristales al otro lado de la lámina de celofán.

6.2.- Medios líquidos

Los cultivos se llevaron a cabo en matraces erlenmeyer con medio CT, de acuerdo con la técnica descrita en el apartado 3.1.3. de Material y Métodos (véase Figura 2b). El cultivo se llevó a cabo en reposo, ya que la agitación terminaba afectando a la integridad de la bolsa de celofán. Tras 20 días de incubación, como en los casos de cultivos en medios CT descritos en el apartado 2 de esta sección de Resultados, se procedía a recoger los cristales. En este caso, con sumo cuidado se sacó, previamente, la bolsa de celofán y de su contenido se estudió lo siguiente: pH y presencia o ausencia de cristales. La medida del pH arrojó un valor de 8,6 que coincidía exactamente con el valor del pH medido en el medio de cultivo en donde estaba inmersa la bolsa de celofán. En cuanto a producción de cristales, en el interior de la bolsa de celofán no se detectaron, mientras que en el exterior, la cantidad producida seguía siendo la misma que en los cultivos de CT.

Se deduce, por tanto, que sólo se producen cristales allí donde está la bacteria.

7.- Localización de la formación de los cristales

Con intención de localizar los posibles puntos donde se iniciaba la formación de los cristales sobre la célula bacteriana se procedió a preparar muestras de cultivo de distinta edad para su observación a microscopía electrónica de transmisión, como se describió en el apartado 5.1.2.b de la sección de Material y Métodos.

Las muestras observadas pusieron de manifiesto lo siguiente: en las muestras correspondientes a cultivos de 15 y 30 horas no se observó nada destacable, sin embargo en la muestra correspondiente al cultivo de 45 horas sin diluir se puso de manifiesto la presencia de unas formas como membranosas más o menos globulares (Figura 28 a, b y c), unas adheridas a los polos de las células bacterianas (Figura 28 a y c), y otras independientes de estas (Figura 28 b). Y asociadas a estas

formas membranosas, en ocasiones, estructuras que podían ser cristalinas y que mediante difracción de electrones se demostró que lo eran (figura 28 b y d). No obstante, la entidad era tan lábil que el propio tratamiento de observación las destruía. Los difractogramas obtenidos (Figura 28 d), aunque defectuosos, indican que se trata de una forma cristalina del sistema hexagonal.

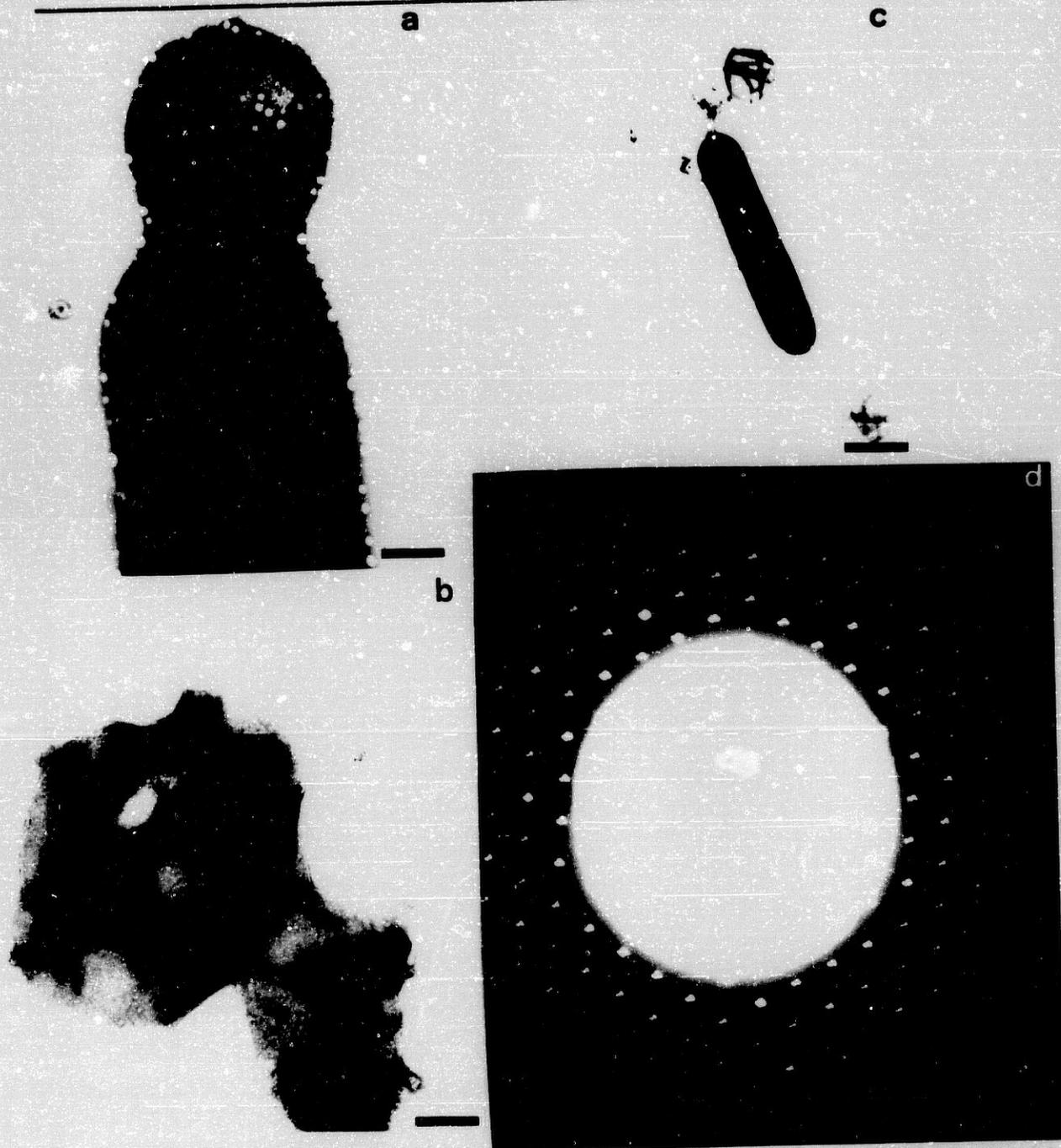


Figura 28.- Formas observadas mediante TEM a partir de un cultivo de 45 horas de *M. coralloides* D en medio CT. a) Bacilo que presenta una especie de bolsa en uno de los polos. b) Formaciones membranosas degenerativas. c) Forma bacilar y formas globulares con aspecto membranoso. d) Diagrama de difracción correspondiente a la Figura c. Barras: a, 0,233 μm ; b, 1 μm ; c, 0,140 μm .

DISCUSSION

DISCUSION

Producción de estruvita

El enorme interés despertado por la producción bacteriana de estruvita se deduce del elevado número de publicaciones realizadas. Entre los aspectos más interesantes estudiados se encuentran los relacionados con las condiciones físicas y químicas que influyen en la producción, así como con las especies bacterianas implicadas en la misma (Robinson, 1889; Huddleson y Winter, 1927; Beavon y Heatley, 1962; Shinano y Sakai, 1975; Rivadeneyra *et al.*, 1983; Nelson *et al.* 1983; Grenabo *et al.*, 1984; Ehrlich, 1990; McLean *et al.* 1990a y b; McLean *et al.* 1991; Nelson *et al.* 1991; Rivadeneyra *et al.* 1992). Otro aspecto destacado es el de la relación entre la calculogénesis renal de estruvita y las infecciones bacterianas (Griffith, 1978; McLean *et al.* 1988; Lerner *et al.* 1989; McLean *et al.* 1991).

La estruvita, se caracteriza por la diversidad de formas y hábitos cristalinos que es capaz de presentar, tanto en la forma de mineral como en los casos de fases artificiales. Esta peculiaridad ha merecido estudios eminentemente teóricos que tratan sobre las condiciones que afectan e intervienen en el hecho de que se presenten preferentemente unos tipos u otros de morfologías o hábitos cristalinos (Abbona y

Boistelle, 1979).

No obstante la amplia bibliografía sobre los estudios de la producción bacteriana de estruvita, no se había descrito hasta la fecha la producción de este mineral por mixobacterias. Esta circunstancia no deja de llamar la atención toda vez que, como ha quedado claramente expuesto en la Introducción de esta memoria, estas bacterias se encuentran en suelos ricos en materia orgánica en donde se dan las condiciones para la producción de estruvita.

De los resultados obtenidos cuando *M. coralloides* D se cultiva en los medios habituales de crecimiento (líquidos y sólidos), referidos en los apartados 1 y 3 de Resultados, es evidente que esta bacteria produce estruvita en todos ellos, y que la morfología presentada depende en gran parte de las condiciones utilizadas, como puede observarse en la Figura 4.

En todos los experimentos reseñados en esta memoria, la producción de estruvita es teóricamente posible, dado que los diferentes medios de cultivo ensayados aportan los iones PO_4^{3-} y Mg^{2+} , siendo el ion NH_4^+ producido por la bacteria durante su crecimiento como consecuencia del metabolismo de las fuentes nitrogenadas que forman parte de la composición de dichos medios de cultivo.

Una vez confirmada la producción de estruvita por *M. coralloides* D, los primeros estudios que se llevaron a cabo estuvieron encaminados a investigar la influencia del pH, la concentración de fosfatos, la fuente de magnesio y la concentración relativa de estos dos iones en los medios de cultivo sobre la producción de este mineral. Para estos estudios se emplearon medios líquidos, prescindiendo de los medios sólidos debido a que, como se vió en el apartado 1 del capítulo de Resultados, el procedimiento para la recuperación de los cristales en estos medios sólidos provoca la deshidratación y la amorfización de los mismos.

En relación a la influencia del valor del pH del medio de cultivo, se trabajó con

los medios CT y TT y sus variantes. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto las consideraciones que a continuación se comentan. La bacteria alcanza niveles mayores de crecimiento cuando se cultiva en medio CT. Para ambos tipos de medios cultivo (CT y TT) la máxima densidad óptica se obtiene a pH 6,5. De otra parte, se observa un comportamiento paralelo en ambos medios y sus variantes, siendo la lisis más pronunciada a pHs 6,5 y 6,8 que a los otros pHs ensayados. Los pHs finales alcanzados son, en todos los casos, alcalinos.

Los cristales producidos en todos estos casos corresponde a la estruvita, de acuerdo con los difractogramas de rayos X (figuras 12, 13, 14 y 15) y con los diagramas de microanálisis del SEM (Fig 17 a y h). Se han escogido estos difractogramas como modelo, pero en todos los demás casos los cristales obtenidos, bajo las distintas condiciones ensayadas, dan difractogramas que se corresponden con ellos. Las distintas intensidades relativas de los diferentes picos encontrados derivan de la forma de preparación de la muestra.

Como puede observarse, la estruvita se forma tanto bajo condiciones iniciales de cultivo ácidas como alcalinas, y los cristales aparecen cuando los pHs alcanzan valores de 7,5 y superiores. Estos hechos están de acuerdo con los hallazgos de Boistelle *et al.* (1984) quienes estudiaron la precipitación química de estruvita y con los de Pérez-García *et al.* (1989b), quienes investigaron la precipitación bacteriana de este mineral. Estos últimos autores mostraron que la estruvita es formada por varias especies bacterianas en cultivos con valores de pH iniciales comprendidos entre 5,0 y 9,0, pero siempre obteniéndose valores finales de pH alcalinos. De otra parte, en el caso de las piedras de riñón resultantes de infecciones urinarias causadas por microorganismos ureasa-positivos (Griffith, 1978; Lerner *et al.*, 1989; McLean *et al.*, 1988, 1990a y 1990b), se cree que la estruvita precipita como consecuencia de la alta alcalinidad producida por la actividad de la ureasa.

En los experimentos llevados a cabo para la realización de esta memoria, se observó que existe relación entre el valor de pH y el tiempo que los cristales tardan

en aparecer. En el caso de la bacteria objeto de estos ensayos, el crecimiento a pH 8,0 es prácticamente nulo, manteniéndose sin alteración el pH final del cultivo. En cuanto al comportamiento a los demás pHs ensayados, el incremento del mismo se debe a la liberación de iones NH_4^+ , como consecuencia del metabolismo bacteriano al utilizar el hidrolizado de caseína como fuente de carbono y nitrógeno. La liberación de este ion es necesaria en la producción de estruvita en estos medios de cultivo, ya que no está presente en ellos, y entra a formar parte en la composición del mineral.

En estos ensayos se encuentra que la mayor producción de estruvita se da a pH inicial de 6,5. Estos resultados discrepan con los obtenidos por Pérez-García *et al.* (1989b) y los de Hedelin *et al.* (1985) ya que encuentran que la mejor producción de estruvita se da a pH entre 7,0 - 8,0 y entre 7,5-8,0 respectivamente, (los primeros autores trabajando con distintas razas bacterianas productoras de estruvita y los segundos en la producción de estruvita a partir de orina sintética). Estas diferencias pueden explicarse, en el caso de producción bacteriana, teniendo en cuenta el mejor crecimiento bacteriano a distintos valores de pH, según las especies microbianas utilizadas y la pauta de crecimiento que siguen dependiendo de los casos. Sobre este aspecto se volverá más adelante. Baste ahora resaltar que la mayor producción de estruvita se encuentra cuando se inicia el crecimiento a pH 6,5, lo que conlleva la mayor densidad celular alcanzada y, junto con el crecimiento iniciado a pH 6,8, el proceso de autólisis más pronunciado. Comparando la producción en CT y en TT (y sus variantes en valor de pH), la producción es más elevada en CT, lo cual coincide con un mejor crecimiento en este medio, siendo, la pauta seguida en relación a la autólisis, la misma que en medio TT. Estos resultados, en cuanto a relación de cantidad de cristales producidos con el crecimiento bacteriano alcanzado, están de acuerdo con los de Pérez-García *et al.* (1989b y 1990).

