

## BIOMINERALES DE OXALATO DE CALCIO EN SUELOS DE LAGUNA DE LOS PADRES, BUENOS AIRES, ARGENTINA.

M L OSTERRIETH<sup>1</sup>, F OYARBIDE<sup>1,2</sup>, V BORDAS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Geología de Costas y del Cuaternario, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

<sup>2</sup>Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

<sup>3</sup>Facultad de Farmacia, Universidad Nacional de Valencia, España.

Recibido 21 de diciembre de 1999, aceptado 19 de mayo de 2000

### CALCIUM OXALATE BIOMINERALS IN SOILS OF LAGUNA DE LOS PADRES, BUENOS AIRES, ARGENTINA.

The general mineralochemical characteristics of calcium oxalate: whewellite ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) and weddellite ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot (2+X) \text{H}_2\text{O}$ ) from litter layer and minerals horizons of the Pampean Plains soil are described by first time in Argentine. The studies are carried out using polarisation microscopy and scanning electron microscopy plus energy dispersive microanalysis. The results indicate a predominance of weddellite crystals such as twinned tetragonal dipyrmaid and bipyramid crystals arranged as rossetes and druses with sizes varying between 5 and 10  $\mu\text{m}$  in the litter layer of the acacia forest. The whewellite, pseudo-rhombohedral, isodiametric crystals, appear as individual 5  $\mu\text{m}$  diameter crystals and rossetes 5 to 10  $\mu\text{m}$  diameters crystals, can be found in the A horizons of forest and grass prairie. A direct relation has been found between: humidity degree, development of the litter layer and fungi colonisation, with respect the amount and development of biominerals.

**Key words:** biominerals, whewellite, weddellite, fungi, Argiudolls.

**Palabras claves:** biominales, whewellite, weddellite, hongos, Argiudoles.

### INTRODUCCION

Los biominerales son estructuras minerales de naturaleza biogénica generadas a partir de la actividad metabólica de diferentes organismos inferiores tales como bacterias, hongos, algas y líquenes, así como por algunos organismos superiores. En el caso particular de los biominerales de oxalato de calcio han sido identificadas dos especies, whewellita y weddellita. La primera de ellas, whewellita, resulta una forma monohidratada ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), mientras que la segunda, weddellita, es polihidratada ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot (2+X) \text{H}_2\text{O}$ ). Ambas especies minerales biogénicas resultan muy raras en ambientes geológicos aunque comunes en tejidos vegetales, animales y en hongos. Particularmente estos últimos producen, a través de su actividad metabólica, biominerales de carbonato y de oxalato de calcio. La presencia de oxalato de calcio dentro del reino Fungi fue señalada por primera vez por Schmidt en 1847 (Horner *et al.* 1983), siendo desde entonces numerosas las investigaciones describiendo la presencia

de estos biominerales asociados a distintos grupos fúngicos.

Actualmente existen dos hipótesis referidas al proceso de biomineralización fúngica, una de naturaleza extracelular y la otra intracelular. Con relación a la génesis extracelular, los cristales de oxalato de calcio resultarían de la interacción entre el ácido oxálico excretado por los hongos y el calcio disponible en el ambiente (Graustein *et al.* 1977; Cromack *et al.* 1979). Por su parte, la hipótesis intracelular sostiene la formación de cristales dentro de la hifa, resultado directo del metabolismo fúngico (Arnott 1982). Una visión alternativa a ambas plantea la posibilidad que el hongo intervenga activamente en la producción de los cristales, siendo retenidos, al menos temporariamente, por una envoltura extraparietal (Lapeyrie 1988).

Si bien existen antecedentes respecto a la presencia de biominerales de oxalato de calcio en suelo, no ha sido aún citada la presencia de whewellita y weddellita en

sedimentos y/o suelos de Argentina. Este trabajo pretende ser la primera descripción general de las características mineralo-químicas y ambientales de ambas especies biominerales generadas por acción fúngica en horizontes orgánicos y minerales de Argiudoles típicos.

## MATERIALES Y METODOS

### Área de estudio

Se trabajó en dos suelos Argiudoles típicos ubicados en lomas eólicas de la Reserva Intangible de Laguna de los Padres (Buenos Aires, Argentina) (Figura 1), con diferente tipo de cobertura vegetal dominante: bosque de acacias y pradera de gramíneas.

