

# Biom mineralización bacteriana de magnetita y aplicaciones

/ Teresa Pérez-González (1) / Carmen Valverde-Tercedor (1) / Concepción Jiménez-López (1)

(1) Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n, 18071 Granada

## Resumen

La biom mineralización es el proceso por el cual los organismos (desde procariotas a eucariotas, incluyendo humanos) producen minerales. Los microorganismos son el segundo grupo en importancia con respecto a la formación de minerales, y pueden producir una gran variedad de minerales diferentes según dos procesos de biom mineralización que difieren mecanísticamente: la mineralización controlada biológicamente (BCM) y la mineralización inducida biológicamente (BIM). En este trabajo se estudia con detalle la producción de magnetita por bacterias, tanto mediante un proceso de biom mineralización inducida por bacterias reductoras del hierro, como de biom mineralización controlada por magnetobacterias. Se presenta el conocimiento actual que existe en relación con el proceso de biom mineralización de magnetita, así como de las aplicaciones de este mineral, como indicador de vida en sedimentos terrestres y extraterrestres y en aplicaciones nanotecnológicas, así como las líneas futuras de investigación en estos campos.

**Palabras clave:** Magnetita, Biom mineralización, Bacterias Magnetotácticas, Bacterias Reductoras de Hierro, Geomarcadores, Nanopartículas Magnéticas

**Key-words:** Magnetite, Biom mineralization, Magnetotactic Bacteria, Iron-reducing Bacteria, Geomarkers, Magnetic Nanoparticles

## 1. Generalidades sobre la biom mineralización

La biom mineralización es el proceso por el que los organismos, tanto procariotas como eucariotas, incluidos los humanos, producen minerales. Este proceso ocurre, por un lado, como resultado de su actividad celular, la cual provoca los cambios fisicoquímicos necesarios para que se produzca la nucleación y posterior crecimiento del núcleo formado y, por otro, por el aporte de superficies (pared celular, membranas, orgánicos, polímeros extracelulares, restos de lisis, entre otros) que actúan como núcleos de cristalización, disminuyendo la barrera energética que es necesario superar para que se produzca la nucleación de una fase mineral. La biom mineralización ocurre en microorganismos, animales y plantas. Los animales son el grupo capaz de formar un mayor número de biom minerales diferentes, seguidos por las bacterias, las plantas vasculares y, finalmente, los hongos y los protozoos (*Simkiss & Wilbur, 1989*). La mayor parte de los biom minerales cuentan con el calcio como catión mayoritario, siendo el hierro el segundo más común. Si agrupamos según el anión, los más numerosos serían los fosfatos, seguidos de óxidos y carbonatos. En general, los polimorfos del  $\text{CaCO}_3$ , aragonito y calcita son los que están más ampliamente distribuidos en todos los phyla mientras que los haluros aparecen en muy pocos grupos y los sulfuros y ciertos óxidos, hasta ahora, sólo se han encontrado en los procariotas.

Los minerales producidos (más de 60 biom minerales diferentes; *Mann, 2001*) suelen tener una función muy específica. La más importante es la formación de esqueletos/exoesqueletos, siendo esta función muy evidente en organismos eucariotas unicelulares y en muchos phyla de invertebrados. Los minerales más abundantes en los esqueletos son los carbonatos de calcio, el fosfato cálcico y la sílice. Otras funciones de los biom minerales son: (1) la de actuar como almacén de iones que se pueden utilizar posteriormente en momentos de gran demanda fisiológica

(Lowenstam & Weiner, 1989); (2) formación de dientes, espículas, dispositivos para detectar la gravedad (otolitos, estatolitos...), dispositivos de flotación, lentes (Lowenstam & Weiner, 1989) y (3) la de respuesta a taxis (formación de magnetita y greigita por magnetobacterias que hace que presenten aeromagnetotaxia, Frankel et al., 2007).

Existen dos modelos mecanísticos que diferencian los procesos de biomineralización en dos tipos: 1) mineralización inducida biológicamente (BIM) (Lowenstam, 1981); y 2) mineralización controlada biológicamente (BCM) (Bazylinski & Frankel, 2003). A la mineralización controlada biológicamente se le ha llamado en el pasado mineralización mediada por matriz (Lowenstam, 1981) y biomineralización organizada por barrera (Mann, 1986) destacando que las membranas son importantes en este proceso de biomineralización. Hay varias diferencias importantes entre BIM y BCM que detallaremos a continuación.

### 1.1. Mineralización inducida biológicamente

La formación del biomineal ocurre como consecuencia de, por una parte, cambios en la sobresaturación del sistema ocasionados por la captación o la excreción de diferentes metabolitos (mecanismo activo; Lowenstam, 1981) y por otra, debido al aporte de núcleos de cristalización tales como superficies celulares (pared celular, membranas, orgánicos, restos celulares y de lisis) que favorecen la precipitación (mecanismos pasivos; Lowenstam, 1981). La mayoría de exopolímeros y superficies celulares están cargadas negativamente, lo que provoca la unión de cationes por interacciones electrostáticas inespecíficas. Esta unión, además de incrementar localmente la sobresaturación del sistema, también ayuda a estabilizar las superficies de las partículas minerales que se están formando. Gracias a la presencia de estos mecanismos pasivos, la tasa de mineralización puede incrementarse en varios órdenes de magnitud respecto a una situación en la que no estuvieran presentes estas superficies (Beveridge, 1989; Konhauser, 1998; Bazylinski et al., 2007).

Los minerales formados por mineralización

inducida se depositan, prácticamente siempre, en el exterior del organismo que los induce. Por tanto, la mineralización ocurre en un ambiente abierto, y no en un espacio intracelular delimitado para este propósito y no existe una maquinaria celular o macromolecular especializada con un papel específico en el proceso de biomineralización. Un hecho característico es que la mineralogía de la fase sólida resultante depende en gran medida de las condiciones ambientales en que un organismo vive. De esta manera, un mismo organismo en distintas condiciones puede dar lugar a distintos minerales (Lowenstam & Weiner, 1989). Los minerales formados suelen tener un tamaño y morfologías indistinguibles de minerales formados en procesos puramente inorgánicos en condiciones físico-químicas similares. Es común, además, la presencia de cristales con distintas morfologías en el mismo experimento (Jiménez-López et al., 2010).

La mineralización inducida biológicamente parece el proceso dominante entre los procariontes y en algunos eucariotes, destacando hongos, algunos eucariotes unicelulares (Lowenstam & Weiner, 1989) y algas, en las cuales es frecuente la formación de carbonatos como resultado de un proceso de mineralización inducida (Borowitzka, 1982). También ocurre mineralización inducida en animales, aunque es un proceso menos frecuente si lo comparamos con los procariontes. Ejemplos de mineralización inducida en animales son los cristales de calcita formados en el esqueleto axial de los Pennatulidos (Ledger & Franc, 1978) y los cristales de weddelita y brucita que se forman entre las capas de depósitos de calcita de la mandíbula o del pico de *Nautilus* (Lowenstam et al., 1984).

Nos centraremos en la mineralización inducida en bacterias, ya que este proceso es muy frecuente en este Dominio. Los procesos de mineralización inducida biológicamente están ampliamente extendidos entre los diversos *Phyla* del dominio *Bacteria*, siendo también muy amplio el número de biominerales producidos mediante este proceso en todo tipo de ambientes: óxicos, anóxicos e interfase óxica-anóxica (OAI). Los biominerales más comunes son los óxidos (fundamen-

talmente magnetita, goethita, hematita, ferrihidrita y óxidos de manganeso), carbonatos, fosfatos, sulfatos y sulfuros (Konhauser, 2007). La formación de carbonatos es un proceso muy común entre las bacterias, existiendo numerosos los ejemplos de bacterias carbonatogénicas en los distintos *Phyla*. Como ejemplos, bacterias del género *Pseudomonas* (Baskar et al., 2006), *Bacillus* (Castanier et al., 2000), *Vibrio* (Rivadeneira et al., 1993) y *Streptomyces* (Cañaveras et al., 1999), bacterias reductoras de sulfato y cianobacterias (Wright, 1999), *Myxobacteria* (González-Muñoz et al., 1996) y *Halobacillus* (Rivadeneira et al., 2004). Este proceso de biomineralización es enormemente interesante en muy diferentes aspectos, desde en la formación de estromatolitos [en sedimentos Precámbricos (Altermann 2004), en ambientes marinos Palaeozoicos and Mesozoicos (Riding, 2000), sedimentos modernos (Riding, 2000), e incluso en ambientes extremos (Kempe & Kazmierczak 1990)], pasando por aspectos clínicos como causante de la periartritis, osteoartritis y el síndrome de Milwaukee (Molloy & McCarthyl, 2003), hasta aspectos prácticos como el uso de la capacidad carbonatogénica de bacterias presentes en piedra ornamental deteriorada y de otros cultivos inoculantes para la consolidación de piedra ornamental alterada o para proteger piezas nuevas de calcarenita usadas para sustituir piezas gravemente dañadas (Tiano et al., 1999; Rodríguez-Navarro, 2003; Jiménez-López, 2007, 2008). Es especialmente interesante la formación de dolomita y vaterita por microorganismos (Wright & Wacey, 2005; Rodríguez-Navarro et al., 2007) y el conocimiento sobre la formación de ambos minerales que aportan estos procesos de biomineralización.