De acuerdo con estos resultados, para el estudio de la influencia de la concentración de fosfato se eligió trabajar a pH 6,5. Los valores ensayados fueron de 5, 10, 20, 30 y 50 mM, usando el medio CT, y sus variantes CT-6, CT-7, CT-8 y CT-9, así como en el medio TT y sus variantes TT-6, TT-7, TT-8 y TT-9. Estos

resultados evidencian lo siguiente:

a) La mayor densidad celular se consigue en el medio CT, con concentración de fosfatos de 10 mM.

b) La autólisis es rápida en los medios CT y CT-6, que presentan concentraciones de fosfatos de 10 mM y de 5 mM respectivamente.

c) La autólisis se retarda notablemente a concentración de fosfatos superiores a 10 mM, siendo especialmente notable este retardo en los medios CT-8 y CT-9, cuyas concentraciones son 30 mM y 50 mM respectivamente.

En relación a la producción de cristales, identificados como estruvita, según se especificó en el apartado 3 de la sección de resultados, la mejor producción se da a concentraciones de 10 mM, y medio CT. Esto está razonablemente de acuerdo con los resultados obtenidos por Pérez-García *et al.* (1989a), quienes obtenían un mayor número de razas formadoras de estruvita y una mayor cantidad de cristales en medios con 2g de K_2HPO_4 por litro que en medios con 4g del mismo compuesto por litro, lo que se corresponde con 11,4 mM y 22,8 mM respectivamente.

En el caso objeto de estudio en esta memoria resulta significativo que, de una parte, se obtengan densidades celulares muy similares en los cultivos conteniendo concentraciones de fosfato de 10, 20, 30 y 50 mM. Pero, de otra parte, que sólo a concentración de fosfatos de 10 mM, en que la autólisis comienza muy pronto, se produzca una cantidad de cristales considerable. La influencia de la concentración de fosfatos en la autólisis de *M. coralloides* D fue estudiada por Fernández-Vivas *et al.* (1983) encontrando que concentraciones de fosfato de 40 mM inhiben por completo el proceso de autólisis.

Comparando estos resultados con los encontrados trabajando a distintos pHs, parece concluyente que, en el caso de *M. coralloides* D, no sólo influye en la

producción de estruvita el pH, la concentración celular alcanzada y la concentración de fosfato utilizada, sino que, además, parece que hay una influencia clara de la autólisis bacteriana. Esto resulta más patente al estudiar la influencia de la concentración de fosfato utilizada: la ausencia de autólisis, implica escasa producción de estruvita. Ello podría suponer que la bacteria libera durante la autólisis algún tipo de sustancia o resto celular que influiría decisivamente en la cristalización de la estruvita. Sobre este particular se volverá después.

Para estudiar la influencia de la fuente de magnesio y de la relación $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$ en la producción de estruvita, se decidió utilizar el medio CT y sus variantes CT-10, CT-11 y CT-12 para la fuente de magnesio y CT-13, CT-14, CT-15, CT-16, CT-17 y CT-18 para las distintas relaciones $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{Mg}^{2+}]$. Esta decisión se tomó en base al hecho de que los cristales producidos en el medio TT y sus distintas variantes, en cuanto a valores de pH y concentraciones de fosfato, aparecían tan sucios, envueltos e impregnados con los restos celulares del cultivo de *M. coralloides* D, que era prácticamente imposible limpiarlos, en la mayoría de los casos.

En relación a las fuentes de magnesio utilizadas (sulfato, cloruro, carbonato y acetato de magnesio), los ensayos se llevaron a cabo en medios con pH inicial de 6,5 y concentración de fosfato de 10 mM, toda vez que en los experimentos comentados anteriormente se había puesto de manifiesto que proporcionaban las mejores condiciones para la producción de estruvita. Como puede verse, en relación al crecimiento bacteriano, la mejor fuente es el sulfato magnésico. Con sulfato y cloruro magnésico, el crecimiento sigue curvas paralelas. Con acetato magnésico se retrasa el crecimiento y la autólisis, y el carbonato magnésico apenas permite crecimiento. En cuanto a la producción de estruvita, también la mejor fuente es el sulfato magnésico.

Esto está de acuerdo con los resultados de Pérez-García *et al.* (1989a) que encuentran que las mejores fuentes de magnesio son el sulfato y el cloruro.

Los estudios realizados ensayando distintas proporciones de $[\text{PO}_4^{3-}]$ y $[\text{Mg}^{2+}]$ indican que las condiciones óptimas para la producción de estruvita por *M. coralloides* D son las que se dan en el medio CT, o sea: 10 mM de $[\text{PO}_4^{3-}]$ y 4,06 mM de $[\text{Mg}^{2+}]$. Por lo demás, los resultados obtenidos, y que se muestran en la tabla 4 no son concluyentes en ningún sentido, salvo que la mejor producción coincide con la más temprana autólisis producida.

Todos los resultados discutidos hasta aquí parecían indicar que en el caso de la producción de estruvita por *M. coralloides* D la bacteria debía aportar durante la autoólisis algo que indujera la cristalización. Para dilucidar si sólo se trataba del aporte de NH_4^+ o de otro "factor" se diseñó la técnica de cultivarla en medios sólidos y líquidos utilizando membranas de celofán, como se describió en el apartado 3.1.3. de Material y Métodos. Los resultados, como se recoge en el apartado 6 correspondiente, fueron de lo más significativo. Sólo se producía estruvita donde estaba la bacteria. Así, en el caso de los medios de cultivo sólidos, sobre la película de celofán se desarrollaba la bacteria y aparecían los cristales. Pero no se detectaban en el medio de cultivo, o sea, al otro lado de la película de celofán. En los medios de cultivo líquidos, los cristales aparecían sólo en el medio en el que crecía la bacteria, o sea, en el que rodeaba a la bolsa de celofán, pero no dentro de ella, en la que el medio permanecía libre de bacterias. No obstante, los nutrientes difunden a través de los poros del celofán, como lo demuestra el hecho de que la bacteria crezca sobre esta película en el caso de los medios sólidos. De la misma manera, y en sentido inverso, difunden productos del metabolismo bacteriano, en concreto el ion NH_4^+ , como se deduce del hecho del cambio de pH reseñado en el apartado 6 de Resultados.

Por tanto, en el caso de *M. coralloides* D, para la producción de estruvita no basta con que estén presentes el PO_4^{3-} y el Mg^{2+} , que se suministran en el medio de cultivo, ni con que el metabolismo bacteriano promueva el pH idóneo (7 o más, de acuerdo con Boistelle *et al.* 1984 y Pérez-García *et al.* 1989b) y aporte el NH_4^+ necesario. Todo esto ocurre al otro lado de la película de celofán y no precipita estruvita. Aquí es preciso que esté presente la bacteria o, teniendo en cuenta que en

todos los casos antes comentados la mejor producción se da en relación con la más temprana y rápida autólisis, con algún resto bacteriano cuyo tamaño no le permite el paso a través de la membrana de celofán. En la bibliografía existe un caso en que se relaciona la autólisis con la producción de estruvita (Nelson *et al.*, 1991). Estos autores, trabajando con *Bacillus pumilus* encuentran que la cristalización se retrasa varias semanas, hasta que ocurre la lisis. Ellos lo interpretan en el sentido de que es el momento en que hay una mayor liberación de NH_4^+ , pero no lo relacionan con que la bacteria aporte algo más que NH_4^+ con su lisis. De otra parte Rivadeneyra *et al.* (1983) ya apuntaban a que la liberación de NH_4^+ no debía ser el único factor que intervenía en la producción de estruvita, debido a que encontraban que un alto porcentaje de razas bacterianas ensayadas por ellos (75%) producían NH_4^+ sin producir estruvita. Pero hasta el momento, la única prueba fehaciente de que es necesaria la presencia de la bacteria o de restos celulares sólo se ha obtenido trabajando con *M. coralloides* D, en los experimentos reseñados en esta memoria.

Todos los resultados discutidos hasta aquí apoyan la teoría que se viene defendiendo; es decir, la mayor producción de cristales se da coincidiendo con la mayor densidad celular alcanzada siempre y cuando ocurra la lisis de manera temprana. Estos dos hechos suponen, de una parte, el mayor aporte de NH_4^+ (a mayor tasa de metabolismo celular, mayor liberación de NH_4^+) y más rápido incremento del pH. De otra parte, cuanto más temprana sea lisis, antes se aportaría el "factor" necesario para la cristalización; además, cuanto mayor haya sido la densidad celular alcanzada, cabe pensar que en mayor cantidad será aportado. Igualmente, apoyan esta conclusión los hechos contrastados de que en los casos en que no existe lisis o ésta se retarda mucho, la cristalización es más pobre; aunque en estos casos se alcancen densidades celulares equiparables a las alcanzadas en medios CT y TT, lo cual supondría un aporte equivalente de NH_4^+ y un cambio, también equivalente, de pH. En este sentido, el hecho reseñado en el apartado 1 de Resultados, de que en los medios sólidos CTA y TTA los cristales se produzcan allí donde se deposita la gota de cultivo y donde las bacterias crecen, también soporta esta conclusión.

Puesto que parece claro el aporte de núcleos de cristalización por la bacteria, pareció de interés investigar los puntos donde se iniciaba la cristalización mediante microscopía electrónica de transmisión y difracción de electrones asociada. Para ello se tomaron cultivos de *M. coralloides* D de distintas edades, y en los que aún no se detectaba presencia cristalina a simple vista ni con microscopía óptica, y se prepararon las muestras según se describió en el apartado 5.1.2.b de Material y Métodos. Pudo observarse que en los cultivos de 45 horas aparecían células que en los extremos del bacilo mostraban una especie de bolsa (Figura 28a), y, además, se detectaban unas formaciones membranosas degenerativas (Figura 28b y c). Esto se interpretó como inicio de la lisis, y la presencia de estas formas membranosas como restos celulares originados en el proceso de autólisis. Cristales no fueron observados, pero al hacer incidir el haz de electrones sobre las distintas estructuras observadas, con frecuencia aparecía, en el caso de las formas membranosas, una imagen de difracción como la mostrada en la Figura 28d. No obstante, cuando se intentaba repetir la incidencia del haz electrónico en el mismo punto, no se detectaba la forma cristalina en la mayoría de los casos. Esto parece indicar que, de una parte, la cristalización se inicia sobre estas formas y, de otra, que en los tiempos ensayados los cristales estaban en una fase inicial y la incidencia sobre ellos del haz de electrones los destruía. Ahora bien, la imagen de cristalización observada corresponde al sistema hexagonal, por tanto no es estruvita, pero la información disponible no es suficiente para concluir de qué material se trataría. Podría ser vaterita (CaCO_3). En este caso, el calcio necesario procedería de las impurezas de los productos utilizados. No obstante, llama la atención la labilidad de los cristales. O bien, puede que no sean tan lábiles, sino muy pequeños y, por tanto, muy difícil volver a localizarlos. Sea del tipo de naturaleza que sea, lo cierto es que o desaparecen posteriormente o se pierden con los lavados, ya que nunca aparecieron en los difractogramas de los cristales estudiados formas cristalinas que pudieran corresponderse con estos cristales del sistema hexagonal. La eliminación podría suceder debido a estar ligados a los restos celulares que se eliminan durante la recogida y lavado de los cristales de estruvita. No se observaron, por este método, imágenes de difracción que pudieran corresponder a la estruvita. Por tanto, no pudo dilucidarse donde se iniciaba la

cristalización de la misma.

Morfologías cristalinas producidas

La estruvita se caracteriza, como se ha dicho, por la diversidad de formas y hábitos cristalinos que presenta, tanto el mineral como las formas artificiales. En el caso de la producida por *M. coralloides* D, la observación de los cristales de estruvita obtenidos en las distintas modalidades de cultivo, ponen de manifiesto una notabilísima variedad y riqueza de formas, no descritas para ninguna otra bacteria hasta ahora.

Se pueden observar formas prismáticas cortas (Figura 4a), con distribución irregular de las caras piramidales y un marcado carácter hemimórfico (figuras 4b y 4d), a menudo drusas (Figura 4c) y a veces girados con ángulos entrantes. Las maclas más frecuentes según [001] (Figura 4e).

Dada la estructura de la estruvita: grupos tetraédricos regulares PO_4^{3-} , grupos octaédricos distorsionados de $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ y grupos NH_4^+ , todos ellos unidos por enlaces de puentes de hidrógeno, se comprende su labilidad y papel principal de estos enlaces que, en principio, serían muy sensibles a las condiciones de pH y a las impurezas presentes en el medio, lo que supondría, de manera indirecta, la influencia de estas variables en la morfología de los cristales.

El estudio sistemático de morfologías de estruvita ya citado, llevado a cabo por Abbona y Boistelle (1979), siguiendo la teoría de los PBC (cadenas de enlaces periódicos) de Hartman y Perdok (1955) les hace concluir a los autores, entre otras cosas, lo siguiente:

1º.- Que las caras más frecuentes deben ser: (010), (001), (011), (101) y (111), y sus complementarias h,k,j.

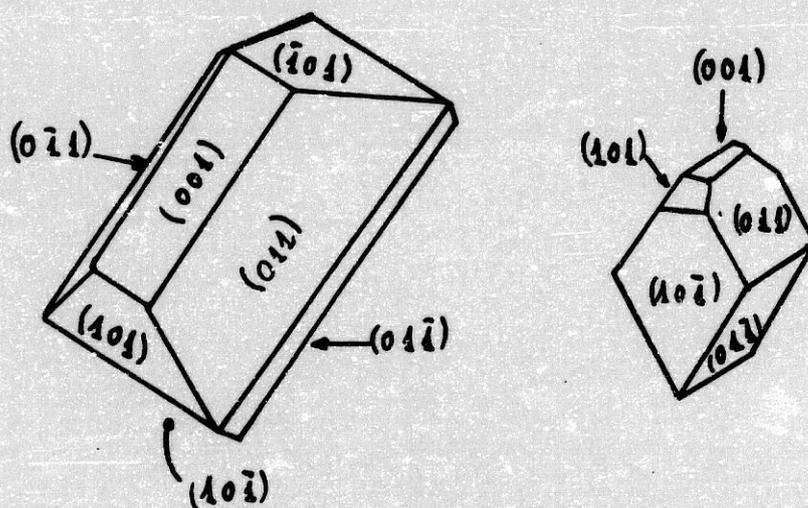
2º.- Que sobresaturaciones muy elevadas favorecen las maclas múltiples según (011) y el alargamiento de los cristales según [100], y que esto mismo ocurre a pH mayor que 8,0.