El bosque de acacias se compone de manera dominante por ejemplares de *Acacia* sp. asociado a *Rubus* sp. (zarzamora), planta invasora introducida, de notable diseminación en las últimas décadas, manifestándose de hábito rastrero con

masivo enraizamiento a nivel superficial del suelo. Por su parte, la pradera se compone mayoritariamente de los siguientes ejemplares de gramíneas de alto porte: *Holcus lanatus*, *Poa lanigera*, *Bromus unioloides*, *Paspalum quadrifarium*, *Raphanus* sp., y *Brassica* sp. Observándose también una importante presencia de *Colletia paradoxa* (curro), arbusto espinoso y subáfilo que constituye una especie autóctona de amplia difusión, y de *Rubus* sp. (Osterrieth *et al.* 1996).

El clima de la zona es de tipo mesotermal y subhúmedo, con nula deficiencia de agua. La precipitación media anual es de 809mm y la temperatura media anual de 13,7° C. La temperatura de los suelos, de acuerdo a lo establecido por Soil Taxonomy (1975), es de tipo méxico y el régimen de humedad údico.

Las lomas con alturas relativas entre 20 y 35 msnm muestran predominio de lavado superficial, lo cual sumado a la densa cobertura vegetal presente en el área de estudio, favorece el predominio de escurrimiento mantiforme. Esto



Figura 1. Mapa de ubicación del área de estudio, Reserva Natural de Laguna de los Padres (Buenos Aires). Cobertura vegetal caracterizada por: (E1) pradera de gramíneas y (E2) bosque de acacias.

Figure 1. Location of Laguna de los Padres Natural Reserve, the area under study. Soils covered by: (E1) grass prairie and (E2) acacia forest.

constituye un elemento ambiental importante en el suministro de humedad al suelo, factor condicionante de la presencia y desarrollo de organismos asociados (Osterrieth *et al.* 1996).

Los suelos estudiados se caracterizan por no poseer carbonatos de calcio en el solum, sólo aparecen niveles de tosca debajo de los 2,5 metros

de profundidad. Los valores de calcio de intercambio en el horizonte A del bosque de acacias y de la pradera de gramíneas son 19,3 cmol kg<sup>-1</sup> y 15,8 cmol kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

### Metodología

El muestreo se llevó a cabo entre abril y

Tabla 1a: Características morfológicas y fisico-químicas del suelo en el bosque de acacias.

Table 1a: Morphological and physico-chemical characteristics of acacia forest soils.

Horizonte	Profundidad (cm)	Color Húmedo	Estructura	Barnices	Textura	pH 1:1/1:2.5
<b>Oi</b>	0-3	-	-	-	-	-/5.95
<b>Oe</b>	3-7.5	-	-	-	-	5.44/5.35
<b>Oa</b>	7.5-9	-	-	-	-	5.51/5.20
<b>A</b>	9-45	10YR2/1	Granular Med.mod.	-	FL	5.90/6.21
<b>B1</b>	45-50	10YR3/2	Bloques Med.mod.	Húm.-arc. +	FL	n.d.
<b>B2t</b>	50-70	10YR3/2	Pr.med. Mod./frit.	Húm.-arc. +++	FL	n.d.
<b>B3t</b>	70-114	10YR4/3	Pr.med. Mod./déb.	Húm.-arc. ++	FL	n.d.
<b>C</b>	114 +	10YR5.5/4	Masivo	-	FLA	n.d.

Tabla 1b: Características morfológicas y fisico-químicas del suelo en la pradera de gramíneas.

Table 1b: Morphological and physico-chemical characteristics of grass prairie soils.

Horizonte	Profundidad (cm)	Color Húmedo	Estructura	Barnices	Textura	pH 1:1/1:2.5
<b>Oi</b>	0-3	-	-	-	-	-/6.30
<b>A</b>	3-39	10YR2/1	Granular Med.mod.	-	FL	6.10/6.35
<b>B1</b>	39-44	10YR3/2	Bloques Med.mod.	Húm.-arc. +	FL	n.d.
<b>B2t</b>	44-59	10YR3/2	Pr.med. Mod./frit.	Húm.-arc. +++	FL	n.d.
<b>B3t</b>	59-103	10YR4/3	Pr.med. Mod./déb.	Húm.-arc. ++	FL	n.d.
<b>C</b>	103 +	10YR5.5/4	Masivo	-	FLA	n.d.