Con relación a la formación de fosfatos, también hay una gran cantidad de microorganismos capaces de inducir la formación de apatito [*Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii* y *Bacterionema matruchotti* (Rizzo et al., 1962)] y estruvita [*Staphylococcus aureus* (Beavon & Heatley, 1962), *Bacillus pumilus* (Nelson et al., 1991), *Pseudomonas calciprecipitans* (Shinano & Sakai, 1975) y *Myxococcus xanthus* (González-Muñoz et al., 1996, 2008)]. La biomineralización de fosfa-

tos es importante, entre otros, desde el punto de vista clínico, debido a la formación de piedras de riñón y de biominerales de fosfato que causan problemas dentales (Kajander & Çiftçioglu, 1998; Çiftçioglu et al., 1998).

## 1.2. Mineralización controlada biológicamente

En la mineralización controlada biológicamente los minerales normalmente se forman sobre (o dentro) de matrices o vesículas orgánicas dentro de la célula. El organismo ejerce un grado de control significativo sobre el proceso de nucleación y crecimiento del mineral y, por lo tanto, sobre la composición, tamaño, hábito, y localización intracelular de las partículas (Bazyliński & Frankel, 2003). El mineral que se forma se aísla primero del ambiente exterior por una barrera a través de la cual los iones no pueden difundir libremente (Wilbur & Bernhardt, 1984; Simkiss, 1986). Las bicapas lipídicas, tanto en las membranas celulares como en vesículas localizadas dentro o fuera de las células, son las más utilizadas para delimitar estos espacios. Otros materiales utilizados para este propósito son las macromoléculas insolubles, como proteínas y/o polisacáridos que forman láminas impermeables.

Este tipo de biomineralización es más común en los organismos superiores que en las bacterias, en los que se producen varios minerales diferentes con unas funciones muy específicas, entre ellas la formación de conchas, esqueletos, cáscaras de huevo, entre muchos otros. En los microorganismos, el ejemplo mejor caracterizado de BCM es la formación de magnetosomas por bacterias magnetotácticas, un grupo de microorganismos que fabrican minerales magnéticos, concretamente magnetita o greigita, que les permite responder al campo magnético terrestre para situarse, dentro de la columna de agua, en el nivel con una  $[O_2]$  más adecuada para su crecimiento. Este ejemplo de biomineralización se tratará con más detalle a continuación.

## 2. Ocurrencia de magnetita en depósitos naturales

La magnetita ( $Fe_3O_4$ ) es un óxido ferroso diférrico, diferente del resto de óxidos de hierro

porque contiene hierro di y trivalente ( $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ ). Es un mineral común en las rocas terrestres que puede tener un origen biótico (bien por una mineralización inducida o controlada biológicamente) o inorgánico. Cristales nanométricos de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) con variedad de formas, distribución de tamaño y composición química, han sido encontrados en numerosos ambientes antiguos y modernos (Thomas-Keprta et al., 2000). La magnetita está presente en la Tierra en rocas ígneas, metamórficas y sedimentarias. Mientras que las magnetitas formadas a altas temperaturas tienen claramente un origen inorgánico, aquellas formadas en ambientes de bajas temperaturas como por ejemplo los estromatolitos Precámbricos y formaciones bandeadas de hierro (BIFs) pueden tener un origen inorgánico o biogénico. El origen de muchas de las magnetitas terrestres es desconocido y actualmente existe una gran controversia sobre como distinguir las magnetitas de origen biogénico de las producidas de forma inorgánica cuando aparecen en sedimentos.

La magnetita también se ha encontrado en partículas de polvo interplanetarias y meteoritos. En este contexto ha habido (y hay) un notable interés centrado en un subconjunto de magnetitas con propiedades químicas y físicas inusuales que están íntimamente asociadas con los discos de carbonatos del meteorito ALH84001. Se ha producido un gran debate sobre el origen de estas magnetitas desde que McKay et al. (1996) las propusieran como prueba de la existencia de vida primigenia en Marte, por su semejanza con las magnetitas producidas en La Tierra por magnetobacterias.

En los seres vivos la magnetita se ha encontrado de forma directa en las bacterias magnetotáticas (Frankel et al. 1979), en algunas especies de algas (Torres de Araujo, 1986), en los dientes de los quitones (Lowenstam, 1967), en peces (Mann et al., 1988), en la tortuga verde (Perry et al., 1985) y en las palomas (Perry et al., 1985).

La magnetita es ferrimagnética a temperatura ambiente, es decir, el alineamiento de los espines electrónicos es antiparalelo, lo que

hace que el momento magnético de los espines sea diferente y crea un momento magnético neto, por lo que se ve fuertemente atraída por los campos magnéticos. Cualquier sustitución catiónica, además del tamaño de la partícula, hace variar la coercitividad, es decir, la fuerza magnética de la magnetita. Mientras que las partículas entre ~35-120 nm son de dominio único magnético (SMD), es decir, cada partícula se comporta como un imán, las partículas inferiores a 35 nm son superparamagnéticas a temperatura ambiente (no tienen un magnetismo permanente a temperatura ambiente). Las que superan los 120 nm presentan un magnetismo más débil, ya que al presentarse varios dominios magnéticos en una misma partícula se anulan unos a otros.

### 3. Formación de magnetita abiótica y biótica

#### 3.1. Formación de magnetita abiótica

La magnetita abiótica puede precipitarse como fase primaria o como fase secundaria. Como fase primaria, la magnetita se puede formar por precipitación homogénea o heterogénea a partir de una solución. Como fase secundaria, la magnetita se forma gracias a la descomposición termal de carbonatos que contienen Fe y por la transformación de ferrihidrita o de una fase mineral conocida como "herrumbre verde" ("green rust").

Los métodos más desarrollados para la síntesis de magnetita abiótica son aquellos en los que se precipita este mineral como **Fase primaria** a partir de una solución, ya que se pueden obtener grandes cantidades del mineral. Esta síntesis se puede producir a partir de diferentes métodos, teniendo todos ellos en común la necesidad de alcanzar el campo de estabilidad termodinámica para la magnetita, que depende en gran medida del Eh, pH y la alcalinidad/ $P_{\text{CO}_2}$  del sistema (Garrels & Christ, 1990). En general, la síntesis inorgánica de magnetita requiere condiciones reductoras, valores altos de pH y baja presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $P_{\text{CO}_2}$ ) en el sistema. Como **Fase Secundaria**, la magnetita puede obtenerse mediante la transformación de fases minerales a altas o bajas temperaturas. A temperatura ambiente (25°C), la mag-

netita se forma, por ejemplo, por la transformación de ferrihidrita o de una fase mineral conocida como “herrumbre verde”. Ambas fases son inestables respecto a la magnetita en condiciones anóxicas y valores de pH, Eh,  $p\text{CO}_2$ , y  $\text{Fe}^{2+}$  determinados (Zachara et al., 2002). A temperaturas más altas ( $> 400\text{ }^\circ\text{C}$ ) se puede obtener magnetita mediante la descomposición de carbonatos de Fe en condiciones de alta  $\text{P}_{\text{CO}_2}$  y baja  $\text{P}_{\text{O}_2}$  (Golden et al., 2004; Thomas-Keprta et al., 2009).

### 3.2. Formación de magnetita biótica

La magnetita puede ser formada también por microorganismos, bien a través de una mineralización inducida biológicamente o de una mineralización controlada biológicamente.

#### 3.2.1 Magnetita inducida biológicamente

En la última década se ha producido un creciente interés tanto en la transformación como en la precipitación de minerales de hierro. Esto es debido, en parte, a que el hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre y también porque se piensa que el  $\text{Fe}^{3+}$  fue el primer aceptor de electrones externo relevante de la respiración microbiana (de Duve, 1995). Además Nealson & Myers (1990) sugirieron que la reducción bacteriana de hierro pudo haber jugado un papel importante en la génesis de las formaciones bandeadas de hierro del Precámbrico.