3º.- A sobresaturaciones más bajas los cristales son alargados según el eje [100] y la forma {011} es la más desarrollada, presentando los extremos de [100] terminados por {110} algo mayores que los {101}.

Estudiando los cristales producidos por *M. coralloides* D en las distintas condiciones ensayadas, se puede decir que los resultados obtenidos están razonablemente de acuerdo con estas conclusiones de Abbona y Boistelle (1979).

Así, encontramos:

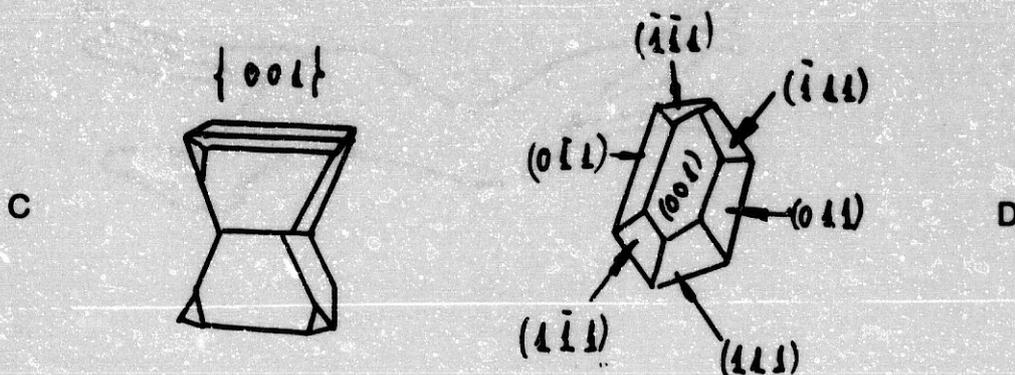
A.- Cristales euédricos, con desarrollo de (001) y no de (001). Cristales de este tipo aparecen en las figuras 23c y 24a y b.



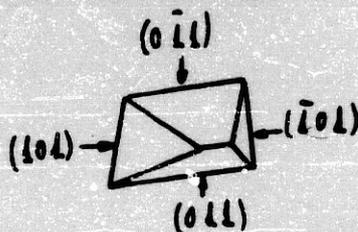
B.- Marcado carácter hemiédrico, (figuras 4d, 24c y d, 25b y 27c). Formas prismáticas cortas, con distribución irregular de las caras y un marcado hábito hemimórfico (figura 4a).

C.- Maclas según {001}, que aparecen con frecuencia (figura 4e)

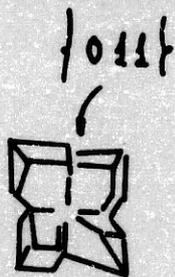
D.- Otros, cristales, bastante holoédricos (Figura 24b).



E.- Mayor desarrollo de las caras (011), como puede verse en las figuras 26a y d y 25 c (este con un aspecto muy llamativo).



F.- Agrupaciones regulares, posibles maclas según {011}. La macla de la figura 23h, que se observa con frecuencia, es de este tipo, pero vista lateralmente.



G.- Cristales elongados según [100], maclas múltiples según {011}. Figuras 23f y 23e (este menos desarrollado).

H.- Agrupaciones de diversos tipos. Figuras 23b, 23i (cristal muy sucio por presencia de restos celulares y velo del cultivo), 25d, 26b, c, f, g, i y 27a.

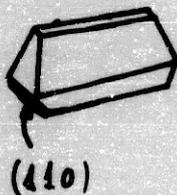
I.- Drusas (figuras 4b y c).

J.- Formas en tolva, como las de la Figura 23d.

K.- Formas no comunes, como la de la Figura 23g.

L.- Formas alteradas, o parcialmente alteradas, como puede observarse en las figuras 4b, 23a, 25a, 27b y d.

M.- Los de la figura 26e y h, podrían corresponder a la forma, dibujada más abajo, vistos por detrás.



Todo esto vendría explicado, teniendo en cuenta que la bacteria aportaría posibles núcleos heterogéneos de cristalización, que según las condiciones del cultivo y el momento de la lisis podrían ofrecer algunas variaciones. Esto proporcionaría distintas morfologías, según las condiciones que se den, por gradientes espacio temporales diferentes de los distintos iones PO_4^{3-} , Mg^{2+} , NH_4^+ , de acuerdo con las condiciones de cultivo. También intervendrían las impurezas del medio (distintos cationes y aniones, y restos celulares diversos).

Las coincidencias con las conclusiones de Abbona y Boistelle (1979) son especialmente patentes en el caso de las caras que predominan y en las formas mencionadas en el apartado G. Estas formas, como se dijo en Resultados, se dan cuando la concentración de fosfatos es de 0,02 M o superior. Además, se dan en medios sólidos con celofán, donde cabe pensar que el NH_4^+ producido por la bacteria alcanzará concentraciones locales elevadas antes de difundir al otro lado de la película de celofán. En los medios líquidos esta difusión será más rápida, y la concentración local de NH_4^+ no debe llegar a ser tan elevada como en el caso mencionado de utilización de medios sólidos y membranas de celofán.

En relación a la intervención de los aniones presentes, parece muy clara su influencia en la morfología de los cristales. Así, en el caso de utilizar carbonato magnésico, se obtienen los cristales de las figuras 24a y 24b que sólo se han detectado con esta fuente de magnesio. Cuando la fuente de magnesio utilizada es el cloruro magnésico o el acetato magnésico se dan morfologías que a nivel de observación no aparecen como cristalinas, figuras 27d y 27b respectivamente. Salvo estos casos mencionados y la producción de drusas, que sólo se ha detectado en medio TT en reposo y que se muestra en la figura 4c, las demás morfologías aparecen con mayor o menor frecuencia, según se indicó en resultados. Además, en unas mismas condiciones pueden detectarse diferentes morfologías. Esto debe indicar que en el proceso de cristalización, las condiciones espacio-temporales de concentraciones y gradientes de los distintos iones producidas (como consecuencia del metabolismo y la lisis celular) deben tener gran influencia. Esta influencia parece ser mayor que la de las características iniciales del medio de cultivo, salvo las excepciones indicadas. Por otro lado, las formas alteradas podrían ser indicativas de haber sufrido una deshidratación parcial.

Otras formas cristalinas producidas por *M. coralloides* D

Como se indicó en el apartado 4 de la sección de Resultados, en el caso de la obtención de cristales en medios líquidos en reposo se detectaron junto con la estruvita otros minerales, según se deduce de los difractogramas de rayos X obtenidos. En concreto, como allí se dijo, newberyita, schertelita y taylorita. Estos fosfatos y sulfatos son considerados como minerales singenéticos con la estruvita, que se encuentran acompañándola en los depósitos de guano (Dana, 1966). En cuanto a una posible relación entre su formación y la acción bacteriana, sólo existen algunas referencias indirectas para el caso de la newberyita, que aparece asociada con la estruvita en algunos cálculos renales asociados con infecciones microbianas de las vías urinarias (Sutor, 1968; Dosch y Koestel, 1975; Bana y Krallik, 1980).

De acuerdo con los difractogramas en que aparecen picos y/u hombros

correspondientes a estos minerales, cabe pensar que la proporción en que se producen en los cultivos estáticos de *M. coralloides* D representa una baja cantidad en relación con la estruvita producida (posiblemente de orden del 5% o menos). De otra parte, de todos los cultivos estáticos estudiados, la newberyita y la schertelita eran detectadas en el 43% de los casos y la taylorita en el 14%.

En las figuras 19, 20, 21 y 22 se presentan diagramas en los que puede observarse, junto con los picos correspondientes a la estruvita, otros que corresponden con los minerales antes citados. Otros picos correspondientes a estos minerales no aparecen porque se solapan con los de estruvita y, al estar ésta en mucha mayor proporción, los enmascara. De otra parte, su presencia no puede deducirse de los diagramas de microanálisis obtenidos con el microscopio electrónico de barrido, debido a que los iones que los componen son los mismos que los de la estruvita, y el K^+ suele aparecer siempre en pequeña cantidad (véase diagrama de la figura 17a).

Bajo las condiciones ensayadas, la producción de estos minerales por la bacteria es, teóricamente, posible debido a la composición de los medios de cultivo. El NH_4^+ requerido para la formación de schertelita y taylorita es aportado por el metabolismo bacteriano, de igual modo que para la estruvita.

En relación a la newberyita, se sabe que su origen puede derivar de una alteración de la estruvita (Whitaker, 1968). En la mayor parte de los casos la presencia de este mineral en cálculos renales se atribuye a un proceso de envejecimiento y descomposición de la estruvita (Lonsdale y Sutor, 1966; Sutor, 1968).

Como se ha dicho, estos minerales que podemos considerar secundarios en relación con la estruvita, sólo se detectaron en cultivos estáticos. En estos casos, como se indicó en Resultados, los cristales se recogen después de 20-22 días, mientras que en el caso de los cultivos en agitación la recolección se hacía a los 10-

12 días. Esto podría suponer que en el primer caso la estruvita formada podría ser más susceptible a la descomposición que en el caso de cultivos en agitación, lo que podría explicar la presencia de la newberyita en los cultivos estáticos. En cuanto a la schertelita y la taylorita, parece ser que la bacteria favorece las condiciones para su producción.

En relación con estos minerales secundarios surge una pregunta, ¿Por qué no se detectan siempre que se dan las mismas condiciones, sino unas veces sí y otras no, en los porcentajes indicados?. Teniendo en cuenta los numerosos casos estudiados, y la baja proporción en que se detectan frente a la estruvita, la explicación podría estar en este segundo hecho: al ser muy baja su proporción, en muchos casos los picos de los difractogramas correspondientes a ellos podrían quedar enmascarados por los del difractograma de la estruvita y, por tanto, posiblemente su presencia es más general de lo que se detecta. A pesar de las dificultades para su detección, es interesante que por primera vez se haya encontrado la producción de schertelita, newberyita y taylorita por una bacteria.

Presencia de formas no cristalinas

Como se indicó en el capítulo 5 de Resultados, al hacer las observaciones de los cristales obtenidos con el microscopio electrónico de barrido, se detectaban frecuentemente formas no cristalinas de aspecto pilliforme, tubular o acintados (Figura 18). El microanálisis de estas formas revela, según los diagramas de la Figura 17, la posible presencia de estruvita, en más o menos proporción, y de otros iones. Aparte del K, aportado con los componentes de los medios de cultivo, los elementos detectados (Cl, S, Si, Ca, Al, y Na), si tenemos en cuenta las impurezas que acompañan a los productos utilizados en los medios de cultivo y reseñadas en el apéndice 1 de Material y Métodos, están presentes aunque en muy baja cantidad. En cuanto al Si puede provenir del vidrio de los matraces, de acuerdo con Kranskopf (1967). En efecto, según este autor la solubilización del Si a partir de sílice amorfa es de 140 ppm a pH 7 y a 25°C, incrementándose dicha solubilización con el aumento

de la temperatura y del pH. En cuanto al Al, podría provenir de contaminación.

Los resultados reseñados aquí, pondrían de manifiesto que la bacteria promueve la precipitación de estos iones, concentrándolos, en formaciones de tipo tubular, pilliforme, o acintadas, lo que posiblemente ocurra sobre los restos celulares que se originan como consecuencia de la autólisis. Este es un aspecto interesante de los resultados obtenidos en este trabajo, ya que supone una especial capacidad de sustraer y concentrar iones presentes en el medio por parte de esta bacteria o sus restos celulares. En realidad, el hecho de la captación y unión de iones por microorganismos es frecuente y existe abundante información bibliográfica sobre este tema. De manera particular es un hecho estudiado por los investigadores que buscan "materiales" selectivos y eficientes para la purificación de efluentes contaminados por iones peligrosos, mediante la utilización de las propiedades de adsorción de los microorganismos. Se ha demostrado con distintos tipos de iones y de microorganismos que la unión es debida a la adsorción físico-química de los iones a la célula más que a cualquier metabolismo del elemento, estando bien documentado que la biomasa de distintos microorganismos muertos es capaz de adsorber distintos tipos de iones (*Escherichia coli*, Beveridge y Koval, 1981; *Bacillus subtilis*, Beveridge y Murray, 1976; biomasa fungica, Galun *et al.*, 1982; *Chlorella regularis*, Nakajima *et al.*, 1981; *Rhizopus arrhizus*, Tsezos y Volesky, 1981, 1982a y b, 1983, Tobin *et al.*, 1984; *Saccharomyces cerevisiae* y *Pseudomonas aeruginosa*, Strandberg *et al.*, 1981; *Rhizopus oligosporus*, Castro *et al.*, 1992.). Pero además, muchos de estos autores, después de matar las células mediante calor, muelen la biomasa, con lo cual están utilizando células muertas y rotas (Tobin *et al.*, 1984; Castro *et al.*, 1992, Tsezos y Volesky 1982a y b). Así, los resultados obtenidos en este trabajo caen dentro de la lógica de estos procesos de adsorción de iones. Al darse la circunstancia de la precipitación de estos iones estando en tan baja concentración, cabe pensar que *M. coralloides* D sería un microorganismo especialmente efectivo para procesos de eliminación de iones en aguas contaminadas por los mismos, lo que abre nuevas perspectivas al empleo y utilidad de este microorganismo.