Referencias Tabla 1 a y b: += escaso; +++= abundante; ++++= muy abundante. Med.mod.= medio moderado; Pr.med.= prismas medianos; Mod./frit.= moderado fuerte; Mod./déb.= moderado débil; Húm.-arc.= húmico arcilloso; FL= franco limoso; FLA= franco limo arenoso; n.d.= no se dispone de datos.

References of Tables 1a and 1b: +=low content; +++= medium content; ++++= high content. Med.mod.= medium to moderate; Pr.med.= medium prisms; Mod./frit.= moderate to strong; Mod./déb.= moderate to weak; Húm.-arc.= humus-clay; FL= loamy silt; FLA= loamy silt sandy; n.d.= no data available.

julio de 1995, trabajándose con tres réplicas por horizonte bajo estudio y preservándose en frío (5°C) todo el material colectado hasta el momento de su procesamiento, considerando un lapso no mayor de 48hs. posteriores a la toma de las muestras.

La descripción morfológica de los suelos fue realizada con relación a lo establecido por Soil Taxonomy (1975). Se determinó el pH en pasta y en agua (1:2,5) con peachímetro Orion R. 501. Además, se determinó el contenido de ión calcio en los horizontes Oi de ambos suelos por servicio del Laboratorio de Química Geológica y Edafológica (CONICET), Buenos Aires.

Los cristales de oxalato de calcio se analizaron mediante muestras de 3 x 3 mm bajo microscopio de polarización C. Zeiss Jenna. También se utilizó para tal fin microscopía electrónica de barrido, equipos Jeol T-100 e Hitachi, y estudios semicuantitativos a través de EDAX convencional y con ventana de Be, operando entre 15 y 25 kV.

## RESULTADOS

### Características morfológicas y fisico-químicas de los suelos

Ambos suelos evidenciaron similares características morfológicas y fisico-químicas, observándose diferencias mayores en la composición y desarrollo de los horizontes orgánicos, y menores en los valores de pH (Tabla 1 a y b).

En el bosque de acacias se diferenciaron tres horizontes orgánicos: Oi, Oe y Oa, evidenciando un importante desarrollo en el perfil correspondiente. El horizonte Oe se caracterizó por presentar la mayor cobertura fúngica asociada al material vegetal, observándose matas miceliales desarrollándose sobre la superficie del recurso orgánico.

En la pradera de gramíneas sólo se diferenció un horizonte orgánico, Oi, con escasa presencia fúngica.

El contenido de ión calcio en los horizontes Oi de ambos suelos resultaron: 1.96 para el bosque de acacias y 1.70 para la pradera de gramíneas, ambos valores expresados como contenido porcentual de  $\text{Ca}^{2+}$  respecto del total de muestra analizada (gramos de calcio por cada 100 gramos de peso seco de muestra).

### Características mineralógicas y químicas de los cristales de oxalato de calcio

Se observaron cristales de oxalato de

calcio en todos los horizontes O y A analizados. Estos se presentaron en cantidades variables: desde muy escasos en los horizontes A de ambos suelos y en el horizonte Oi correspondiente a la pradera de gramíneas, a muy abundantes en los horizontes orgánicos del bosque de acacias (Figura 2). Los máximos tenores se hallaron en los horizontes Oe y Oa de este último sitio.

Las observaciones realizadas mediante microscopía de polarización mostraron cristales individuales y grupos regulares e irregulares de cristales asociados con una densa red micelial. Los cristales resultaron traslúcidos, con bajo índice de refracción, 1,53 a 1,56 aproximadamente; uniáxicos positivos y bien definidos con figura de interferencia central en posición perpendicular a la cara piramidal. Al cruzar los nicoles presentaron alta birrefringencia y un sombreado cruciforme o de cruz oscura central.