La reducción bacteriana del  $\text{Fe}^{3+}$  la llevan a cabo principalmente (aunque no de manera exclusiva) las bacterias reductoras desasimiladoras del hierro (DIRBs). La reducción desasimiladora del hierro es el proceso por el cual el microorganismo reduce  $\text{Fe}^{3+}$  con un propósito diferente a la asimilación de este catión, se obtenga, o no, energía a partir de este proceso. Las bacterias reductoras de hierro están muy extendidas en el dominio *Bacteria* y se han encontrado en diferentes ambientes, como hábitats acuáticos marinos y de agua dulce (Lovley et al., 1990; Roh et al., 2006), incluyendo lagos básicos (Zavarzina et al., 2006), manantiales termales (Solokova et al., 2007), sedimentos de lagos con residuos de minería (Cummins et al., 1999) y aguas residuales (Ye et al.,

2004). Debido a su amplia distribución, las bacterias reductoras de hierro intervienen, en cierta medida, en los ciclos geoquímicos globales de elementos como el carbono, el oxígeno, el azufre y el hierro.

Muchos de estos microorganismos reducen  $\text{Fe}^{3+}$  como efecto secundario de su metabolismo, pero no obtienen energía para su crecimiento a partir de esta transferencia de electrones (Lovley, 1991). Entre estos microorganismos se han estudiado *Bacillus polymyxa*, *Clostridium butyricum* y *Cl. pasteurianum* (Ottow & Glathe, 1971). Sin embargo, una vez que se descubrió que los microorganismos que utilizan el  $\text{Fe}^{3+}$  como aceptor final de electrones de la respiración (por tanto, obteniendo energía en este proceso) son los principales responsables de la mayoría de la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  en suelos y sedimentos, se profundizó en el estudio de estos microorganismos, presentes en los dominios *Bacteria* y *Archaea*. Dentro del dominio *Bacteria* se encuentran microorganismos desasimiladores reductores de hierro en los diferentes *phyla* de *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Thermodesulfobacteriales*, *Thermotogales* y *Deinococcus-Thermus*. En el dominio *Archaea* aparecen tanto en *Euryarcheota*, *Thermococcales* y *Methanopyrales*, como en *Crenoarcheota*, *Desulfurococcales*, *Methanococcales* y *Thermoproteales*. Los géneros más estudiados son *Shewanella*, *Geobacter* y *Geothrix*.

Las DIRBs utilizan en su mayoría oxohidróxidos de  $\text{Fe}^{3+}$  muy amorfos como aceptores de electrones, siendo los más usados por las células goethita, hematita, ferrihidrita y nano-goethita (Zachara et al., 2002). Algunas bacterias desasimiladoras reductoras de hierro también son capaces de utilizar y reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  presente en filosilicatos [ej., montmorillonita, illita (Kukkadapu et al., 2006)] e incluso en magnetitas (Dong et al., 2000). En condiciones anóxicas, las DIRBs usan el  $\text{Fe}^{3+}$  (previa disolución del mineral que contiene  $\text{Fe}^{3+}$ ) como aceptor de electrones en el proceso de respiración, transformándolo en  $\text{Fe}^{2+}$ , que se excreta al medio de cultivo, ya que la bacteria no lo usa en los procesos de biosíntesis. Tanto el  $\text{Fe}^{2+}$  como el  $\text{Fe}^{3+}$  se concentran en las zonas cargadas negativa-

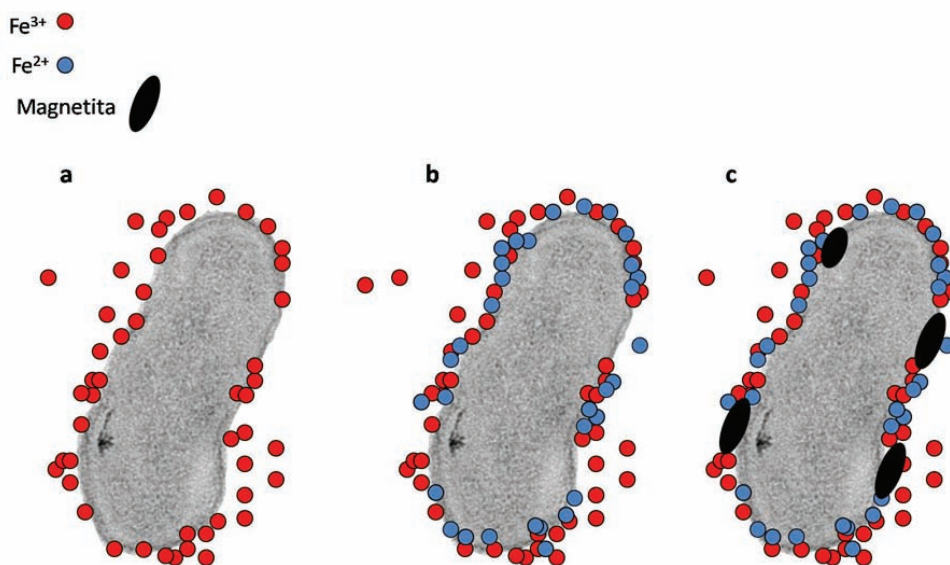


fig. 1. Mineralización inducida de magnetita por *Shewanella oneidensis*. a) El  $\text{Fe}^{3+}$  está presente en el medio debido a la disolución de minerales amorfos de  $\text{Fe}^{3+}$  (p.e. ferrihidrita) adicionados al medio de cultivo). Este  $\text{Fe}^{3+}$  se concentra en las zonas cargadas negativamente de la pared celular bacteriana. b) La bacteria reduce parte del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  gracias a los citocromos presentes en su superficie, usando el  $\text{Fe}^{3+}$  como aceptor final de electrones en un proceso de respiración anaerobia. Este  $\text{Fe}^{2+}$  se concentra en las zonas cargadas negativamente de la pared celular c) La concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en zonas concretas de la pared celular bacteriana crea condiciones de sobresaturación con respecto a la magnetita en esas zonas concretas, induciendo la formación extracelular de este mineral.

mente de la pared celular bacteriana, haciendo que el sistema se sobresature localmente con respecto a la magnetita y provocando la precipitación de esta fase mineral (Fig. 1). Estudios llevados a cabo por diferentes investigadores (Lovley et al., 1990; Pérez-González et al., 2010) ponen de manifiesto que, para que se produzca la formación de magnetita, hace falta la conjunción de los mecanismos activos y pasivos de precipitación, es decir, células metabólicamente activas que aporten superficies (paredes celulares, membranas, orgánicos y/o productos de lisis). Parece que esto ocurre porque, para que la magnetita se forme, hace falta, por un lado, valores altos de pH (fruto del metabolismo bacteriano) y una concentración alta de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , concentrados en las zonas cargadas negativamente de las superficies aportadas por las bacterias.

De todas formas, aunque el mecanismo de precipitación no se conozca en su totalidad, sí se sabe que la mineralogía, morfología, composición y tamaño de las magnetitas inducidas por bacterias (magneti-

tas BIM) depende en gran medida de varios factores como las condiciones ambientales en las que ocurre la precipitación [pH,  $p\text{O}_2$ ,  $p\text{CO}_2$ , Eh y temperatura (Kukkadapu et al., 2006; Roh et al., 2006)], la composición del medio de cultivo, la concentración y formas químicas de los aceptores y donadores de electrones y los iones adsorbidos (Zachara et al., 2002).

La morfología y el tamaño de los cristales de magnetita producido por las DIRBs han sido caracterizados hasta cierto punto. Se han descrito desde cristales globulares hasta cristales euhédricos o irregulares (Fig. 2) (Zachara et al., 2002; Kukkadapu et al., 2005; Pérez-González et al., 2010). El tamaño de las magnetitas en estos estudios puede variar desde menos de 35 nm, en el rango de partículas superparamagnéticas, hasta rangos entre 35-120 nm (SDM) en el que cada cristal individual tiene un momento de dipolo magnético permanente a temperatura ambiente (Vali et al., 2004; Roh et al., 2006).

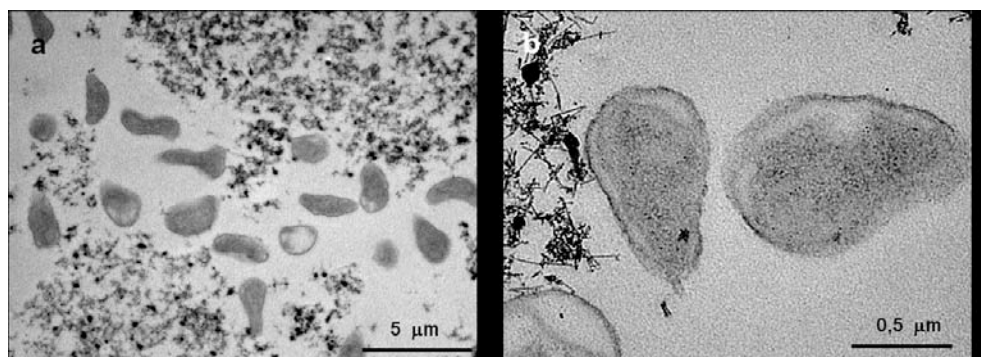


fig. 2. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de magnetitas extracelulares (cristales oscuros) inducidos por células de *Shewanella oneidensis* en un medio suplementado con ferrihidrita.