A modo de resumen, en este trabajo se describe, por primera vez, la producción de estruvita por una mixobacteria, en concreto *M. coralloides* D, en los medios de cultivo habituales de esta bacteria tanto sólidos como líquidos, y tanto en reposo como en agitación. La estruvita se presenta en una extraordinaria variedad de morfologías, hábitos cristalinos, y formación de drusas, en un grado de diversidad no descrito para otra bacteria. Para la producción de estruvita por *M. coralloides* D, no basta con el suministro del ión NH_4^+ , y de provocar un pH alcalino en el medio de cultivo, sino que es precisa la aportación por parte de la bacteria de algunos restos celulares que actúen como núcleos heterogéneos de cristalización y que son liberados en el proceso de autólisis típico de esta bacteria. De ahí que, las condiciones que favorecen la autólisis, inducen la producción de estruvita. Además, *M. coralloides* D es capaz de producir cantidades menores de newberyita, schertelita y taylorita, considerados singenéticos con la estruvita, siendo la primera vez que se describe la producción de estos minerales por una bacteria. De otra parte, *M. coralloides* D produce cantidades pequeñas de formas no cristalinas de tipo tubular, piiforme, acintado o completamente amorfo, en las que se detecta, junto con mayor o menor cantidad de estruvita, la precipitación de otros elementos, tales como K, Ca, Si, S, Cl y Al. Con excepción del potasio, que se aporta al medio de cultivo, los otros elementos se consideran como impurezas. Esto indica que la bacteria puede ser capaz de concentrar y precipitar con gran eficacia estos elementos, posiblemente sobre restos celulares.

Estos resultados son muy interesantes puesto que revelan que restos celulares o células muertas de *M. coralloides* D puede actuar como núcleos heterogéneos de cristalización, induciendo la cristalización en aquellos ambientes donde esta no ocurre espontáneamente aunque estén presentes los distintos componentes. Este proceso pudo haber ocurrido en el pasado y estar teniendo lugar hoy día en la formación de depósitos de estruvita. El hecho de ser descrito para una bacteria como *M. coralloides* D (esta memoria) y *Azotobacter* or *Pseudomonas* (Rivadeneira *et al.* 1992) puede dar una idea del amplio rango de este fenómeno.

Finalmente, en el caso de las mixobacterias, y en nuestro caso *M. coralloides* D, este proceso reviste una singular importancia. Así, el comportamiento social durante el ciclo de desarrollo que conduce a la formación de cuerpos fructificantes conlleva una lisis masiva de las células, etapa considerada como parte integral del ciclo de vida de las mixobacterias. Este hecho, considerando su abundancia en suelos ricos en materia orgánica y restos vegetales en descomposición, apoya la hipótesis de que esta bacteria puede jugar un importante papel en los procesos de biomineralización, especialmente en la precipitación de estruvita en la naturaleza.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.-

1ª.- Se describe, por primera vez, la producción de estruvita por una mixobacteria, en concreto *Myxococcus coralloides* D, en los medios de cultivo habituales de esta bacteria tanto sólidos como líquidos, y tanto en reposo como en agitación. En este sentido la producción óptima se da en el medio CT, bajo las siguientes condiciones: a) pH inicial del cultivo 6,5 y pH final 8,6; b) fuente de magnesio, el sulfato magnésico; c) una relación fosfato/magnesio de 10mM/4,06 mM y d) casitone como fuente de nitrógeno y energía. Además la bacteria es capaz de producir estruvita en cantidades menores en a) un rango de pH inicial que va desde 6,0 a 8,0, b) en un rango de concentración de fosfato de 5mM a 30 mM y c) con una concentración de magnesio comprendida entre 4,06 mM y 20 mM, siendo capaz de utilizar distintas fuentes de magnesio, tales como carbonato, cloruro y acetato.

2ª.- La estruvita producida por *Myxococcus coralloides* D, según las distintas condiciones ensayadas, presenta una extraordinaria variedad de morfologías, hábitos cristalinos y formación de drusas, en un grado de diversidad no descrito para otra bacteria.

3ª.- Para la producción de estruvita por *Myxococcus coralloides* D, no basta con el suministro del ión amonio, y de provocar un pH alcalino en el medio de cultivo, sino que es precisa la aportación por parte de la bacteria de algunos restos celulares que actúen como núcleos heterogéneos de cristalización y que son liberados en el proceso de autólisis típico de esta bacteria. De ahí que, las condiciones que favorecen la autólisis, inducen la producción de estruvita.

4ª.- *Myxococcus coralloides* D es capaz de producir en medios de cultivo líquidos estáticos, junto con la estruvita, cantidades menores de fosfatos y sulfatos considerados singenéticos con este mineral, concretamente newberyita, schertelita y taylorita. Es la primera vez que se describe la producción de estos minerales por una bacteria.

5ª.- *Myxococcus coralloides* D produce, además, cantidades pequeñas de formas no cristalinas de tipo tubular, piliforme, acintado o completamente amorfo, en las que se detecta, junto con mayor o menor cantidad de estruvita, la precipitación de otros elementos, tales como potasio, calcio, silicio, azufre, cloro y aluminio. Con excepción del potasio, que se aporta al medio de cultivo, los otros elementos se consideran como impurezas. Esto indica que la bacteria puede ser capaz de concentrar y precipitar con gran eficacia estos elementos, posiblemente sobre restos celulares.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Abbona, F. and Bolstelle, R. 1979. "Growth morphology and crystal habit of struvite crystals ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)". *J. Crys. Growth* 46: 339-354.

Abbona, F., Lundager Madsen, H.E. and Bolstelle, R. 1982. "Crystallization of two magnesium phosphates, struvite and newberyite: Effect of pH and concentration". *J. Crys. Growth* 57: 6-14.

Adolphe, J.P. and Marechal, C. 1980. "Etude comparee de la cristallogenes bacterienne experimentale et naturelle". Reunion sur Carbonates. Communication hors fascicule. Bordeaux.

Adroher, F.J., Osuna, A. and Lupiañez, J.A. 1988. "Struvite ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) crystal formation by *Trypanosoma cruzi* in culture". *Chemosphere* 17: 609-615.

Agnihotrudu, V., Barna, G.C.S. and Barna, K.C. 1959. "Ocurrence of *Chondromyces* in the rhizcsfere of plants". *Indian Phytopathology* 12: 158-160.

-
- Agullar, J., Ramos-Cormenzana, A. and Ruiz Berraquero, F. 1978.** "Contribution to the study of crystal formation processes by bacteria". Proceedings of the Fifth International Working Meeting on Soli Micromorphology. Granada 1: 139-163.
- Arias, J.M. and Montoya, E. 1978.** "Dispersed growth and cell lysis in *Myxococcus coralloides* D". Microbios letters 5: 81-84.
- Arias, J.M. y Montoya, E. 1982.** "Influencia de la luz sobre los ciclos de vida de *Myxococcus coralloides* D". Microbiología española 35: 13-20.
- Arias, J.M., Almendral, J.M. and Montoya, E. 1979a.** "Two methods of large scale extraction of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides* D". Microbios 25: 19-23.
- Arias, J.M., Fernández-Vivas, A. and Montoya, E. 1983.** "Evidence for a activating substance related to autolysis in *Myxococcus coralloides* D". Arch. Microbiol. 134: 164-166.
- Arias J.M., Rodríguez, C. and Montoya, E. 1979b.** "Production and partial characterization of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides* D". J. Antibiot. (Tokio) 32: 205-211.
- Arias, J.M., Rodríguez, C. and Montoya, E. 1979c.** "Biological activity of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides* D". Microbios 24: 123-131.
- Arnold, J.W. and Shimkets, L.J. 1988a.** "Inhibition of cell-cell interactions in *Myxococcus xanthus* by Congo red". J. Bacteriol. 170: 5765-5770.
- Arnold, J.W. and Shimkets, L.J. 1988b.** "Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 170: 5771-5777.
-

Bacon, K. and Rosenberg, E. 1967. "Ribonucleic acid synthesis during morphogenesis in *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 94: 1883-1889.

Bacon, K., Clutter, D., Kottel, R.H., Orłowski, M and White, D. 1975. "Carbohydrate accumulation during myxospore formation in *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 124: 1635-1636.

Bana, J. and Krallik, J. 1980. "Mineralogical methods for detection of Kidney stones". Vesmir 59: 179-182.

Bancroft, I., Wolk, C.P. and Oren, E.V. 1989. "Physical and genetic maps of the genome of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120". J. Bacteriol. 171: 5940-5948.

Baur, E. 1905. "Myxobakterien-studien". Archiv. Protisten kunde 5: 92-1211.

Beavon, J. and Heatley, N.G. 1962. "The occurrence of struvite (magnesium ammonium phosphate hexahydrate) in microbial culture". J.Gen. Microbiol. 31: 167-169.

Beebe, J.M. 1943. "Studies on the myxobacteria. 3. The utilization of carbohydrates". Iowa State Coll. J. Sci. 17: 227-240.

Behmlander, R.M. and Dworkin, M. 1991. "Extracellular fibrils and contact-mediated cell interactions in *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 173: 7810-7821.

Benhamú, C., Arias, J.M. y Montoya, E. 1979. "Efecto de la glucosa sobre el crecimiento de *M. coralloides* D". Ars pharmaceutica 3: 237-246.

Berry, L.G. 1974. "Selected Powder Diffraction Data for Minerals: Data Books". Joint Committee on Powder Diffraction Standards, Philadelphia.

Beveridge, T.J. and Koval, S.F. 1981. "Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12". *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 325-335.

Beveridge, T.J. and Murray, R.G.E. 1976. "Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*". *J. Bacteriol.* **127**: 1502-1518.

Billy, C. 1980. "Problèmes posés par le métabolisme de quelques bactéries calcifiantes aérobies". I. étude d'une association bactérienne alophile productrice d'aragonite en milieu marin. *Vie milieu* **30**: 165-169.

Black, M. 1933. "The precipitation of calcium carbonate on the great Bahama Bank". *Geol. Mag.* **70**: 455-466.

Boggild, O.B. 1911. "Struvit fra Limfjorden". *Medd. Dansk Geol. Foren.* **3**: 25-32.

Boistelle, R., Abbona, F., Berland, Y., Grandvullemin M. and Olmer, M. 1984. "Les domaines de nucleation du phosphate ammoniacomagnésien dans des urines steriles, alcalines o acides". *Nephrologie* **5**: 217-221.

Boistelle, R., Abbona, F. and Lundager Madsen, H.E. 1983. "On the transformation of struvite into newberyite in aqueous systems". *Phys. and chemis. Minerals* **9**: 216-222.

Boquet, E., Boronat, A. and Ramos-Cormenzana, A. 1973. "Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon". *Nature (London)* **246**: 527-529.

Bretscher, A.P. and Kaiser, D. 1978. "Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium". *J. Bacteriol.* **133**: 763-768.

Brock, T.D. 1973. "Biology of microorganisms", 2nd ed. Prentice hall, Englewood Cliffs. N.J.

Brockman, E.R. 1976. "Myxobacters from arid Mexican soils of the Alaskan and Canadian arctic". J. Bacteriol. 86: 605-606.

Brockman, E.R. and Boyd, W.L. 1963. "Myxobacteria from soil of the Alaskan and Canadian arctic". J. Bacteriol. 86: 605-606.

Brown, N.L., Burchard, R.P., Morris, D.W., Parish, J.H., Stow, N.D. and Tsopanakis, D. 1976. "Phage and defectives phages of strains of *Myxococcus*". Arch. Microbiol. 108: 271-279.

Bryan, G.W. and Gibbs, P.E. 1980. "Metals in neired *Polychaetes*: the contribution of metals in the jaws to the total body burden". J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 60, 641-654.

Buchard, A.C., Buchard, R.P. and Kloetzel, J.A. 1977. "Intracellular periodic structures in the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 132: 666-672.

Burns, J.R. and Finlayson, B. 1982. "Solubility product of magnesium ammonium phosphate hexahydrate at various temperatures". J. Urol. 128: 426-428.

Campos, J.M. and Zusman, D.R. 1975. "Regulation of development in *Myxococcus xanthus*: effect of 3',5' cyclic AMP, ADP and nutrition". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 518-522.

Castro, F., Viedma, P. y Cotorás, D. 1992. "Biomasa de *Rhizopus oligosporus* como adsorbente de iones metálicos". Microbiología SEM 8: 94-105.

Chen, H., Kessler, J.M. and Shimkets, L.J. 1990. "Genome size of

Myxococcus xanthus determined by pulsed-field gel electrophoresis". J. Bacteriol. 172: 4206-4213.

Chillingar, G.V., Bissell, H.J. and Wolf, K.H. 1967. "Diagenesis in sediments. Developments in sedimentology. Diagenesis of carbonate rocks". Vol. 8. Elsevier. Pn. Co. Amsterdam.

Clark, W.M. 1948. "Topics in Physical Chemistry". Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.

Cotter, D.A. and Raper, K.B. 1966. "Spore germination in *Dictyostelium discoideum*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56: 880-887.

Cumsky, M. and Zusman, D.R. 1979. "Myxobacterial hemagglutinin, a development-specific lectin of *Myxococcus xanthus*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5505-5509.

Cumsky, M. and Zusman, D.R. 1981. "Binding properties of Myxobacterial hemagglutinin". J. Bio. Chem. 256: 12596-12599.

Dana, E.S. 1966. "Dana's textbook of Mineralogy", 4th edn. ed. W. E. Ford. New York: John Wiley and sons.

Dawid, W. 1978. "Fruchtkörper-bildende Myxobakterien in Böden Brasiliens". Z.Allg.Mikrobiol. 18: 83-93.

Dawid, W. 1979. "Vorkommen und verbreitung fruchtkörper-bildender Myxobakterien in Siebengebirge". Z. Allr. Mikrobiol. 19: 705-719.