Las observaciones mediante microscopía electrónica de barrido permitieron observar cristales de hábito planar, euédricos, predominantemente bipiramidales y bipirámides tetragonales con tamaño de micrones. Merced al mayor nivel de resolución provisto por el instrumental se diferenciaron las siguientes morfologías cristalinas:

- 1) Cristales individuales o núcleos primarios, de morfología bipiramidal y bipirámide tetragonal, de 8 caras con tamaños entre 1 y 4  $\mu\text{m}$ . Estos fueron observados en todos los horizontes analizados, destacándose la posición interna de los cristales con relación a la superficie de la hifa (Figura 3).
- 2) Rosetas formadas por cristales bipiramidales entrecruzados, dispuestas a modo de cuentas de rosario y con tamaños de 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estas morfologías, presentes en todos los horizontes, aparecieron siempre en estrecha relación con las hifas. También se observaron rosetas individuales de hasta 8  $\mu\text{m}$  de largo por 5  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 4 y 5).
- 3) Drusas, morfología común de masa cristalina irregular formada por agregados de cristales bipiramidales y/o bipirámides tetragonales estrechamente

empaquetados, con tamaños promedios de 8 a 12 $\mu$ m. Los cristales más pequeños se disponen en el centro aumentando sus tamaños hacia la periferia. Estas formas se observaron predominantemente en los horizontes Oe y Oa del bosque de acacias, presentándose en grandes masas y

siendo poco apreciable su relación con las hifas (Figura 7). La densa cobertura definida por dichas drusas se evidenció mediante el análisis semicuantitativo de contenido de calcio (Figura 8).

Todas las superficies de los granos cristalinos se observaron lisas y angulosas, no

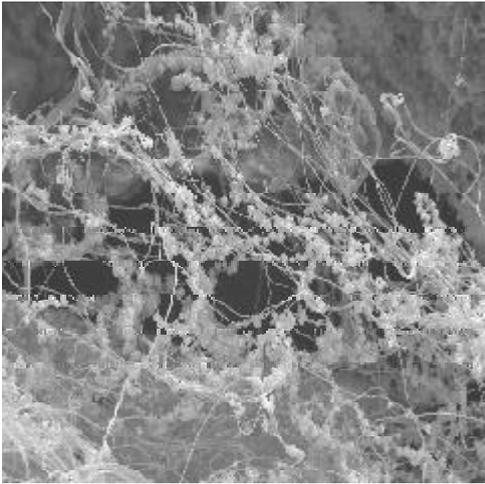


Figura 2.

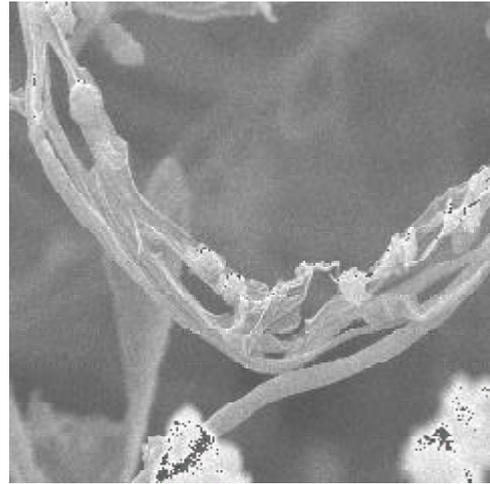


Figura 3.

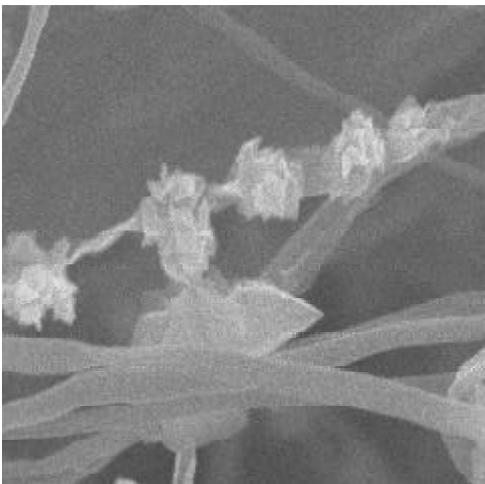


Figura 4.

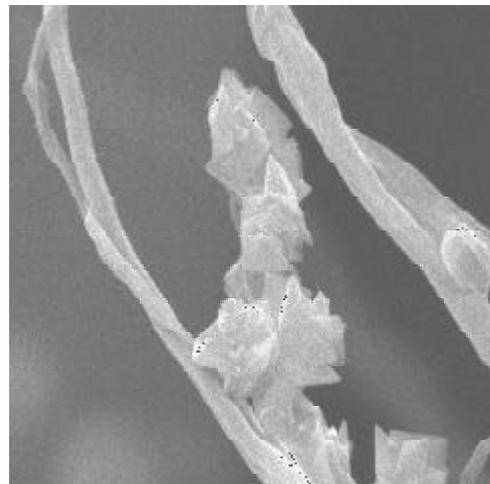


Figura 5.