En este tipo de biomíneralización el organismo ejerce escaso o ningún control sobre los procesos de biomíneralización. Por lo tanto, la magnetita inducida biológicamente es indistinguible en morfología y tamaño de la formada inorgánicamente bajo las mismas condiciones químicas. Estos biominerales están caracterizados, en general, por una baja cristalinidad, amplias distribuciones de tamaño de partícula, ausencia de morfologías cristalinas específicas, poca especificidad mineral (minerales mezclados) y/o la presencia de impurezas en la red mineral (Frankel & Bazylinski, 2003; Bazylinski et al., 2007). Todo lo mencionado anteriormente explica por qué la magnetita BIM no se utiliza como biomarcador en la actualidad. Sin embargo, existen algunas excepciones. Por ejemplo, células de la cepa GS-15 de *Geobacter metallireducens* son capaces de inducir la formación de una forma única de magnetita tabular, con un hábito cristalino y unas propiedades magnéticas bien definidas. Vali et al. (2004) propusieron, debido a sus características únicas, la utilización de estas magnetitas inusuales como indicador de una actividad biológica en ambientes terrestres y extra-terrestres. Más aún, Pérez-González et al. (2010) demostraron que los cristales de magnetita inducida por *Shewanella oneidensis* (al igual que otros biominerales inducidos por otras bacterias) incorporaban cantidades considerables de materia orgánica en la estructura cristalina del mineral, alterando dicha estructura con respecto a la de las magnetitas inorgánicas, y, además, que tal alteración se podía medir mediante espectroscopía Raman. Estos autores propusieron

dicha incorporación de materia orgánica, así como la consecuente alteración de la estructura cristalina, como huella de actividad bacteriana para reconocer origen biogénico de magnetitas naturales.

### 3.2.2. Magnetita controlada biológicamente

La magnetita intracelular es producida por las bacterias magnetotácticas en un proceso de mineralización controlada biológicamente. El término “bacterias magnetotácticas” no tiene significado taxonómico y debe ser interpretado como una colección de diferentes bacterias que aparentemente poseen la característica ampliamente distribuida de la aeromagnetotaxis (explicada más adelante) (Bazylinski, 1995). Estas bacterias forman un grupo heterogéneo de procariontas, que presentan la peculiaridad de que se alinean de forma pasiva y nadan activamente a lo largo de las líneas del campo magnético terrestre (Blakemore, 1982). Es un grupo morfológico, metabólico y filogenéticamente diverso. Esta característica de la aeromagnetotaxis la poseen porque todas las bacterias magnetotácticas forman magnetosomas, que se definen como unas vesículas formadas por una bicapa de fosfolípidos que envuelven un cristal intracelular de mineral de hierro magnético (magnetita o greigita) de dominio único (Gorby et al., 1988) (Fig. 3 a y b). El magnetosoma es intracelular, constituido por una invaginación de la membrana citoplasmática que crea una vesícula en la que se produce la nucleación del cristal de magnetita y su posterior crecimiento (Komeili et al., 2006). Los magnetosomas se encuentran ali-

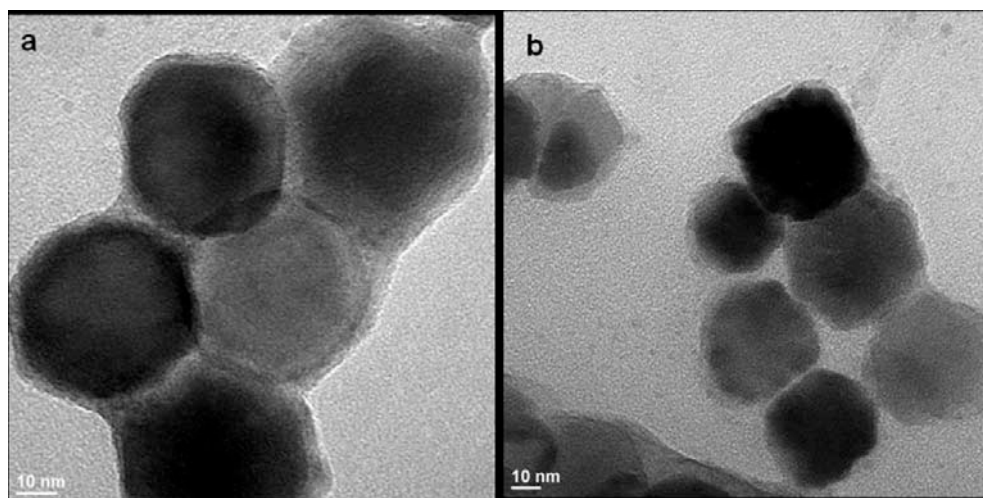


fig. 3. Imágenes TEM de magnetitas del magnetosoma de *Magnetospirillum gryphiswaldense*.

neados dentro de las células formando una o varias cadenas.

La biomineralización del magnetosoma es un proceso complejo que se da en varios pasos. Estos incluyen la formación de la vesícula del magnetosoma, la acumulación de hierro por la célula, el transporte de hierro a la vesícula del magnetosoma y la biomineralización controlada de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o  $\text{Fe}_3\text{S}_4$  dentro de la vesícula. Este proceso tan complejo y regulado resulta en unas magnetitas con unas características muy peculiares, que hacen que cada partícula de magnetita del magnetosoma presente unas propiedades magnéticas óptimas para la aeromagnetotaxia, ya que cada partícula magnética tiene un momento dipolar neto y, al alinearlas todas en una cadena, la suma de todos los momentos dipolares de las partículas individuales maximiza el momento dipolar magnético de la célula, haciendo que toda ella se comporte como un imán que responde al campo magnético terrestre (Bazylinski & Schübbe, 2007). Estas características, muy difíciles de reproducir por procesos puramente inorgánicos, se usan en la actualidad como indicadores de origen biogénico de magnetitas naturales (Thomas-Keprta et al., 2000).

A pesar de la diversidad, estas bacterias magnetotácticas tienen importantes características en común (Bazylinski & Frankel, 2004): 1)

son todas gram-negativas del dominio *Bacteria* (no se descarta la posibilidad de la existencia de arqueas productoras de magnetosomas pero hasta el momento no se han encontrado); 2) todas son móviles, generalmente por flagelos (podrían existir bacterias no móviles que sintetizaran magnetosomas con lo que serían magnéticas pero no magnetotácticas); 3) son microaerófilas, anaerobias facultativas y/o anaerobias; 4) todas las cepas en cultivo puro tienen un metabolismo respiratorio, salvo una excepción que puede fermentar; 5) tienen actividad nitrogenasa y por tanto son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, y 6) son mesófilas. Las bacterias magnetotácticas pueden producir dos tipos de minerales: óxidos de hierro y sulfuros de hierro. Aquellas que producen óxidos de hierro, sólo forman magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (Frankel et al., 1979), las que producen sulfuros de hierro sintetizan greigita ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) (Mann et al., 1990) además de algunos minerales precursores de la greigita (Pósfai et al., 1998). Mientras que las bacterias productoras de óxidos de hierro pueden ser microaerófilas estrictas, anaerobias facultativas, o anaerobias estrictas, las productoras de sulfuros de hierro son anaerobias estrictas.