Devereux, R., Delaney, M., Widdel, F. and Stahl, D.A. 1989. "Natural relationships among sulfate-reducing eubacteria". J. Bacteriol. 171: 6689-6695.

Dhundale, A.R., Furuichi, T., Inouye, S. and Inouye, M. 1985. "Distribution of multicopy single-stranded DNA among myxobacteria and related species". *J. Bacteriol.* 164: 914-920.

Dobson, W.J., McCurdy, H.D. and McRae, T.H. 1979. "The function of fimbriae in *Myxococcus xanthus*. II. The role of fimbriae in cell-cell interactions". *Can. J. Microbiol.* 25: 1359-1372.

Doetsch, R.N. and Cook, T.M. 1973. "Introduction to bacteria and their ecobiology". University Park Press. Baltimore, Md.

Domka, F. and Gaslowek, J. 1975. "Role of microorganisms in the reduction of sulfates to form sulfur deposits in the Carpathian region". *Przegl. Geol.* 23: 61-65.

Dosch, W. and Koestel, C. 1975. "Scanning electron microscopy of urinary calculus". *Z. Urol. Nephrol.* 68: 25-41.

Drew, G.H. 1911. "The action of some denitrifying bacteria in tropical and temperate seas, and the bacterial precipitation of calcium carbonate". *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 9: 142-155.

Drew, G.H. 1913. "On the precipitation of calcium carbonate in the sea by marine bacteria, and the action of denitrifying bacteria in tropical and temperate seas". *J. Mar. Biol. Assoc.* 9: 479-524.

Dworkin, M. 1962. "Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 84: 250-257.

Dworkin, M. 1969. "Sensitivity of gliding bacteria to actinomycin D". *J. Bacteriol.* 96: 851-852.

Dworkin, M. 1972. "The Myxobacteria: New directions in studies of procariotic development". C.R.C.Crit. Rev. in Microbiol. 1: 435-452.

Dworkin, M. 1973. "Cell-Cell interactions in the Myxobacteria". In Microbial differentiation. Soc. Gen. Microbiol. Symp., edited by J.M. Ashworth, J.E. Smith. Cambridge. Cambridge University Press, vol 23, pp. 125-142.

Dworkin, M. and Gibson, S.M. 1964. "A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus*". Science 146: 243-244.

Dworkin, M. and Niederpruem, D.J. 1964. "Electron transport system in vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 87: 316-322.

Ehrlich, H.L. 1990. "Geomicrobiology". Ed. Marcel Dekker Inc. New York.

Elías, M. 1989. "Germinación en *Myxococcus xanthus*". Tesis doctoral. Universidad de Murcia.

Ennever, J., Vogel, J.J. and Levy, B.M. 1974a. "Lipid and bone matrix calcification in vitro". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145: 1386-1388.

Ennever, J., Vogel, J.J. and Streckfuss, J.L. 1974b. "Calcification by *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 119: 1061-1062.

Fárez-Vidal, E., Fernández Vivas, A. and Arias, J.M. 1990. "Amylase programming during the life cycle of *Myxococcus coralloides* D". J. Appl. Bacteriol. 69: 119-124.

Fárez-Vidal, E., Arias, J.M. and Fernández-Vivas, A. 1992. "Production of α -amilase by *Myxococcus coralloides* D". J. Appl. Bacteriol. 73: 148-156.

Fautz, E., Grotkjahn, L. and Reichenbach, H. 1981. "2 and 3 hidroxy fatty acids as valuable chemosystematic markers in gliding bacteria". In *The Flavobacterium Cytophaga group*, edited by H. Reichenbach, O.B. Weeks, Weinheim: Verlag chemie.

Fautz, E., Rosenfelder, G. and Grotjahn, L. 1979. "Iso-branched-2-and3-hydroxy fatty acids as characteristics constituents of some gliding bacteria". *J. Bacteriol.* 140: 852-858.

Fernández-Vivas, A., Arias, J.M. and Montoya, E. 1983. "Autolysis in *Myxococcus coralloides* D". *FEMS Microbiol. Letters* 20: 97-101.

Fernández-Vivas, A. Arias, J.M. and Montoya, E. 1985. "Lysis induced by uncoupling agents in *Myxococcus coralloides* D". *FEMS Microbiol. Letters* 27: 99-102.

Ferron Vilchez, C., Rivadeneyra, M.A., Pérez-García, I. y Ramos-Cormenzana, A. 1984. "Precipitación de calcita y estruvita por bacterias aisladas de las aguas del pantano de Cubillas". *Ars. Pharmaceutica. Tomo XXV-3*: 341-348.

Furuichi, T., Dhundale, A., Inouye, M and Inouye, S. 1987a. "Branched RNA covalently linked to the 5' end of a single-stranded DNA in *Stigmatella aurantiaca*: structure of msDNA". *Cell* 48: 47-53.

Furuichi, T., Inouye, S. and Inouye, M. 1987b. "Biosynthesis and structure of a stable branched RNA covalently linked to the 5' end of multicopy single-stranded DNA of *Stigmatella aurantiaca*". *Cell* 48: 55-62.

Filer, D., Kindler, S.H. and Rosenberg, E. 1977. "Myxospore coat synthesis in *Myxococcus xanthus*: enzymes associated with uridine 5'-diphosphate-N-acetylgalactosamine formation during myxospore development". *J. Bacteriol.* 166: 666-669.

Filer, D., Rosenberg, E. and Kindler, S.H. 1973. "Aspartokinase of *Myxococcus xanthus*: Feedback stimulation by required aminoacids". J. Bacteriol. 115: 745-750.

Finck, G. 1950. "Biologische und stoffwechselphysiologische studien aus *Myxococcaceae*". Arch. Mikrobiol. 15: 358-388.

Fluegel, W. 1963. "Fruiting chemotaxis in *Myxococcus fulvus* (Myxobacteria)". Proc. Minn. Acad. Sci. 32: 120-123.

Fowler, V.J., Widdel, F., Pfenning, N., Woese, C.R. and Stackebrandt, E. 1986. Phylogenetic relationships of sulfate-sulfur-reducing eubacteria. Syst. Appl. Microbiol. 8:32-41.

Galun, M., Keller, P., Malki, D., Feldestein, H., Galun, E., Siegel, S.M. and Siegel, B.Z. 1982. "Removal of uranium (VI) from solution by fungal biomass and fungal wall-related biopolymers". Science 219: 285-286.

Geitler, L. 1925. "Über *Polyangyrum parasiticum* n. sp. eine submerse, parasitische *Myxobacteriaceae*". Arch. Protistenkunde 50: 879.

Gill, J.S. and Dworkin, M. 1986. "Cell surface antigens during submerged development of *Myxococcus xanthus* examined with monoclonal antibodies". J. Bacteriol. 168: 505-511.

Gilmore, D.F. and White, D. 1985. "Energy-dependent cell cohesion in myxobacteria". J. Bacteriol. 161: 113-117.

Glaessner, M.F. 1976. "Early phanerozoic annelid worms and their geological and biological significance". J. Geol. Soc. London 132, 259-275.

Gnospeilius, G. 1978a. "Purification and preparations of an extracellular protease from *Myxococcus virescens*". J. Bacteriol. 133: 17-25.

Gnospeilius, G. 1978 b. "Myxobacterial slime and proteolytic activity". Arch. Microbiol. 166 : 51-59.

González, F., Arias, J.M. and Montoya, E. 1987. "Phosphates activities in the life cycle of *Myxococcus coralloides* D". Gen. Microbiol. 133: 2327-2332.

González, F., Arias, J.M. and Montoya, E. 1990. "In situ assay of *Myxococcus coralloides* D phosphatases". Microbios 61: 121-126.

González, F., Fárez-Vidal, E., Martínez-Cañamero, M.M. and Arias, J.M. 1994. "Localization of acid and alkaline phosphatases in *Myxococcus coralloides* D". Letters in applied microbiology 18: 264-267.

González, F., Montoya, M.D., Fárez-Vidal, E., Arias, J.M. and Montoya, E. 1990. "Effects of phosphate on antibiotic and extracellular protein production by *Myxococcus coralloides* D". Applied Microbiology and Biotechnology 33: 78-80.

González, F., Muñoz, J., Arias, J.M. and Montoya, E. 1989. "Polyphosphate and ortophosphates content during the life cycle of *Myxococcus coralloides* D". FEMS Microbiol. Lett. 65: 105-108.

Gräf, W. 1975. "Myxobakterien der gattung *Myxococcus* als indirekte fäkalstoffindikatoren in oberflächengewässer". I. Mitteilung. Zentralblatt für bakterologie, parasiten kunde, infektionkrankhetiten und hygiene. I. Abteilung Originale B 160: 28-39.

Greenfield, L.J. 1963. "Metabolism and concentration of calcium and magnesium and precipitation of calcium carbonate by marine bacterium". Ann. N.Y.

Acad. Sci. 109: 23-45.

Grenabo, L., Brorson, J.E., Hedelin, H. and Pettersson, S. 1984. "Ureoplasma urealyticum induced crystallization of magnesium ammonium phosphate and calcium phosphates in synthetic urine". J.Urol. 132: 795-799.

Griffith, D.P. 1979. "Struvite stones". Kidney Int. 13: 372-332.

Griffith, D.P. and Musher, D.M. 1978. "Urease: principal case of infection stones". In H. Fleish (ed.) Urolithiasis Research. Plenum Press.

Griffith, D.P., Musher, D.M. and Itin, C. 1976. "Urease the primary cause of infection-induced urinary stones". Inves. Urol. 13: 2346-350.

Hagen, D.C., Bretscher, A.P. and Kaiser, D. 1978. "Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*". Dev. Biol. 64: 284-296.

Handschuh, G.J. and Orgel, L.E. 1973a. "Urease: principal case of infection stones". In H. Fleish (Ed.). Urolithiasis research. Plenum Press.

Handschuh, G.J. and Orgel, L.E. 1973b. "Struvite and prebiotic phosphorylation". Science 179: 483-484.

Harcke, E., Huttermann, A. and Kuhlwein, H. 1971. "Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (Myxobacterales;) I. Purification and some properties of the bacteriolytic and proteolytic activity". Arch. Microbiol. 77: 86-95.

Harcke, E., Hutterman, A. and Kuhlewin, H. 1972. "Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (Myxobacterales) II. Identification of the bacteriolytic enzima as a muramidase". Arc. Microbiol. 85: 6-12.

Hartman, P. and Perdok, W.G. 1955. "Relations between structure and morphology of crystals". *Acta Cryst.* 8: 49-52.

Haska, G. 1974. "Extracellular lytic enzymes of *Mixococcus virescens*, IV. Purification and characterization of a D-alanyl-E-N-lysine endopeptidase". *Physiol. Plant.* 31: 251-256.

Haskä, G. and Stahl, S. 1971. "Variants of *Myxococcus virescens* exhibiting dispersed growth. Growth and production of extracellular enzymes and slime". *Physiol. Plant.* 24: 136-142.

Hedelin, H., Grenabo, L. and Petterson, S. 1985. "Urease induced crystallization in synthetic urine". *J.Urol.* 133: 529-532.

Hirsch, H.J. 1977. "Bacteriocins from *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*)". *Arch. Microbiol.* 115: 45-49.

Hodgkin, J. and Kaiser, D. 1977. "Cell-to-cell stimulation of movement in non-motile mutants of *Myxococcus*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2938-2942.

Hodgkin, J. and Kaiser, D. 1979a. "Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (*Myxobacterales*): genes controlling movements of singles cells". *Mol.Gen. Genet.* 171: 167-172.

Hodgkin, J. and Kaiser, D. 1979b. "Genetics of gliding motility in *M. xanthus* (*Myxobacterales*): two gene systems control movement". *Mol. Gen. Genet.* 171: 177-191.

Hook, L.A. 1977. "Distribution of myxobacters in aquatic habitats in an alkaline bog". *Appl. Env. Microbiol.* 34: 333-335.

-
- Huddleson, F. and Winter, O.B. 1927. "Magnesium ammonium phosphate crystals in aerobic cultures of *Brucella abortus* and *B. melitensis*". J. Infect. Dis. 40: 476-478.
- Hutchison, J.G.P. 1961. "Crystals in colonies of *Staphylococcus aureus*". J. Path. Bact. 82: 214-217.
- Inouye, M., Inouye, S. and Zusman, D.R. 1979a. "Gene expression during development of *Myxococcus xanthus*". Pattern of protein synthesis. Dev. Biol. 68: 579-591.
- Inouye, M., Inouye, S. and Zusman, D.R. 1979b. "Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development specific protein of *Myxococcus xanthus*". Proc. Natl. Sci. USA 76: 209-213.
- Inouye, S., Herzer, P.J. and Inouye, M. 1990. "Two independent retrons with highly diverse reverse transcriptases in *Myxococcus xanthus*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 942-945.
- Inouye, S., Hsu, M.Y., Eagle, S. and Inouye, M. 1989. "Reverse transcriptase associated with the biosynthesis of the branched RNA-linked msDNA in *Myxococcus xanthus*". Cell 56: 709-717.
- Inouye, S., Thomas, R. and Inouye, M. 1985. "Mikrotubulin like organelle from *Myxococcus xanthus*". 12th International Conf. Biol. Myxobacteria. California.
- Irschik, H. and Reichenbach, H. 1985a. "An unusual pattern of carbohydrate utilization in *Coralloccoccus (Myxococcus) coralloides (Myxobacterales)*". Arch. Microbiol. 142: 40-44.
-

Irachik, H. and Reichenbach, H. 1985b. "The mechanism of action of myxovalargin A, a peptide antibiotic from *Myxococcus fulvus*". J. Antibiot. 38: 1237-1245.

Janssen, G. and Dworkin, M. 1985. "Cell-cell interactions in developmental lysis of *Myxococcus xanthus*". Dev. Biol. 112: 194-202

Jeffers, E.E. 1964. "Myxobacters of a freshwater lake and its environs". Int. Bull. Bacterial Nomenclature Taxonomy 14: 115-136.