Figuras 2 - 5. Horizonte Oe. (2) Vista general de hifas con cristales asociados, evidenciando una importante densidad (MEB, barra: 100 $\mu$ m); (3) núcleos primarios dispuestos internamente respecto de la hifa (MEB, barra: 10 $\mu$ m); (4) rosetas, formadas por cristales bipiramidales entrecruzados, distribuidas a modo de cuentas y en estrecha relación con la hifa (MEB, barra: 100 $\mu$ m); (5) rosetas individuales de gran desarrollo (MEB, barra: 10 $\mu$ m).

Figure 2 - 5. Oe horizon. (2) General view of hyphae with associated crystals, showing a high density (MEB, bar=100  $\mu$ m); (3) primary nuclei within the hypha (MEB, bar= 10 $\mu$ m); rosette made up of bi-pyramidal overcrossed crystals, distributed as neckless beads and closely related to the hypha (MEB, bar=10 $\mu$ m); individual, highly developed rosettes (MEB, bar= 10 $\mu$ m).

evidenciándose efectos de corrosión o abrasión.

De acuerdo a las características morfológicas resultantes de los cristales

analizados, se evidencia un predominio de la especie biomineral weddellita en todos los horizontes considerados. Sólo unos pocos cristales monoclinicos isodiamétricos de

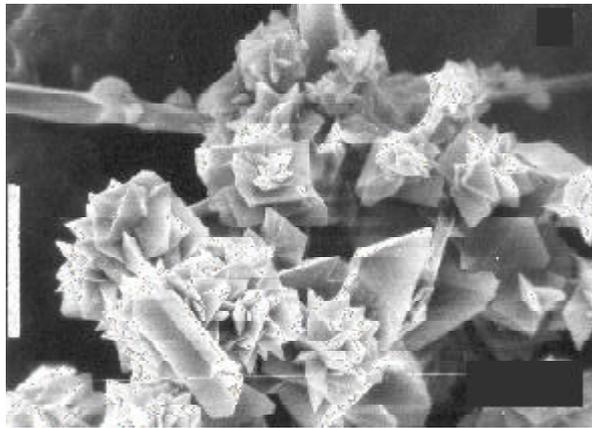


Figura 6. Horizonte Oe. Drusas, cristales de forma bipiramidal y/o bipirámides tetragonales agregados y estrechamente empaquetados entre sí (MEB, barra: 10 $\mu$ m).

Figure 6. Druses, bipyramidal and/or tetragonal bipyramidal aggregates, closely packed among themselves (MEB, bar= 10 $\mu$ m).

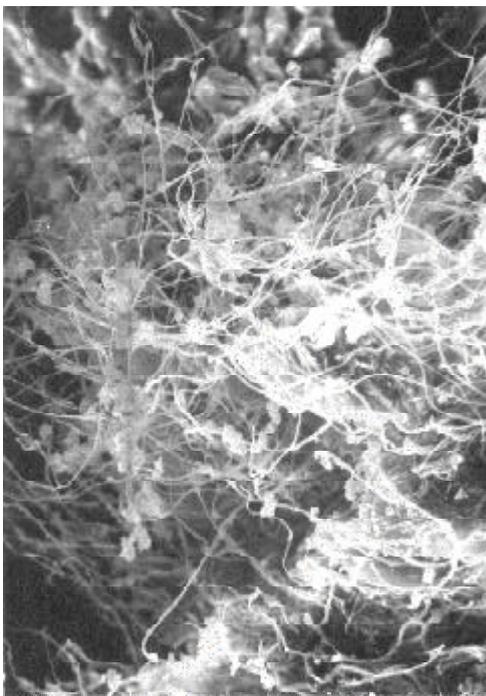


Figura 7. Horizonte Oe. Drusas asociadas con micelio (MEB, barra: 100 $\mu$ m).

Figure 7. Oe horizon. Druses associated with mycelio (MEB, bar=100 $\mu$ m).



Figura 8. Microanálisis semicuantitativo sobre densa cobertura de drusas. Resultado indicando la presencia de calcio en los cristales (MEB, barra: 100 $\mu$ m).