El hábitat de las bacterias magnetotácticas es una zona microaeróbica relativamente estrecha, llamada "interfase óxica-anóxica" (OAI). Esta zona se encuentra en la columna



de agua o en sedimentos que tengan un gradiente vertical de estratificación química. Es precisamente en esta interfase donde la bacteria encuentra la concentración de oxígeno óptima para su crecimiento. Para encontrar la OAI en una columna de agua, una bacteria no magnetotáctica tendría que “buscar” en las tres direcciones del espacio, sin embargo, gracias a que, en las bacterias magnetotácticas, la célula entera se comporta como un imán por el alineamiento de los magnetosomas, la célula sólo tiene que nadar a lo largo de las líneas de campo magnético terrestre. De esa manera, reduce la búsqueda de la zona OAI a una sola dimensión espacial (Fig. 4). Este fenómeno es conocido como aeromagnetotaxis (Bazylinski & Schübbe, 2007).

controlado resulta en unas magnetitas con características muy definidas que detallamos a continuación:

**Morfología:** la magnetita de los magnetosomas de bacterias magnetotácticas puede tener diferentes morfologías, pero, normalmente, una cepa tiene una sola morfología cristalina que le es específica (Bazylinski et al., 1994). Pequeñas variaciones con respecto a esta morfología específica se han encontrado en los cristales de algunas especies al crecer en condiciones diferentes (Meldrum et al., 1993). Son comunes tres tipos de morfología: (1) cuboidales (cuboctaédricas) (Mann et al., 1984a); (2) pseudoprismáticas alongadas (casi rectangulares en el plano horizontal de la proyección) (Mann et al., 1984b);

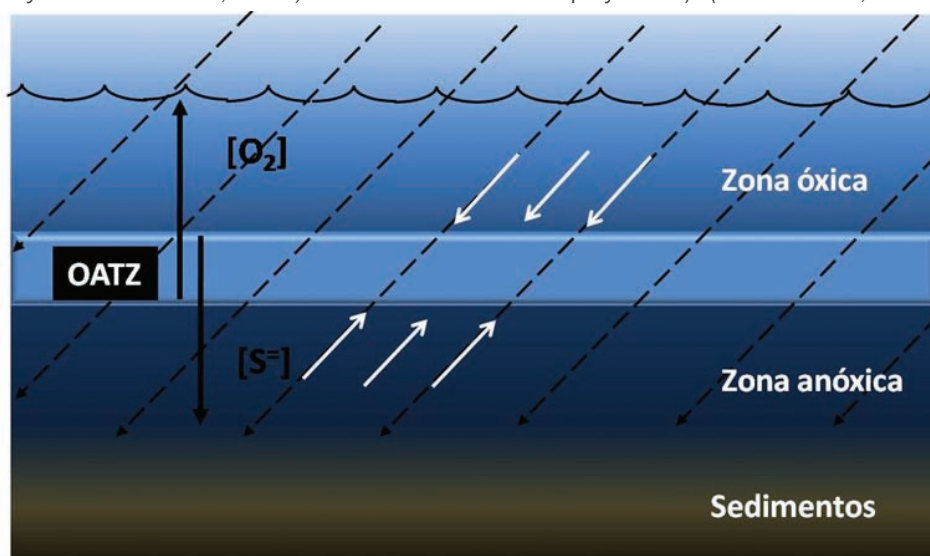


fig. 4. Esquema de la interfase óxica-anóxica en la columna de agua. Las flechas negras indican la línea del campo magnético de la Tierra. Las flechas blancas indican la dirección en que nadarían las bacterias magnetotácticas.

La aeromagnetotaxis es tan importante para la célula que, a lo largo de la evolución, las bacterias magnetotácticas han optimizado la magnetita (o greigita) que se forma en sus magnetosomas, de manera que la aeromagnetotaxis sea lo más eficiente posible. Para ello controlan exquisitamente el proceso de biomíneralización, de una manera que aún no se conoce, pero que puede estar ligada a la presencia de determinadas proteínas en la matriz del magnetosoma (Arakaki et al., 2003). Este proceso de biomíneralización tan

Meldrum et al., 1993), y (3) con forma de diente, bala o punta de flecha (Mann et al., 1987).

**Tamaño:** La mayoría de los cristales maduros de magnetita y greigita de los magnetosomas se encuentran dentro de un pequeño rango de tamaños entre 35 y 120 nm (ejes mayores), aunque existe variabilidad entre especies (Bazylinski & Moskowitz, 1997; Bazylinski et al., 1994). La magnetita y greigita son, por tanto, SMD y son magnéticas de

forma permanente a temperatura ambiente (Diaz-Ricci & Kirschvink, 1992).

**Estructura cristalina:** Los cristales de magnetita de las bacterias magnetotácticas tienen una gran perfección estructural, según se ha observado por diferentes técnicas, como Microscopía Electrónica de Transmisión de alta resolución, difracción de electrones de área seleccionada y tomografía de electrones (Mann *et al.*, 1984a, b).

**Alineación de la cadena:** Los magnetosomas se encuentran alineados dentro de las células en una o más cadenas (Bazylinski *et al.*, 1995), gracias a la presencia de las proteínas MamK y MamJ (Komeili *et al.*, 2004). De esta forma, como los cristales de los magnetosomas se orientan espontáneamente a lo largo del eje de la cadena y el momento del dipolo magnético de la cadena (y de la célula) es la suma algebraica de los momentos individuales de los cristales de la cadena, la célula maximiza su momento magnético dipolar alineando los magnetosomas, y se comporta toda ella como un único imán.

#### 4. Aplicaciones y líneas de investigación abiertas

##### 4.1. Magnetita como biomarcador

La búsqueda de biomarcadores es muy importante tanto para entender la evolución primigenia de nuestro planeta, como para ayudar a revelar indicios de una antigua actividad biológica en otros planetas, como Marte. Aunque existen compuestos orgánicos como terpenoides (Simoneit, 2002), preservados en el registro fósil, que son utilizados como biomarcadores moleculares, los biomarcadores minerales (geomarcadores) se utilizan ampliamente ya que permanecen mejor en los sedimentos. Estos geomarcadores constituyen un registro sobre la evolución de la vida en nuestro planeta, ya que los organismos capaces de precipitar minerales están presentes en todos los grupos desde Bacteria a organismos superiores.

La presencia de biomagnetita se ha utilizado como una posible prueba de la existencia de procesos respiratorios en la atmósfera primigenia (Vargas *et al.*, 1998), la presencia de

una biosfera profunda de la subsuperficie terrestre (Gold, 1992) e incluso para intentar demostrar la presencia de una antigua vida microscópica en Marte (McKay *et al.*, 1996). Desde que McKay *et al.* (1996) propusieran como prueba de una antigua vida en Marte la semejanza morfológica entre las magnetitas nanométricas en los bordes de las inclusiones de carbonatos del meteorito marciano ALH84001, y las magnetitas producidas por BCM de las bacterias magnetotácticas terrestres, se ha discutido mucho sobre los criterios que pueden usarse para reconocer el origen biológico de una muestra natural de magnetita. Hoy en día se usa un conjunto de seis criterios para reconocer magnetita de origen biogénico y, aunque estos criterios los propuso por primera vez Thomas-Keprta *et al.* (2000), se han estado utilizando informalmente durante los últimos 30 años para identificar remanentes fósiles de magnetosomas bacterianos (magnetofósiles) en el registro sedimentario de la tierra (Hesse, 1994; Schwartz *et al.*, 1997). Estos criterios incluyen características físicas y químicas específicas de los cristales de magnetita formados por BCM que, cuando se consideran en conjunto, no se observan en ninguna población de magnetita inorgánica. Los seis criterios propuestos por Thomas-Keprta *et al.* (2000) son conocidos como el paquete MAB (magnetite assay for biogenicity) y son los siguientes: Tamaño de dominio único y proporción ancho/largo anisotrópica restringida, pureza química, perfección cristalográfica, morfología cristalina inusual, dirección de elongación de los cristales de magnetita y presencia de cadenas de magnetita.

Estos criterios, no obstante, están siendo ampliamente debatidos en la actualidad, y, aunque la magnetita podría usarse como un geomarcador, mucha más investigación es necesaria para validar los criterios actuales y proponer otros nuevos, de manera que se pueda evidenciar sin ambigüedad el origen biogénico/abiótico de magnetitas naturales.

##### a) Problemas que plantea usar el criterio de morfología como indicador de biogenicidad

El problema de usar la morfología cristalina como un criterio para reconocer el origen bioló-

gico de los minerales es antiguo y no está ligado únicamente a la magnetita. Actualmente, se desconoce un proceso abiótico que pueda reproducir exactamente las morfologías y las características físicas y magnéticas de la magnetita anisotrópica de las magnetitas BCM, producidas por las bacterias magnetotácticas. No obstante, la clave para discernir si la morfología puede usarse como biomarcador reside en conocer cómo las bacterias magnetotácticas producen estas magnetitas anisotrópicas. Algunos investigadores han postulado que estas morfologías alargadas pueden deberse a un flujo anisotrópico del hierro que llega al cristal (es decir, que el hierro llega al cristal en direcciones preferenciales) y/o a una interacción entre las proteínas de la matriz del magnetosoma y algunas caras preferenciales del cristal, de tal forma que dicha interacción bloquee el crecimiento de esas caras, variando la morfología final del cristal. Sin embargo, no hay experimentos concluyentes que permitan confirmar estas hipótesis.