Johnson, J.L., and Ordal, E.J. 1968. "Deoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity". J. Bacteriol. 95: 893-900.

Jones, D. and Wilson, M.J. 1986. "Biomineralization in crustose lichens". Syst. Assoc. Spec. 30: 91-105.

Kaiser, D. 1979. "Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5952-5956.

Kaiser, D. 1986. "Control of multicellular development: *Dictyostelium* and *Myxococcus*". Ann. Rev. Genet. 20: 539-566.

Kaiser, D. and Crosby, C. 1983. "Cell movement and its coordination in swarms of *Myxococcus xanthus*". Cell Motility 3: 227-245.

Kaiser, D., Manoil, C. y Dworkin, M. 1979. "Myxobacteria: cell interactions, genetic and development". Annu. Rev. Microbiol. 33: 595-639.

Katz, W. and Stominger, J.L. 1967. "Structure of the cell wall of *Micrococcus lysodeikticus*. II. Study of the structure of the peptides produced after lysis with the

myxobacterium enzyme". *Biochem. J.* 6: 930-937.

Keller, K.H., Grady, M. and Dworkin, M. 1983. "Surface tension gradients: Feasible model for gliding motility in *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 155: 1358-1366.

Kleser, M.H., Kleser, T. and Hopwood, D.M. 1992. "A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome". *J. Bacteriol.* 174: 5496-5507.

Kleinig, H. 1972. "Membranes from *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*) containing carotenoid glycosides. I. Isolation and composition". *Biochim. Biophys. Acta.* 274: 489-498.

Kleinig, H., Reichenbach, H. and Achenbach, H. 1970. "Carotenoid pigments of *Stigmatella aurantiaca* (*Myxobacterales*). II. Acylated carotenoid glucosides". *Arch. Mikrobiol.* 74: 223-234.

Klockmann, F. y Ramdohr, P. 1961. "Tratado de mineralogía". 2ª ed. Ed. G.G. S.A. Barcelona.

Kohl, W., Gloc, A. and Reichenbach, H. 1983. "Steroids from the myxobacterium *Nannocystis excedens*". *J. Gen. Microbiol.* 129:1629-1635.

Koisto, A.B., Gronstad, A. and Oppengaard, H. 1990. "Physical map of the *Bacillus cereus* chromosome". *J. Bacteriol.* 172: 3821-3825.

Komano, T., Brawn, N., Inouye, S. and Inouye, M. 1982. "Phosphorylation and methylation of proteins during *Myxococcus xanthus* spore formation". *J. Bacteriol.* 151: 114-118

- Komano, T., Inouye, S. and Inouye, M. 1980. "Patterns of proteins production in *Myxococcus xanthus* during spore formation induced by glicerol, dimethyl sulfoxide and phenethyl alcohol". J. Bacteriol. 144: 1076-1082.
- Kranskopf, K.B. 1967. In "Introduction to Geochemistry". McGraw Hill Book Company.
- Kroos, L., Kuspa, A. and Kaiser, D. 1986. "A global analysis of developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus*". Dev. Biol. 117: 252-266.
- Krumbeln, W.E. 1974. "On the precipitation of aragonite on the surface of marine bacteria". Naturwiss 61: 167.
- Krzemieniewska, H and Krzemieniewski, S. 1927a. "Über die verbreitung der Myxobakterien in Boden". Acta Soc. Bot. Pol. 5: 102-139
- Krzemieniewska, H. and Krzemieniewski, S. 1927b. "Die Myxobakterien von Polen, Anhang". Acta. Soc. Bot. Pol. 5: 102-139.
- Krzemieniewska, H. and Krzemieniewski, S. 1930. "Mikrobakterje Polski". Czesc trzecia (Die Myxobakterien von Polen. Teil III) Acta Soc. Bot. Polon. 5: 250-273.
- Kühlwein, H. 1960. "Zur Systematik und Verbreitung der Myxobakterien". Zentralbl. Bakteriol. Abt. 2 113: 480-490.
- Kusnetzov, S.I. 1963. "The role of microbes in genesis and weathering of sulfur deposits". Symposium on Marine Microbiology Springfield. Illinois, USA 172.
- Kusnetzov, S.I., Ivanov, M.V. and Lyalikova, N.N. 1962. "Introduction to geological microbiology". Mc Graw-Hill book company, Inc. New York.
-

Lampson, B.C. 1993. "Retrons elements of the Myxobacteria": In Myxobacteria II. Ed. Dworkin, M. and Kaiser, D. Ann. Soc. Microbiol. Washington, D.C.

Lampson, B.C., Sun, J., Hsu, M.Y., Vallejo-Ramírez, J., Inouye, S. and Inouye, M. 1989. "Reverse transcriptase in a clinical strain of *E. coli*: its requirements for the production of branched RNA-linked msDNA". *Science* 243: 1033-1038.

Lanier, W.P. 1987. "A myxobacteria-like microbial fossil from the 2.0 billion year old Gunflit formation Canada". XIV International Conference of the Biology of the Myxobacteria. Pringree Park Colorado..

LaRossa, R., Kuner, J., Hagen, D., Manoll, C. and Kaiser, D. 1983. "Developmental cell interactions of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants". *J. Bacteriol.* 153: 1394-1404.

Leadbeater, B.S.C. and Riding, R. (eds) 1986. *Syst. Assoc. Spec. Vol 30*, 1-401.

Leblond, P., Francou, F.X., Simonet, J.M. and Decaris, B. 1990. "Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of *Streptomyces ambofaciens* strains". *FEMS Microbiol. Lett.* 72: 79-88.

Lerner, S.P., Gleeson, M.J. and Griffith, D.P. 1989. "Infection stones". *J. Urol.* 141-753.

Lim, D. and Maas, W.K. 1989. "Reverse transcriptase dependent synthesis of a covalently linked, branched DNA-RNA compound in *E. coli* B". *Cell* 56: 891-904.

Loebbeck, M.E. and Klein, H.P. 1956. "Substrates for *Myxococcus virescens* with special reference to eubacterial fractions". *J. Gen. Microbiol.* 14: 281-289.

Lonsdale, K. and Sutor, D.J. 1966. "Newberyite in ancient and modern urinary calculi: Identification and space group". *Science* 154: 1353-1354.

Lowenstam, H.A. 1962. "Goethite in radular teeth of recent marine gastropods". *Science* 137: 279-280.

Lowenstam, H.A. 1963. "Biological problems relating to the composition and diagenesis of sediments". In *The Earth Sciences. Problems and Progress in Current Research*. (T. W. Donnelly, ed.), pp. 137-195. Univ. of Chicago Press, Chicago.

Lowenstam, H.A. 1981. "Minerals formed by organisms". *Science* 211, 1126-1131.

Lowenstam, H.A. and Weiner, S. 1983. "Mineralization by organisms and the evolution of biomineralization". In *Biomineralization and Biological Metal Accumulation*. (P. Westbroek and E.W. de Jong, eds.). Riedel, Dordrecht, The Netherlands.

Lowenstam, H.A. and Weiner, S. 1989. "On Biomineralization". Ed. Oxford Univ. Press, Inc. New York.

Lucas, J. and Prevot, L. 1984. "Synthèse de L'apatite par voie bactérienne à partir de matière organique phosphatée et de divers carbonates de calcium dans des eaux douce et marine naturelles". *Chem. Geol.* 42: 101-118.

Lucas, J. and Prevot, L. 1985. "The synthesis of apatite by bacterial activity: Mechanism". *Sci. Geol. Med.* 77: 83-92.

Ludwig, W., Scheleifer, K.H., Reichenbach, H. and Stackebrandt, E. 1983 "A phylogenetic analysis of the Mixobacteria: *Myxococcus fulvus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Cystobacter fuscus*, *Sorangium cellulosum* and *Nannocystis exedens*". *Arch. Microbiol.* 135: 58-62.

Maeba, P.Y. 1983. "Iodination of *Myxococcus xanthus* during development". J. Bacteriol. 155: 1033-1041.

Malone, P.G. and Towe, K.M. 1970. "Microbial carbonate and phosphate precipitates from sea water cultures". Marine Geol. 9: 301-309.

Mandel, M. and Leadbetter, E.R. 1965. "Deoxyribonucleic acid composition of myxobacteria". J. Bacteriol. 90: 1795-1796.

Mann, S. 1983. "Mineralization in biological systems". Struct. Bonding. Berlin 54: 125-174.

Mann, S. 1988. "Molecular recognition in biomineralization". Nature 332: 119-124.

Manoll, C. and Kaiser, D. 1980a. "Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and mixospore formation". J. Bacteriol. 141: 297-304.

Manoll, C. and Kaiser, D. 1980b. "Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development". J. Bacteriol. 141: 305-315.

Manoll, C. and Kaiser, D. 1980c. "Purine-containing compounds, including cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate, induced fruiting of *Myxococcus xanthus* by nutritional imbalance". J. Bacteriol. 141: 374-377.

Martínez-Cañamero, M.M. 1986. "Desoxirribonucleasas producidas por *Myxococcus coralloides* D". Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada.

Martínez-Cañamero, M.M., Extremera, A.L., Muñoz, J. and Arias, J.M. 1993.

"DNase activity during the life cycle of *Myxococcus coralloides* D and *Myxococcus xanthus*". Soil Biol. Biochem. 25: 825-827.

Martínez-Cañamero, M.M., Muñoz, J., Extremera, A.L. and Arias, J.M. 1991. "The oxyribonuclease activities in *Myxococcus coralloides* D". J. Applied Bacteriol. 71: 170-175.

Mason, O.J. and Powelson, D. 1958. "Lysis of *Myxococcus xanthus*". J. Gen. Microbiol. 19: 65-70.

Mayer, H. and Reichenbach, H. 1978. "Restriction endonucleases: General survey procedure and survey of gliding bacteria". J. Bacteriol. 136: 708-713.

MacRae, T.H. and McCurdy, H.D. 1975. "Ultrastructural studies of *Chondromyces crocatus* vegetative cells". Can. J. Microbiol. 21: 1815-1826.

MacRae, T.H. and McCurdy, H.D. 1976. "The isolation and characterization of gliding motility mutants in *Myxococcus xanthus*". Can. J. Microbiol. 22: 1282-1292.

McBride, M.J., Hartzell, P. and Zusman, D.R. 1993. "Motility and tactic Behavior of *Myxococcus xanthus*": In Mixobacteria II. Ed. Dwerkin, M. and Kaiser, D. Ann. Soc. Microbiol. Washington, D.C.

McCallum, M.F. and Guhathakurta, K. 1970. "The precipitation of calcium carbonate from seawater by bacteria isolated from Bahama Bank sediments". J. Appl. Bacteriol. 33: 649-655.

McClune, W.F., ed. 1989. "Powder diffraction file". Swarthmore, PA: Joint Committee on Powder Diffraction Standards, International Centre for Diffraction Data.

McCurdy, H.D. 1969. "Studies on the taxonomy of the *Myxobacterales*". I.

Record of Canadian isolates and survey of methods. *Can. J. Microbiol.* 15: 1453-1461.

McCurdy, H.D. 1989. "Fruiting gliding bacteria: In the myxobacteria". In J.T. Staley, M.P. Bryant, N.Pfenning, and J.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bact.*

McCurdy, H.D. and Khouw, B.T. 1969. "Studies on *Stigmatella brunea*". *Can.J. Microbiol.* 15: 731-738.

McCurdy, H.D. and Mc Rae, T.M. 1974. "Xanthacin, a bacteriocin of *Myxococcus xanthus* fb". *Can. J. Microbiol.* 20: 131-135.

McCurdy, H.D. and Wolf, S. 1967. "Deoxyribonucleic acid base composition of fruiting *Myxobacterales*". *Can. J. Microbiol.* 13: 1707-1708.

McLean, R.J.C., Downey, J., Clapham, L. and Nickel, J.C. 1990a. "A simple technique for studying struvite crystal growth in vitro. *Urol. Res.* 18: 39-43.

McLean, R.J.C., Downey, J., Clapham, L. and Nickel, J.C. 1990b. "Influence of chondroitin sulfate, heparin sulfate and citrate on *Proteus mirabilis*-induced struvite crystallization in vitro". *J. Urol.* 144: 1267-1271.

McLean, R.J.C., Downey, J., Clapham, L., Wilson, J.W.L. and Nickel, J.C. 1991. "Pyrophosphate inhibition of *Proteus mirabilis* induced struvite crystallization in vitro". *Clin. Chim. Acta.* 200: 107-118.

McLean, R.J.C., Nickel, J.C., Cheng, K.J. and Costerton, J.W. 1988. "The ecology and pathogenicity of urease-producing bacteria in the urinary tract". *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 16: 37-79.

McVittie, A., Messik, F. and Zahler, S.A. 1962. "Development biology of *Myxococcus*". J. Bacteriol. 84: 546-551.

Montoya, M.D. 1988. "Producción, actividad biológica y actividad *in vivo* de los antibióticos producidos por *Myxococcus coralloides* D". Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Montoya, M.D., Gálvez, A., Arias, J.M. and Montoya, E. 1994. "Autolytic effect of the antibiotic produced by *Myxococcus coralloides* D". Microbiología española (En prensa).

Morita, R.Y. 1980. "Calcite precipitation by marine bacteria". Geomicrobiol. J. 2: 63-82.

Morris, D.W. and Parish, J.M. 1976. "Restriction in *Myxococcus virescens*". Arch. Microbiol. 108: 227-230.

Morrison, C.E. and Zusman, D.R. 1979. "*Myxococcus xanthus* mutants with temperature-sensitive, stage-specific defects: evidence for independent pathways in development". J. Bacteriol. 140: 1036-1042.

Muñoz, J., Arias, J.M. y Montoya, E. 1984. "Production and properties of a bacteriocin from *Myxococcus coralloides* D". J. Appl. Bacteriol. 57: 69-74.