Figure 8. Semi-quantitative micro analysis on a high-density druse surface. Results indicate presence of calcium within the crystals (MEB, bar=100  $\mu$ m).

whewellitita, con forma de tablas prismáticas o pseudorómbicas, se observaron en el horizonte Oi de gramíneas.

La microprueba mediante EDAX utilizando ventana de Be, en muy alto vacío, indicó altos contenidos de carbono y menores de calcio en los cristales individuales o núcleos primarios (Figura 9 a y b).

## DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos, y comparando ambas situaciones, el bosque de acacias se evidencia como el sitio más favorable al proceso de biomineralización fúngica. Esto se expresa en una mayor abundancia y desarrollo de cristales en sus horizontes orgánicos del suelo, con ambas especies biominerales desarrolladas, y siendo weddellita el componente mayoritario.

Teniendo en cuenta que ambos sitios de estudio pertenecen a una misma unidad geomorfológica, con un mismo tipo de suelo, Argiudol típico, y con ausencia de prácticas de manejo, condiciones microambientales

específicas son las que incidirían de manera diferencial en el proceso de biomineralización. Entre dichas condiciones se destaca como factor clave el aporte de material vegetal al suelo.

Si se tiene en cuenta el escaso nivel de descomposición y mineralización del material orgánico que caracteriza al horizonte Oi, los valores obtenidos de ión calcio en dicho horizonte estarían brindando valores muy aproximados a su contenido en cada tipo de cobertura vegetal. Este resultado, por lo tanto, estaría indicando una diferencia favorable al proceso de biomineralización, del bosque de acacias con respecto a la pradera de gramíneas, dada específicamente por el mayor aporte de material vegetal y no tanto por la naturaleza del mismo.

Debe destacarse que los antecedentes vinculados a la producción de cristales de oxalato de calcio en suelo por acción fúngica, fueron desarrollados en suelos de ecosistemas forestales con importantes niveles orgánicos y gran desarrollo de biominerales, fundamentalmente weddellita (Graustein *et al.*

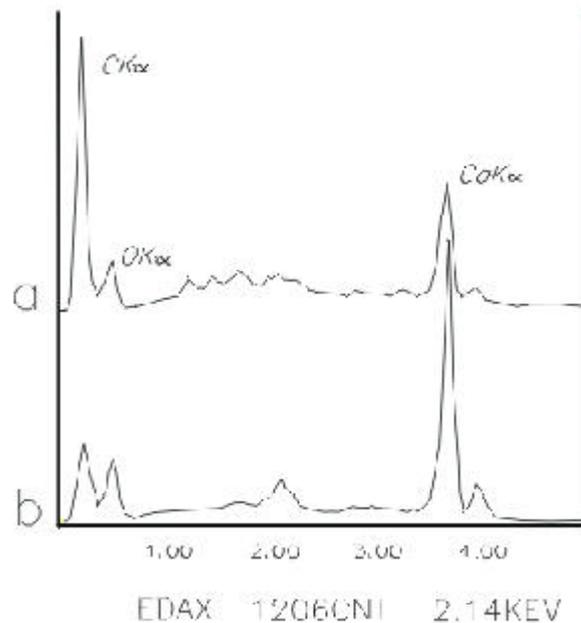


Figura 9. Microanálisis semicuantitativo de contenido de calcio por medio de microprueba de EDAX con ventana de Be. Oxalato de calcio: a) núcleos primarios; b) drusas. Ordenada: abundancia de elementos; abscisa: presencia de elementos.

Figure 9. Semi-quantitative microanalysis of calcium content using EDAX micro assay with Be window. Calcium oxalate: a) primary nuclei; b) druses. Y axis: element abundance; X axis: element presence.

1977; Cromack *et al.* 1979; Horner *et al.* 1983).

Con relación a la alta producción de weddellita respecto a whewellita, ello podría explicarse por la elevada disponibilidad de humedad, lo cual facilitaría la formación de cristales polihidratados. Cabe señalar que dicha situación hídrica se ve favorecida por la composición de los horizontes B2t y B3t, presentes en los perfiles edáficos de ambos sitios, los cuales posibilitan la retención de agua en los horizontes superiores del suelo. Asimismo, los cristales de weddellita se presentan en todos sus estadios de desarrollo citados para la especie mineral (Horner *et al.* 1983), desde los denominados "núcleos primarios", pasando por un estadio intermedio compuesto por "rosetas", hasta el estadio que representa el mayor grado de complejidad en el arreglo espacial, las drusas.