En relación con la interacción proteína-cristal hay evidencias de que, en otros minerales, esta interacción causa modificaciones en la morfología final del cristal (p.ej. *Hernandez-Hernandez et al., 2008*, *Prozorov et al., 2007*). En magnetitas no hay experimentos concluyentes, pero en los trabajos de *Arakaki et al. (2003)*, *Amemiya et al. (2007)*, y *Prozorov et al. (2007)* hay indicios de que esa interacción cristal-proteína puede producir variaciones morfológicas en magnetita. Sin embargo, los trabajos de estos autores no son concluyentes, ya que estudiaron proteínas, o bien que no se encuentran en el magnetosoma, o bien realizando los experimentos de precipitación de magnetita en presencia de una proteína del magnetosoma [Mms6 de *Magnetospirillum magneticum* (cepa AMB-1): *Arakaki et al., (2003)*] a alta temperatura (90°C), a la cual la proteína podría estar desnaturalizada. No hay otros experimentos al respecto en la actualidad, aunque sí se postula que algunas proteínas de *M. magneticum* AMB-1 (Mms6, Mms5, Mms7 y Mms13), así como la proteína MamC de *M. gryphiswaldense* podrían tener un papel en la biom mineralización de las magnetitas BCM, en concreto, controlando su forma

y su tamaño. Este estudio es enormemente interesante, tanto desde el punto de vista básico como desde el punto de vista aplicado. Desde el punto de vista básico y siendo la morfología de los cristales de magnetita BCM el principal criterio usado como evidencia de biogeneidad, el descubrimiento de qué parámetros controlan realmente la morfología de las magnetitas podría servir para validar ese criterio de biogeneidad. Hace falta un estudio más profundo de la interacción proteína del magnetosoma y el cristal de magnetita, que ha de ser abordado tanto en experimentos in vitro (formación de magnetita en presencia de una proteína o mezcla de proteínas) e in vivo, observando la morfología de la magnetita resultante en mutantes carentes del gen que codifica para la proteína de interés.

#### **b) Cuestiones y problemas de la pureza química**

Aunque los primeros estudios de la magnetita del magnetosoma concluyeron que la magnetita es suficientemente pura para ser considerada estequiométrica (ej. *Thomas-Keprta et al., 2000*), algunos estudios recientes (*Staniland et al., 2008*; *Keim et al., 2009*; *Prozorov et al., 2010*) muestran que metales, además del hierro, podrían incorporarse al magnetosoma. La pregunta clave, aún no resuelta, respecto a estos estudios es si el catión metálico se incorpora dentro de la estructura del mineral formando una solución sólida o, si por el contrario, se forma una mezcla de varias fases minerales puras. El resultado de ambas situaciones es muy diferente, ya que la primera situación produciría una magnetita no estequiométrica, mientras que en la segunda situación, la magnetita seguiría siendo químicamente pura. En experimentos realizados hasta el momento sobre la incorporación de cobalto a especies de *Magnetospirillum*, parece que el Co no se incorpora al cristal, sino que se confina a las capas superficiales de este cristal de magnetita (*Staniland et al., 2008*). Otros estudios, sin embargo, parecen confirmar que el Mn se incorpora en el cristal de magnetita formando una solución sólida (*Prozorov et al., 2010*). Este campo está siendo abordado recientemente, siendo un estudio crucial para validar el criterio de pureza

za química como indicador de biogeneidad.

### **c) Compuestos orgánicos y cambios en la estructura del cristal**

Aunque se acepta que las magnetitas BCM tienen una estructura cristalina perfecta, *Pérez-González et al. (2010)* demostraron que la estructura cristalina de la magnetita BIM está alterada con respecto a la de una magnetita inorgánica, debido a la incorporación de materia orgánica en el cristal. Esta incorporación de materia orgánica, aunque no ha sido aún estudiada, podría también ocurrir en las magnetitas BCM, quizá provocando una alteración de la estructura cristalina, que, de ocurrir, invalidaría la “perfección cristalográfica” como indicador de biogeneidad en magnetitas.

### **4.2. Magnetita como nanopartícula magnética con aplicaciones nanotecnológicas**

Las propiedades magnéticas de la magnetita hacen que este mineral sea usado ampliamente en multitud de aplicaciones, que van desde la fabricación de discos duros, las estrategias hipértérmicas contra el cáncer hasta agente de contraste en resonancia magnética nuclear (*McMichael, 1992; Matsunaga, 1991, Wunderbaldinger et al., 2002*). Por tanto, la producción de magnetita es uno de los campos más prometedores de la nanotecnología y un negocio en el que, sólo en EEUU, se invierten millones de dólares cada año. No obstante, la obtención de lotes homogéneos de nanopartículas magnéticas, con un tamaño y forma adecuados, de tal manera que se maximice el momento dipolar magnético de cada partícula todavía representa un reto a nivel técnico y económico. Aunque actualmente los métodos de producción inorgánica de estas nanopartículas son los más desarrollados y los más aplicados, las partículas resultantes suelen ser pequeñas (<10 nm) amorfas y con un momento dipolar magnético pequeño. Para obtener partículas mejor cristalizadas con un momento dipolar magnético mayor, la precipitación ha de ocurrir a alta temperatura y en ambiente reductor, lo que encarece enormemente la producción. Sin embargo, lotes de nanopartículas homogéneas, perfectas

estructuralmente y con un tamaño y forma que hacen que el momento dipolar magnético de cada partícula individual sea máximo, son fabricados por las bacterias magnetotácticas. Más aún, la magnetita formada por estas bacterias es biocompatible, lo que la hace idónea para aplicaciones clínicas. Otra ventaja adicional es que parece que los magnetosomas de las bacterias magnetotácticas pueden ser dopados con cationes distintos al hierro, produciendo nanopartículas magnéticas no estequiométricas con nuevas propiedades magnéticas (*Prozorov et al., 2010*).

El problema que existe para la aplicación industrial de esta alternativa biológica para la producción de magnetitas es la dificultad para crecer las bacterias magnetotácticas. Por tanto, y debido a que las propiedades magnéticas excepcionales de las magnetitas BCM vienen dadas en gran medida por la morfología y tamaño de esos cristales, el campo de la biomimética cobra una importancia decisiva. Es decir, si se demuestra que la morfología y tamaño de los cristales de magnetita BCM vienen determinados por interacción con una(s) determinada(s) proteína(s), el ser capaz de producirlas inorgánicamente en presencia de esa(s) proteína(s), a temperatura ambiente, sin depender para su producción de las tediosas y difíciles de crecer bacterias magnetotácticas, podría tener una amplia repercusión en nanobiotecnología, tal y como apuntan algunos autores (*Amemiya et al., 2007*).

### **Bibliografía**

*Altermann, W. (2004) Evolving life and its effect in Precambrian sedimentation. in “The Precambrian Earth Times and Events”. W. Altermann, D.R. Nelson, W. Mueller and O. Catuneanu (eds). Elsevier, Amsterdam, 539-545.*

*Amemiya, Y., Arakaki, A., Staniland, S.S., Tanaka, T. & Matsunaga, T. (2007) Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6. Biomaterials, 28, 5381-5389.*

*Arakaki, A., Webb, J. & Matsunaga, T. (2003) A novel protein tightly bound to bacterial magnetic*