Muñoz, J., Extremera, A.L., Arias, J.M. and Montoya, E. 1987. "Biological properties of the phage tail-like particles from *Myxococcus coralloides* D". FEMS Microbiology Letters 48: 79-82.

Muñoz, J., González, F., Martínez-Cañamero, M.M., Golcochea, A.M., Extremera, A.L. and Arias, J.M. 1989. "Deoxyribonuclease and phosphatase activity in myxobacteria". Microbios 58: 43-47.

Nakajima, A., Horikoshi, T. and Sakaguchi, T. 1981. "Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XVII. Selective accumulation of heavy metal ions by *Chloralla regularis*". *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12: 76-83.

Nancollas, G.H. (ed) 1982. "Biological mineralization and demineralization". pp. 1-415. Springer-Verlag. Berlin.

Nelson, B., McCarthy, G. and Bromel, M. 1983. "Struvite formation in colonies of *Bacillus*". *Proc. N. D. Acad. Sci.* 37: 99.

Nelson, B., Stuble, J. and McCarthy, G. 1991. "*In vitro* production of struvite by *Bacillus pumilus*". *Can. J. Microbiol.* 37: 978-983.

Neuman, B., Pospiech, A. and Schairer, H.U. 1992. "Size and stability of the genomes of the myxobacteria *Stigmatella aurantiaca* and *Stigmatella erecta*". *J. Bacteriol.* 174: 6307-6310.

Nicaud, J.M., Breton, A., Younes, G. and Guespin-Michel, J. 1984. "Mutants of *Myxococcus xanthus* impaired in protein secretion: an approach to study of a secretory mechanism". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 344-350.

Noren, B. 1952. "Further notes on the distribution of myxobacteria in swedish soils". *Su. Bot. Tidskr.* 46: 446-453.

Noren, B. 1955. "Studies on myxobacteria. III. Organic factors in nutrition". *Startryck Bot. Notiser.* 106: 81-134.

Normore, W.M. 1976. "Guanine-plus-cytosine (GC) composition of the DNA of bacteria, fungi, algae, and protozoa", p. 65-232. In G.D. Fasman (ed.), *CRC Handbook of Biochemistry and molecular Biology*, 3rd ed., vol II CRC press, Cleveland.

-
- Novitsky, J.A. 1981. "Calcium carbonate precipitation by marine bacteria". *Geomicrobiol. J.* 2: 375-388.
- Ochman, H. and Wilson, A.C. 1987. "Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genome". *J. Mol. Evol.* 26: 74-86.
- O'Connor, K.A. and Zusman, D.R. 1987. "Reexamining the role of autolysis in the developmental cycle of *Myxococcus xanthus*". XIV. International conference of the Biology of the Myxobacteria. Pingree Park. Colorado.
- Omori, M. and Watabe, N. (eds) 1980. "The mechanisms of Biomineralization", pp. 1-415. Springer-Verlag, Berlin.
- Oppenheimer, C.H. 1961. "Note on the formation of spherical aragonitic bodies in the presence of bacteria from Bahama Bank". *Geochim. Cosmochim. Acta* 23: 295-297.
- Orndorff, P.E. and Dworkin, M. 1980. "Separation and properties of the cytoplasmic and outer membranes of vegetative cells of *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 141: 914-927.
- Orndorff, P.E. and Dworkin, M. 1982. "Synthesis of several membrane proteins during developmental aggregation in *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 149: 29-39.
- Oyaizu, H. and Woese, C.R. 1985. "Phylogenetic relationships among the sulfate respiring bacteria, myxobacteria and purple bacteria". *Syst. Appl. Microbiol.* 6: 257-263.
- Palache, C., Berman, H. and Frondel, C. 1951. "En Dana's System of mineralogy". 27th Edition. Wiley, New York, N.Y. 1124 pp.
-

Passador, L. and Mc Curdy, H.D. 1985. "Cyclic nucleotides and development of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants". *Curr. Microbiol.* 12: 289-297.

Pérez-García, I. 1988. "Formación de estruvita por bacterias". Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Pérez-García, I., Rivadeneyra, M.A., Quevedo-Sarmiento, J. and Ramos-Cormenzana, A. 1990. "Struvite formation by *Arthrobacter* sp. and *Pseudomonas* sp.: The influence of agitation". *Chemosphere* 20: 243-251.

Pérez-García, I., Rivadeneyra, M.A. and Ramos-Cormenzana, A. 1989a. "Influence of magnesium source and magnesium phosphate concentration on bacterial struvite formation". *Microbios letters* 42: 129-134.

Pérez-García, I., Rivadeneyra, M.A. and Ramos-Cormenzana, A. 1989b. "The influence of pH on struvite formation by bacteria". *Chemosphere* 18: 1633-1638.

Pérez-López, J.A., Rodríguez, C. and Montoya, E. 1978. "Repression of proteolytic enzymatic system in *Myxococcus xanthus*". *Microbios letters* 6: 27-31.

Peterson, J.E. 1959. "New species of myxobacteria from the bark of living trees". *Mycologia* 51: 163-172.

Piggot, P.J. 1973. "Mapping of asporogenous mutations of *Bacillus subtilis*: a minimum estimate of the number of sporulation operons". *J. Bacteriol.* 114: 1241-1253.

Postgate, J.R. 1984. "The sulphate-reducing bacteria. 2^a ed. Cambridge University". Press. Cambridge. 208 pp.

Qualls, G.T., Stephens, K. and White, D. 1978. "Light-stimulated

morphogenesis in the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*". *Science* 20: 444-445.

Qualls, G.T. and White, D. 1982. "Development cell cohesion in *Stigmatella aurantiaca*". *Arch. Microbiol.* 131: 334-337.

Ramos-Cormenzana, A. 1975. "Formation of calcite crystals by bacteria of the genus *Bacillus*". *Microbios* 13: 61-70.

Reichenbach, H. 1965a. "Untersuchungen an *Archangium violaceum*". Ein Beitrag Zurkenntnis der Myxobakterien. *Biologie in unserer zeit.* 4: 33-45.

Reichenbach, H. 1965b. "Rhythmische Vorgänge bei der schwarmentwicklung von Myxobacteria". *Berichte der deutschen Botanischen Gesellschaft.* 78: 102-105.

Reichenbach, H. 1966. "*Myxococcus* spp. (Myxobacterales). Schwarmentwicklung und Bildung von Protocysten". *Publikationen zu wissenschaftlichen Filmen.* Göttingen 1A: 557-578.

Reichenbach, H. 1984. "Myxobacteria: a most peculiar group of social prokaryotes", en *Myxobacteria: Development and cell interactions*, Rosenberg, E., Ed. Springer-Verlag New York.

Reichenbach, H. 1986. "The myxobacteria: common organisms with an uncommon behavior". *Microbiol. Sci.* 3: 268-274.

Reichenbach, H. 1993. "Biology of the Myxobacteria: Ecology and Taxonomy": In *Myxobacteria II.* Ed. Dworkin, M. and Kaiser, D. *Ann. Soc. Microbiol.* Washington, D.C.

Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1969. "Studies on *Stigmatella aurantiaca*"

(*Myxobacterales*)". J. Gen. Microbiol. 58: 3-14.

Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1981. "The order *Myxobacterales*. In The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria". Ed. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, H.G. Schlegel. Berlin. Springer-Verlag.

Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1981. "Introduction to the gliding bacteria". En The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria". Ed. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, H.G. Schlegel. Springer-Verlag. Berlin.

Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1991. "The myxobacteria". In A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (ed.), The Prokaryotes, 2nd ed. Springer-Verlag, New York. *Microbiology*, vol 3. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Reichenbach, H., Gerth, K., Irschik, H., Kunze, B. and Holfe, G. 1988. "Myxobacteria: a new source of antibiotics". Bio. Technol. 6: 115-121.

Reichenbach, H. and Kleinig, H. 1971. "The carotenoids of *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*)". Arch. Mikrobiol. 76: 364-380.

Reichenbach, H. and Kleinig, H. 1984. "Pigments of myxobacteria". In E. Rosenberg (ed.), *Myxobacteria: Development and Cell Interactions*. Springer-Verlag, New York.

Rivadeneira, M.A., García-Cervigón, A., Pérez-García, I. y Ramos-Cormenzana, A. 1986. "Síntesis de dolomita por una cepa de *Pseudomonas putida* aislada del suelo". Revista lat. amer. Microbiol. 29.

Rivadeneira M.A., González López, J. and Ramos-Cormenzana, A. 1985a. "Influence of ammonium ions on calcite and struvite formation by *Azotobacter* in

chemically defined media". *Folia microbiol.* 30: 55-57.

Rivadeneira, M.A., Pérez-García, I., Calvo, C. and Ramos-Cormenzana, A. 1989. "Struvite crystal precipitation by different phenotypes of *Yersinia*". *Folia Microbiol.* 34: 485-489.

Rivadeneira, M.A., Pérez-García, I. and Ramos-Cormenzana, A. 1992. "Influence of ammonium ion on bacterial struvite production". *Geomicrobiol. J.* 10: 125-137.

Rivadeneira, M.A., Pérez-García, I., Salmerón, V. and Ramos-Cormenzana, A. 1985b. "Bacterial precipitation of calcium carbonate in presence of phosphate". *Soil. Biol. Biochem.* 17: 171-172.

Rivadeneira, M.A., Ramos-Cormenzana, A. and García-Cervigón, A. 1983. "Bacterial formation of struvite". *Geomicrobiology Journal*, Vol. 3, Number 2: 151-163.

Rivadeneira, M.A., Ramos-Cormenzana, A. y García Cervigón, A. 1985c. "Influencia de la temperatura en la precipitación de carbonato calcico". *Revista lat. amer. Microbiol.* 27: 105-107.

Rivadeneira, M.A., Ramos-Cormenzana, A. and García-Cervigón, A. 1987. "Formation of bobierita (magnesium phosphate) crystal aggregates by *Acinetobacter sp.*". *Mineral. J.* 13. 443-447.

Robinson, H. 1889. "On the formation of struvite by microorganisms". *Proc. Cambr. Phil. Soc.* 6: 360-362.

Rodríguez, C y Montoya, E. 1980. "Enzimas proteolíticos y bacteriolíticos producidos por *Myxococcus xanthus*". *Anales de Edafología y Agrobiología XXXIX:* 169-176.

Rodríguez, C., Arias, J.M. and Montoya, E. 1979. "Demonstration of cell surface enzymes with esterase activity in *Myxococcus xanthus*". *Microbios letters* 8: 129-132.

Romeo, J.M. and Zusman, D.R. 1987. "Cloning of the gene for myxobacterial hemagglutinin and isolation and analysis of structural gene mutations". *J. Bacteriol.* 169: 3801-3808

Rosenberg, E., Filer, D., Zafriti, D. and Kindler, S.M. 1973. "Aspartokinase activity and the development cycle of *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 115: 29-34.

Rosenberg, E., Keller, K.L. and Dworkin, M. 1977. "Cell density dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein". *J. Bacteriol.* 129: 770-777.

Rosenberg, E. and Varon, M. 1984. "Antibiotics and lytic enzymes". In *Myxobacteria: Development and cell interactions*. Rosenberg, E., Ed. Springer-Verlag, New York pp 109-125.

Rosenbluh, A. and Eisenbach, M. 1992. "The effect of mechanical removal of pili on gliding motility in *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 174: 5406-5413.

Rosenfelder, G., Luderitz, O. and Wetsphal, O. 1974. "Composition of lipopolysaccharides from *Myxococcus fulvus* and other fruiting and no-fruiting myxobacteria". *Eur. J. Biochem.* 44: 411-420.

Rückert, G. 1973. "Biogeographische Untersuchungen über die Verbreitung Fruchtkörperbildender Myxobakterien in Island". *Acta Bot.* 2:56-63

Rückert, G. 1978. "Myxobakterien in substraten aus ariden gebieten unter besonderer berücksichtigung Südwestafrikas". *Namib und Meer* 8: 53-66.

Rückert, G. 1979. "Myxobakterien-artenspektren von böden in abhängigkeit von bodenbildenden faktoren unter besonderer berücksichtigung der bodenreaktion". Z. Pflanzenernährung Bodenkunde 142: 330-343.

Rudd, K. and Zusman, D.R. 1979. "Rifampin resistant mutants of *Myxococcus xanthus* defective in development". J. Bacteriol. 137: 295-300.

Rulz-Rodríguez, C. 1980. "Enzimas lipásicos de *Myxococcus xanthus* MD4". Memoria de licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Runham, N.W., Thornton, P.R., Shaw, D.A. and Wayte, R.C. 1969. "The mineralization and hardness of the radular teeth of the limpet *Patella vulgata*". L. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 99: 608-626.

Sabados-Sarié, A. 1957. "Istrazivanja o miksobakterijama u thina Jugoslavije (Myxobacteria in different types of soils in Yugoslavia)". Jugos. Akademija Znanosti Umjetnosti. Zagreb 312: 5-29.

Schmid-Lorenz, W. and Kuhlwein, H. 1968. "Intracelluläre Bewegungsorganellen der Myxobakterien". Arch. Microbiol. 60: 95-98.

Schopf, J.W. 1978. "The evolution of the earliest cells". Sci. Ann. 239: 111-138.

Schopf, J.W., Hayes, J.M. and Walter, M.R. 1983. "Evolution of earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems". In J.W. Schopf (ed.), Earth's Earliest Biosphere: Its Origin and Evolution. Princeton University Press, Princeton, N.J.

Schröder, J. and Reichenbach, H. 1970. "The fattyacid composition of vegetative cells and myxospores of *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales)". Erch. Mikrobiol. 71: 384-390.

Seldler, R.J., Mandel, M. and Baptist, J.N. 1972. "Molecular heterogeneity of the *Bdellovibrios*: evidence of two new species". *J. Bacteriol.* 109: 209-217.