Se considera que ante la evidencia de los resultados obtenidos, durante el desarrollo del proceso de biomineralización intervendrían de manera fundamental, como factores condicionantes del mismo: el grado de hidratación del medio, la abundancia del recurso orgánico vegetal y la presencia fúngica. Dichos condicionantes afectarían la disponibilidad de calcio en el medio, la actividad biomineralizadora y los niveles de complejidad creciente de los biominerales, en cuanto a su tamaño y arreglo espacial.

En cuanto al origen intra o extracelular de los cristales, tanto la regularidad de las hileras de rosetas, así como la observación de los núcleos primarios contenidos por algún tipo de envoltura fúngica y los resultados obtenidos mediante la carta de distribución de calcio, sostendrían la hipótesis de formación intracelular.

De acuerdo a ello se propone el siguiente esquema: durante los estadios iniciales de desarrollo cristalino sólo se diferencian cristales individuales y unos pocos grupos de cristales en forma de rosetas; en estadios sucesivos se incrementa el tamaño y complejidad en el arreglo de los cristales (rosetas), disrumpiendo la envoltura fúngica y quedando finalmente expuestos al medio.

Con el fin de lograr un conocimiento detallado del complejo proceso de biomineralización fúngico que permita

avanzar sobre las hipótesis planteadas, es importante destacar la necesidad fundamental de profundizar en el estudio de las rutas metabólicas y fisiológicas implicadas en la formación de los biominerales fúngicos de oxalato de calcio, así como respecto a los factores de naturaleza fisicoquímica y biológica que condicionan el crecimiento, la nucleación y el nivel de complejidad de los cristales.

## CONCLUSIONES

El presente estudio constituye la primera evidencia y descripción de los biominerales de oxalato de calcio weddellita y whewellita en Argiudoles típicos, y la primera referencia de su presencia en suelos de Argentina.

De las dos especies biominerales encontradas weddellita es la más abundante. Se distinguen tres morfologías para los cristales de weddellita: núcleos primarios, rosetas y drusas.

Se evidencia una estrecha relación entre abundancia del recurso orgánico vegetal, colonización fúngica y abundancia de biominerales desarrollados.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con la asistencia financiera de los proyectos E106/97 de la Universidad Nacional de Mar del Plata y 1796/98 de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. Los autores agradecen particularmente a las Cartógrafas Mónica Tomás y Virginia Bernasconi por su colaboración fundamental en la presentación del trabajo. Asimismo, se agradece la inestimable colaboración y asistencia brindada por Jorge Batlle Salles de la Universidad de Valencia, España.

## REFERENCIAS

- Arnott, HJ. 1982. Calcium oxalate (weddellite) crystals in forest litter. *Scanning Electron Microscopy* 3: 1141-1149.
- Cromack, K Sollins, P Graunstein, W, Spiedel, K, Todd, A, Spycher, C, Todd, R. 1979. Calcium oxalate accumulation and soils weathering in mats of the hypogeous fungus *Hysterangium crassum*. *Soil Biochem.* 11: 463-468.

- Graustein, WC, Cromack, K, Sollins, P. 1977. Calcium oxalate: Occurrence in soils and effects on nutrient and geochemical cycles. *Science*. 198. p. 1252-1254.
- Horner H, Tiffani L, Cody A. 1983. Formation of oxalate crystal associated with apothecia of the Discomycete *Dasyscypha capitata*. *Mycologia*. 75(3): 423-435.
- Lapeyrie, F. 1988. Oxalate synthesis from soil bicarbonate by the mycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Plant and Soil*. 110:3-8.
- Osterrieth, M, Fernández, C, Bilat, Y, Martínez, P, Martínez, G. 1996. Interacción entre parámetros bióticos y abióticos en Argiudoles afectados por prácticas agrícolas en Laguna de Los Padres, Buenos Aires. XV Cong. Arg. de la Ciencia del Suelo: 61-62 .
- Soil Taxonomy. 1975. A basic system for making and interpreting soil survey. Handbook 436. W.D.C.: 754p.