- particles in *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1. *J. Biol. Chem.*, 278, 8745–8750.
- Baskar, S., Baskar, R., Mauclaire, L. & McKenzie, J. A. (2006) Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, India. *Curr. Sci. India*, 90, 58–64.
- Bazylinski, D. A., Garratt-Reed, A. J. & Frankel, R. B. (1994) Electron microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microsc. Res. Tech.*, 27, 389–401.
- (1995) Structure and function of the bacterial magnetosome. *ASM News*, 61, 337–343.
- , Frankel, R. B., Heywood, B. R., Mann, S., King, J. W., Donaghay, P. L. & Hanson, A. K. (1995) Controlled biomineralization of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) and greigite ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) in a magnetotactic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3232–3239.
- & Moskowitz, B. M. (1997) Microbial biomineralization of magnetic iron minerals: Microbiology, magnetism and environmental significance. *Rev. Mineral.*, 35, 181–223.
- & Frankel, R. B. (2003) Biologically controlled mineralization in prokaryotes. *Rev. Mineral. Geochem.*, 54, 95–114.
- & — (2004) Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 217–230.
- & Schübbe, S. (2007) Controlled biomineralization by and applications of magnetotactic bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.*, 62, 21–62.
- , Frankel, R. B. & Konhauser, K. O. (2007) Modes of biomineralization of magnetite by microbes. *Geomicrobiol. J.*, 24, 465–475.
- Beavon, J. & Heatly, N. G. (1963) The occurrence of struvite (magnesium ammonium phosphate hexahydrate) in microbial cultures. *J. Gen. Microbiol.* 31, 167–169.
- Beveridge, T. J. (1989) Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annu. Rev. Microbiol.*, 43, 147–171
- Blakemore, R. P. (1982) Magnetotactic Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 36, 217–238.
- Borowitzka, M. A. (1982) Mechanisms in algal calcification. *Prog. Phycol. Res.*, 1, 137–178.
- Cañaveras, J. C., Hoyos, M., Sánchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E., Bedoya, J., Soler, V., Groth, I. & Schumann, P. (1999) Microbial communities associated with hydromagnesite and needle-fiber aragonite deposits in a Karstic Cave (Altamira, Northern Spain) *Geomicrobiol. J.*, 16 (1), 9–25.
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G. & Perthuisot, J. P. (2000) Bacterial roles in the precipitation of carbonate minerals. in “Microbial Sediments”. R.E. Riding and S.M. Awramik (eds.) Berlin Springer-Verlag, 32–39.
- Ciftcioglu, N., Ciftcioglu, V., Vali, H., Turcott, E. & Kajander, E.O. (1998) Sedimentary rocks in our mouth: Dental pulp stones made by nanobacteria. in “Proceedings Of The Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (Spie)” R. B. Hoover (ed.) 3441: 130–136.
- Cummings, D. E., Caccavo Jr., F., Spring, S. & Rosenzweig, R. F. (1999) *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., a Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. *Arch. Microbiol.*, 171, 183–188.
- de Duve, C. (1995) The beginnings of life on Earth, *Am. Sci.*, 38, 428–437.
- Diaz-Ricci, J. C. & Kirschvink, J. L. (1992) Magnetic domain state and coercivity predictions for biogenic greigite ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ): A comparison of theory with magnetosome observations. *J. Geophys. Res.*, 97, 17309–17315.
- Dong, H., Fredrickson, J. K., Kennedy, D. W., Zachara, J. M., Kukkadapu, R. K. & Onstott, T. C. (2000) Mineral transformation associated with the microbial reduction of magnetite. *Chem. Geol.*, 169, 299–318.
- Frankel, R. B., Blakemore, R. P. & Wolfe, R. S. (1979) Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science*, 203, 1355–1356.
- & Bazylinski, D. A. (2003) Biologically induced mineralization by bacteria. *Rev. Mineral. Geochem.*, 54, 217–247.

- \_, Williams, T. J. & Bazylinski, D. A. (2007) Magneto-aerotaxis. in "Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria". D. Schüler (ed.), Vol. 3, 1–24. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Garrels, R. M. & Christ, C. L. (1990) *Solutions, Minerals and Equilibria*, 450, Jones and Bartlett, Boston.
- Gold, T. (1992) The deep, hot biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89, 6045-6049.
- Golden, D. C., Ming, D. W., Morris, R. V., Brearley, A., Lauer, H. V., Treiman, A. H., Zolensky, M. E., Schwandt, C. S., Lofgren, G. E. & McKay, G. A. (2004) Evidence for exclusively inorganic formation of magnetite in Martian meteorite ALH84001. *Am. Mineral.*, 89, 681-695.
- González-Muñoz, M. T., Ben Omar, N., Martínez-Cañamero, M., Rodríguez-Gallego, M., Galindo, A. L. & Arias, J. M. (1996) Struvite and calcite crystallization induced by cellular membranes of *Myxococcus xanthus*. *J. Cryst. Growth*, 163(4), 434-439.
- \_, De-Linares, C., Martínez-Ruiz, F., Morcillo, F., Martín-Ramos, D. & Arias, J. M. (2008) Ca–Mg kutnahorite and struvite production by *Idiomarina* strains at modern seawater salinities. *Chemosphere*, 72, 465-472.
- Gorby, Y. A. & Lovley, D. R. (1991) Electron transport in the dissimilatory iron-reducer, GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 867-870.
- Hernández-Hernández, A., Gómez-Morales, J., Rodríguez-Navarro, A.B., Gautron, J., Nys, Y. & García-Ruiz, J.M. (2008) Identification of some active proteins in the process of hen eggshell formation. *Cryst. Growth Des.*, 8 (12), 4330-4339.
- Hesse, P. P. (1994) Evidence for bacterial palaeoecological origin or mineral magnetic cycles in oxic and sub-oxic Tasman Sea sediments. *Mar. Geol.*, 117, 1-17.
- Jiménez-López, C., Rodríguez-Navarro, C., Pinar, G., Carrillo-Rosúa, F.J., Rodríguez-Gallego, M. & González-Muñoz, M.T. (2007) Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. *Chemosphere*, 68(10): 1929-1936.
- \_, Jroundi, F., Pascolini, C., Rodríguez-Navarro, C., Piñar-Larrubia, G., Rodríguez-Gallego, M. & González-Muñoz, M.T. (2008) Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62 (4), 352-363.
- \_, Romanek, C. S. & Bazylinski, D. A (2010) Magnetite as a prokaryotic biomarker: A review. *J. Geophys. Res.*, 115, G00G03, doi: 10.1029/2009JG001152
- Kajander, E.O & Çiftçioglu, N. (1998) Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 8274-8282.
- Keim, C. M., Lins, U. & Farina, M. (2009) Manganese in biogenic magnetite crystals from magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 292, 250-253.
- Kempe, S. & Kazmierczak, J. (1990) Calcium carbonate supersaturation and the formation of in situ calcified stromatolites. in "Facets of Modern Biogeochemistry". V. Ittekkot, S. Kempe, W. Michaelis and A. Spitz (eds), Springer-Verlag, Berlin 255-278.
- Komeili, A., Vali, H., Beveridge, T. J. & Newman, D. K. (2004) Magnetosome vesicles are present before magnetite formation and MamA is required for their activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 3839–3844.
- \_, Li, Z., Newman, D. K. & Jensen, G. J. (2006) Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science*, 311, 242–245.
- Konhauser K. O. (1998) Diversity of bacterial iron mineralization. *Earth-Sci. Rev.* 43 (3-4), 91-12.
- \_ (2007) *Introduction to Geomicrobiology*. Blackwell publishing.
- Kukkadapu, R. K., Zachara, J. M., Fredrickson, J. K. Kennedy, D. W. I., Dohnalkova, A. C. & McCready, D. E. (2005) Ferrous hydroxy carbonate is a stable transformation product of biogenic magnetite. *Am.*

*Mineral.*, 90(2-3), 510-515.

\_, \_, \_, McKinley, J. P., Kennedy, D. W. I., Smith, S. C. & Dong, H. (2006) Reductive biotransformation of Fe in shale-limestone saprolite containing Fe(III) oxides and Fe(II)/Fe(III) phyllosilicates. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 70(14), 3662-3676.

Ledger, P. W. & Franc, S. (1978) Calcification of the collagenous axial skeleton of *Veretillum cynomorium* Pall. (Cnidaria: Pennatulacea) *Cell Tissue Res.*, 192 (2), 249-266.

Lovley, D. R., Chapelle, F. H. & Phillips, E. J. P. (1990) Fe(III)-reducing bacteria in deeply buried sediments of the Atlantic Coastal Plain. *Geology*, 18, 954-957.

\_ (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.*, 55(2), 259-287.

Lowenstam, H. A. (1967) Lepidocrocite, an apatite mineral and magnetite in teeth of chitons (polyplacophora). *Science*, 156 (3780), 1373-1375.

\_ (1981) Minerals formed by organisms. *Science* 211, 1126-1131.

\_, Traub, W. & Weiner, S. (1984) *Nautilus* hard parts: a study of the mineral and organic constituents. *Paleobiology*, 10 (2), 268-279.

\_ & Weiner, S. (1989) *On Biomineralization*. Oxford Univ. Press, New York.

Mann, S., Frankel, R. B. & Blakemore, R. P. (1984a) Structure, morphology and crystal growth of bacterial magnetite. *Nature*, 310, 405-407.

\_, Moench, T. T. & Williams, R. J. P. (1984b) A high resolution electron microscopic investigation of bacterial magnetite. Implications for crystal growth. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.*, 221, 385-393.

\_ (1986) On the nature of boundary-organized biomineralization. *J. Inorg. Chem.*, 28, 363-371.

\_, Sparks, N. H. C. & Blakemore, R. P. (1987) Ultrastructure and characterization of anisotropic magnetic inclusions in magnetotactic bacteria. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.*, 231, 469-476.

\_, Sparks, N. H. C., Frankel, R. B., Bazylinski, D. A.

& Jannasch, H. W. (1990) Biomineralization of ferri-magnetic greigite ( $Fe_3S_4$ ) and iron pyrite ( $FeS_2$ ) in a magnetotactic bacterium. *Nature*, 343, 258-261.

\_, \_, Walker, M. M. & Kirschvink, J. L. (1988) Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: implications for magnetoreception. *J. Exp. Biol.*, 140, 35-49.

\_ (2001) *Biomineralization, Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford University Press.