Shabtai, Y., Rosenberg, E. and Kindler, S.H. 1975. "Aspartokinase isoenzymes of the fruiting myxobacterium *Myxococcus xanthus*". *Biochem Biophys. Acta* 403: 345-354.

Shimkets, L.J. 1984. "Nutrition, metabolism and the initiation of development. (En *Myxobacteria*: Development and cell interactions". Ed. E. Rosenberg. Springer-Verlag. New York.

Shimkets, L.J. 1986a. "Correlation of energy-dependent cell cohesion with social motility in *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 166: 837-841.

Shimkets, L.J. 1986b. "Role of cell cohesion in *Myxococcus xanthus* fruiting body formation". *J. Bacteriol.* 166: 842-846.

Shimkets, L.J. 1987. "Control of morphogenesis in *Myxobacteria*". *C.R.C. Critical Reviews in Microbiology* 14: 195-227.

Shimkets, L.J. 1990. "Social and developmental biology of the myxobacteria". *Microbiol. Rev.* 54: 473-501.

Shimkets, L.J. 1993. "The myxobacterial genome". En *Myxobacteria II*. Eds. M. Dworkin and D. Kaiser. American Society for Microbiology. Washington.

Shimkets, L.J. and Dworkin, M. 1981. "Excreted adenosine is a cell density signal for the initiation of fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*". *Dev. Biol.* 84: 51-60.

Shimkets, L.J. and Kaiser, D. 1982a. "Murein components rescue

developmental sporulation of *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 152: 462-470.

Shimkets, L.J. and Kaiser, D. 1982 b. "Induction of coordinate cell movement in *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 152: 451-461.

Shimkets, L.J. and Woese, C. 1992. "A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9459-9463.

Shinano, H. 1972. "Studies of marine microorganisms taking part in the precipitation of calcium carbonate. IV. A taxonomic study of marine bacteria taking part in the precipitation of calcium carbonate". Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 38: 825-832.

Shinano, J.L. and Sakai, M. 1975. "Effect of magnesium ion concentration on the types of crystals deposited by marine bacteria in seawater". Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 41: 913.

Simkiss, K. and Wilbur, K.M. 1989. "Biomineralization. Cell Biology and Mineral Deposition". Academic Press, Inc. San Diego, California.

Simpson, T.L. and Volcani, B.E. (eds) 1981. "Silicon and siliceous structures in Biological Systems". Springer-Verlag. Berlin.

Singer, C. and Ames, B. 1970. "Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios". Science 170: 822-826.

Singh, B.N. 1947. "Myxobacteria in soils and composts; their distribution, number and lytic action on bacteria". J. Gen. Microbiol. 1: 1-10.

Singh, B.N. and Singh, N.B. 1971. "Distribution of fruiting myxobacteria in Indian soils bark of trees and dung of herbivorous animals". Indian J. Microbiol. 11: 47-92.

-
- Solntseva, L.I.** 1940. "The biology of the myxobacteria. I. Myxococci". *Mikrobiologiya* 9: 217-231.
- Solntseva, L.I.** 1941. "The biology of the myxobacteria. II. The genera *Mellitangium* y *Chondromyces*". *Mikrobiologiya* 10: 505-512.
- Sorhaug, T.** 1974. "Glycerol ester hydrolase, lipase of *Myxococcus xanthus* fb". *Can. J. Microbiol.* 20: 611-615.
- Standberg, G.W., Shumate, S.E. and Parrot, J.R.** 1981. "Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Sacharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*". *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 237-245.
- Stanier, R.Y., Adelberg, E.A. e Ingraham, J.L.** 1984. "Microbiología". Edit. Reverté S.A. Barcelona.
- Stephens, K. and White, D.** 1980. "Morphogenetic effects of light and guanine derivatives on the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*". *J. Bacteriol.* 144: 322-326.
- Stephens, K. Hegeman, G.D. and White, D.** 1982. "Pheromone produced by *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 110: 236-245.
- Sudo, S.Z. and Dworkin, M.** 1969. "Resistance of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 98: 883-887.
- Sudo, S.Z. and Dworkin, M.** 1972. "Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 110: 236-245.
- Sutherland, I.W.** 1979. "Polysaccharides produced by *Cystobacter*, *Archangium*, *Sorangium* and *Stigmatella* species". *J. Gen. Microbiol.* 74: 259-266.
-

Sutherland, I.W. and Smith, M.L. 1973. "The lipopolysaccharides of fruiting and no-fruiting myxobacteria". J. Gen. Microbiol. 74: 259-266.

Sutherland, I.W. and Thonson, S. 1975. "Comparison of polysaccharides produced by *Myxococcus* strains". J. Gen. Microbiol. 89: 124-132.

Sutor, D.J. 1968. "Newberyite—its formation in human urinary calculi". Nature 218: 295.

Thaxter, R. 1892. "On the *Myxobacteriaceae*, a new order of *Schizomycetes*". Bot. Gaz. 17: 389.

Tipper, D.J., Stominger, J.L. and Ensign, J.C. 1967. "Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. VII. Mode of action of the bacteriolytic peptidase from myxobacter and the isolation of intact cell wall polysaccharides". Biochem. 6: 906-920.

Tobin, J.M., Cooper, D.G. and Neufeld, R.J. 1984. "Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass". Appl. Environ. Microbiol. 47: 821-824.

Torella, F., Guerrero, R. and Seldler, R.J. 1978. "Further taxonomic characterization of the genus *Bdellovibrio*". Can. J. Microbiol. 24: 1387-1394.

Trudinger, P.A. 1976. "Microbiological processes in relation to ore genesis". In handbook of statabound and statiform ore deposits. Ed. Wolff, H.K. Amsterdam. pp. 135-210.

Tsai, T.S., Whitaker, D.R., Jurasek, K. and Gillespie, D.C. 1965. "Lytic enzymes of *Sorangium* sp. Action of the α and β -lytic proteases on two bacterial mucopeptides". Ca. J. Biochem. 43: 1971-1983.

Tsezos, M. and Volesky, B. 1981. "Biosorption of uranium and thorium". *Biotechnol. Bioeng.* 23: 583-604.

Tsezos, M. and Volesky, B. 1982a. "The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*". *Biotechnol. Bioeng.* 24: 385-401.

Tsezos, M. and Volesky, B. 1982b. "The mechanism of thorium biosorption by *Rhizopus arrhizus*". *Biotechnol. Bioeng.* 25: 955-969.

Tsezos, M. and Keller, D.M. 1983. "Adsorption of radium-226 by biological origin absorbents". *Biotechnol. Bioeng.* 25: 201-215.

Umbarger, H.E. 1978. "Aminoacid biosynthesis and its regulation". *Annu. Rev. Biochem.* 47: 533-606.

Van den Eynde, H., Van de Peer, Y., Vandenaabeele, H., Van Bogaert, M. and de Wachter, R. 1990. "5S rRNA sequences of myxobacteria and radioresistant bacteria and implications for eubacterial evolution". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 399-404.

Varon, M., Tietz, A. and Rosenberg, E. 1986. "*Myxococcus xanthus* autocide AMI". *J. Bacteriol.* 167: 356-361.

Voelz, H.G. and Dworkin, M. 1962. "Fine structure of *Myxococcus xanthus* during morphogenesis". *J. Bacteriol.* 84, 943-952.

Voelz, M., Voelz, V. and Ortigosa, R.O. 1966. "The polyphosphate overplus phenomenon in *Myxococcus xanthus* and its influence on the architecture of the cell". *Arch. Mikrobiol.* 53: 371-388.

Ware, J.C. and Dworkin, M. 1973. "Fatty acids of *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 115: 253-261.

Watabe, N. and Wilbur, K.M. (eds). 1976. "The mechanisms of Mineralization in the invertebrates and plants". Univ. of South Carolina Press, Columbia, South Carolina.

Watson, B.F. and Dworkin, M. 1968. "Comparative intermediary metabolism of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 96: 1456-1473.

Westbroek, P. and de Jong, E.W. (eds) 1983. "Biomining and Biological Metal Accumulation". Riedel, Dordrecht, The Netherlands.

Whitaker, T.J., Webb, K.M. and Venkitachalm, H. 1992. "A laboratory study of struvite precipitation after anaerobic digestion of piggery wastes". Bioresource Technol. 41: 117-121.

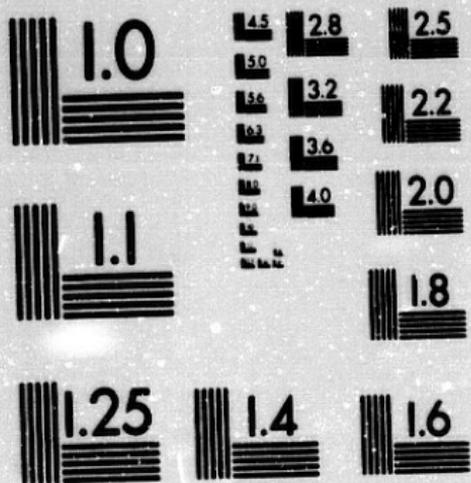
White, D. 1975. "Myxospores of *Myxococcus xanthus*". En Spores VI. P. Gerhardt, H.L. Sadoff and R.N. Costilow eds. American Society for Microbiology. Washington. D.C.

White, D., Dworkin, M. and Tipper, D.J. 1968. "Peptidoglycan of *Myxococcus xanthus*: structure and relation to morphogenesis". J. Bacteriol. 95: 2186-2197.

Wilson, M.J. and Jones, D. 1984. "The occurrence and significance of manganese oxalate in *Pertusaria corallina* (Lichens). Pedobiologia 26: 373-379.

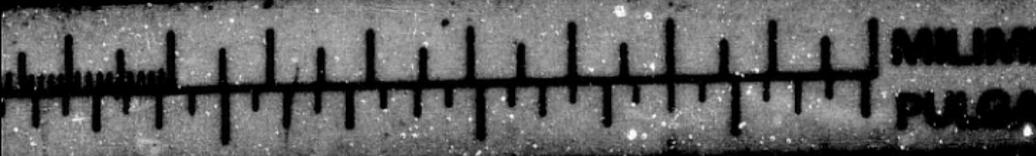
Wireman, J.W. 1979. "Developmental induction of *Myxococcus xanthus* mixospores". J. Bacteriol. 140: 147-153.

Wireman, J.W. and Dworkin, M. 1975. "Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria". Science 189: 516-523.



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

1 : 24



Watabe, N. and Wilbur, K.M. (eds). 1976. "The mechanisms of Mineralization in the invertebrates and plants". Univ. of South Carolina Press, Columbia, South Carolina.

Watson, B.F. and Dworkin, M. 1968. "Comparative intermediary metabolism of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **96**: 1456-1473.

Westbroek, P. and de Jong, E.W. (eds) 1983. "Bomineralization and Biological Metal Accumulation". Riedel, Dordrecht, The Netherlands.

Whitaker, T.J., Webb, K.M. and Venkitachalm, H. 1992. "A laboratory study of struvite precipitation after anaerobic digestion of piggery wastes". Bioresource Technol. **41**: 117-121.

White, D. 1975. "Myxospores of *Myxococcus xanthus*". En Spores VI. P. Gerhardt, H.L. Sadoff and R.N. Costilow eds. American Society for Microbiology. Washington. D.C.

White, D., Dworkin, M. and Tipper, D.J. 1968. "Peptidoglycan of *Myxococcus xanthus*: structure and relation to morphogenesis". J. Bacteriol. **95**: 2186-2197.

Wilson, M.J. and Jones, D. 1984. "The occurrence and significance of manganese oxalate in *Pertusaria corallina* (Lichens). Pedobiologia **26**: 373-379.

Wireman, J.W. 1979. "Developmental induction of *Myxococcus xanthus* mixospores". J. Bacteriol. **140**: 147-153.

Wireman, J.W. and Dworkin, M. 1975. "Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria". Science **189**: 516-523.

Wireman, J.W. and Dworkin, M. 1977. "Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 129: 796-802.

Witkin, S. and Rosenberg, E. 1970. "Induction of morphogenesis by methionine starvation in *Myxococcus xanthus*". Polyamine control. J. Bacteriol. 103: 469-641.

Woese, C.R. 1987. "Bacterial evolution". Microbiol. Rev. 51: 221-271.

Yee, T. and Inouye, M. 1981. "Reexamination of the genome size of myxobacteria, including the use of a new method for genome size analysis". J. Bacteriol. 145: 1257-1265.

Yee, T. and Inouye, M. 1982. "Two-dimensional DNA electrophoresis applied to the study of DNA methylation and analysis of genome size in *Myxococcus xanthus*". J. Mol. Biol. 154: 181-196.

Yee, T. and Inouye, M. 1984. "Genome of *Myxococcus xanthus*". In *Myxobacteria: Development and cell interactions*. E. Rosenberg ed. Springer-Verlag. New York.

Yee, T., Furuichi, T., Inouye, S. and Inouye, M. 1984. "Multicopy single-stranded DNA isolated from a gram-negative bacterium, *Myxococcus xanthus*". Cell 38: 203-209.

Zusman, D.R. 1980. "Genetic approaches to the study of development in the myxobacteria". In: *The molecular genetics of development*, edited by T. Leighton, W. Loomis. New York: Academic Press.

Zusman, D.R. 1982. "Friszy mutants: a new class of aggregation-defective developmental mutants of *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 150: 1430-1437.

Zusman, D.R. 1984. "Developmental program of *Myxococcus xanthus*". In *Myxobacteria: Developmental and cell interactions*. Ed. E Rosenberg. Springer-Verlag. New York. pp 185-213.

Razin, A. and Riggs, A.D. 1980. "DNA methylation and gene functions". *Science* 210: 604-610.

Sarao, R., McCurdy, H.D and Passador, L. 1985. "Enzymes of the intermediary carbohydrate metabolism of *Polyamgium cellulosum*". *Can. J. Microbiol.* 31: 1142-1146.

Whitaker, A. 1968. "Decomposition of struvite". *Mineral. Mag.* 36: 820-824.