Matsunaga, T. (1991) Applications of bacterial magnets. *Trends Biotechnol.* 9, 91-95.

McKay, D. S., Gibson Jr., E. K., Thomas-Keppta, K. L., Vali, H., Romanek, C. S., Clemett, S. J., Chillier, X. D., Maechling, C. R. & Zare, R. N. (1996) Search for past life on Mars: Possible relic biogenic activity in martian meteorite ALH84001. *Science*, 273, 924-930.

McMichael, R. D., Shull, L. J., Swartzendruber, L. H., Bennett, R. E. & Walson, J. (1992) Magnetocaloric effect in superparamagnets. *J. Magn. Magn. Mater.*, 111, 29-33.

Meldrum, F. C., Mann, S., Heywood, B. R., Frankel, R. B. & Bazylinski, D. A. (1993) Electron-microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.*, 251, 231-236.

Molloy, E.S. & McCarthy, G.M. (2003) Hydroxyapatite deposition disease of the joint. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 5 (3), 215-221.

Nealson, K. H. & Myers, C. R. (1990) Iron reduction by bacteria: a potential role in the genesis of banded iron formations. *Am. J. Sci.*, 290 A, 35-45.

Nelson, B., Struble, J. & McCarthy, G. (1991) In vitro production of struvite by *Bacillus pumilus*. *Can. J. Microbiol.*, 37 (12), 978-983.

Ottow, J. E. G. & Glathe, H. (1971) Isolation and identification of iron-reducing bacteria from gley soils. *Soil Biol. Biochem.* 3, 43-55.

Pérez-González, T., Jiménez-López, C., Neal, A. L.,

- Rull-Pérez, F., Rodríguez-Navarro, A., Fernández-Vivas, A. & Iañez-Pareja, E. (2010) Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 74(3), 967-979.
- Perry, A., Bauer, G. B. & Dizon, A. E. (1985) Magnetoreception and biomineralization of magnetite in amphibians and reptiles. in: "Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms" J. L. Kirschvink, D. S. Jones and B. J. MacFadden (ed.) Plenum Press, New York. 439-453.
- Pósfai, M., Buseck, P. R., Bazylinski, D. A. & Frankel, R. B. (1998) Reaction sequence of iron sulfide minerals in bacteria and their use as biomarkers. *Science*, 280, 880-883.
- Prozorov, T., Mallapragada, S. K., Narasimhan, B., Wang, L., Palo, P., Nilsen-Hamilton, M., Williams, T. J., Bazylinski, D. A., Prozorov, R. & Canfield, P. C. (2007) Protein-mediated synthesis of uniform superparamagnetic magnetite nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.*, 17, 951-957.
- , Pérez-González, T., Jiménez-López, C., Mallapragada, S. K., Howse, P., Bazylinski, D. A. & Prozorov, R. (2010) Iron et. al.: The Incorporation of Manganese into the Crystal Lattice of Magnetosome Magnetite. *J. R. Soc. Interface* (under review).
- Riding, R. (2000) Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology*, 47, 179-214.
- Rivadeneira, M. A., Delgado, R., Del Moral, A., Ferrer, M. R. & Ramos-Cormenzana, A. (1993) Precipitation of calcium carbonate by *Vibrio* s from an inland saltern. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 13 (3), 197-204.
- , Párraga, J., Delgado, R., Ramos-Cormenzana, A. & Delgado, G. (2004) Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 48 (1), 39-46.
- Rizzo, A. A., Martin, G. R., Scott, D. B. & Mergenhagen, S. E. (1962) Mineralization of bacteria. *Science*, 135 (3502), 439-441.
- Rodríguez-Navarro, C., Rodríguez-Gallego, M., Ben Chekroun K. & González-Muñoz, M.T. (2003) Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2182-2193.
- , Jiménez-López, C., Rodríguez-Navarro, A., González-Muñoz, M.T. & Rodríguez-Gallego, M. (2007) Complex biomineralized vaterite structures encapsulating bacterial cells. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 71, 1197-1213.
- Roh, Y., Gao, H., Vali, H., Kennedy, D. W., Yang, Z. K., Gao, W., Dohnalkova, A. C., Stapleton, R. D., Moon, J. W., Phelps, T. J., Fredrickson, J. K. & Zhou, J. (2006) Metal Reduction and Iron Biomineralization by a Psychrotolerant Fe(III)-Reducing Bacterium, *Shewanella* sp. Strain PV-4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(5), 3236-3244.
- Schwartz, M., Lund, S. P., Hammond, D. E., Schwartz, R. & Wong, K. (1997) Early sediment diagenesis on the Blake/Bahama outer ridge, North Atlantic ocean and its effects on sediment magnetism. *J. Geophys. Res.*, 102, 7903-7914.
- Shinano, H. & Sakai, M. (1975) Effect of magnesium ion concentration on the types of crystals deposited by marine bacteria in sea water. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 41, 913.
- Simkiss, K. (1986) The processes of biomineralization in lower plants and animals- an overview. in: "Biomineralization in lower plants and animals" B. S. C. Leadbeater and R. Riding (eds.). Oliver and Boyd Ltd., Edinburgh. 3-25
- & Wilbur, K. M. (1989) Biomineralization. *Cell Biology and Mineral Deposition*, 337, Academic Press, Inc., San Diego.
- Simoneit, B. R. T. (2002) Molecular indicators (biomarkers) of past life. *Anat. Record* 268(3), 186-195.
- Sokolova, T., Hanel, J., Onyenwoke, R. U., Reysenbach, A. L., Banta, A., Geyer, R., González, J. M., Whitman, W. B. & Wiegel, J. (2007) Novel chemolithotrophic, thermophilic, anaerobic bacteria *Thermolithobacter carboxydivorans* sp. nov. *Extremophiles*, 11,145-147.
- Staniland S., Williams, W., Telling, N., Van Der Laan, G., Harrison, A. & Ward, B. (2008) Controlled cobalt doping of magnetosomes in vivo. *Nat. Nanotechnol.*, 3, 158-162



- Thomas-Keprta, K. L., Bazylinski, D. A., Kirschvink, J. L., Clemett, S. J., McKay, D. S., Wentworth, S. J., Vali, H., Gibson Jr., E. K. & Romanek, C. S. (2000) Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: potential Martian magnetofossils. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 64, 4049-4081.
- Tiano, P., Biagiotti, L., & Mastromei, G. (1999) Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: Methods of evaluation. *J. Microbiol. Meth.*, 36 (1-2), 139-145
- Torres de Araujo, F. F., Pires, M. A., Frankel, R. B. & Bicudo, C. E. M. (1986) Magnetite and magnetotaxis in algae. *Biophys. J.*, 50, 375-378.
- Vali, H., Weiss, B., Li, Y. -L., Sears, S. K., Soon, S. K., Kirschvink, J. L. & Zhang, C. L. (2004) Formation of tabular single-domain magnetite induced by *Geobacter metallireducens* GS-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (46), 16121-16126.
- Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E. L. & Lovley, D. R. (1998) Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature*, 395, 65-67.
- Wilbur, K. M. & Bernhardt, A. M. (1984) Effects of amino acids, magnesium and molluscan extrapallial fluid on crystallization of calcium carbonate: In vitro experiments. *Biol Bull.*, 166, 251-259.
- Wright, D. T. (1999) The role of sulphate-reducing bacteria and cyanobacteria in dolomite formation in distal ephemeral lakes of the Coorong region, South Australia. *Sediment. Geol.*, 126 (1-4), 147-157.
- & Wacey, D. (2005) Precipitation of dolomite using sulphate-reducing bacteria from the Coorong Region, South Australia: significance and implications. *Sedimentology*, 52, 987-1008.
- Wunderbaldinger, P., Josephson, L. & Weissleder, R. (2002) Tat peptide directs enhanced clearance and hepatic permeability of magnetic nanoparticles. *Bioconjugate Chem.*, 13, 264 -268.
- Ye, Q., Roh, Y., Carroll, S. L., Blair, B., Zhou, J., Zhang, C. L. & Fields, M. W. (2004) Alkaline Anaerobic Respiration: Isolation and Characterization of a Novel Alkaliphilic and Metal-Reducing Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(9), 5595-5602.
- Zachara, J. M., Kukkadapu, R. K., Fredrickson, J. K., Gorby, Y. A. & Smith, S. C. (2002) Biomíneralization of poorly crystalline Fe(III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB). *Geomicrobiol. J.* 19, 179-207.
- Zavarzina, D. G., Kolganova, T. V., Boulygina, E. S., Kostrikina, N. A., Tourova, T. P. & Zavarzin, G. A. (2006) *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov. sp. nov., the First Alkaliphilic Representative of the Family Geobacteraceae, Isolated from a Soda Lake. *Microbiology*, 75(6), 673-682.