



OBTENCIÓN DE CaCO_3 CON *BACILLUS SUBTILIS* PARA LA FABRICACIÓN DE CONCRETO AUTORREPARABLE

Juan Andrés Cuadros Portales¹, Gerardo de Jesús Sosa Santillán²,
Felipe Avalos Belmontes³, Elia Martha Múzquiz Ramos⁴

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Recibido: 14/06/2019 Aceptado: 23/09/2019 Publicado: 03/12/2019

Resumen.- El objetivo de ésta investigación es obtener CaCO_3 por biomineralización bacteriana para sellar grietas en concreto. Para esto se utilizaron endoesporas de *Bacillus subtilis*, y se inoculó en diferentes medios de cultivo, buscando la mejor relación de nutrientes precursores de minerales, así mismo se compararon diferentes medios de inmovilización tanto para nutrientes como endoesporas bacterianas para obtener un vehículo apto para las condiciones de producción y vida útil del concreto. Finalmente para comprobar la producción de CaCO_3 se analizaron los productos del metabolismo del *Bacillus subtilis*, por medio de FT-IR, DRX y MEB, observándose la producción de CaCO_3 en forma de calcita, vaterita y aragonita, encontrándose la primera en mayor porcentaje. La producción de estos minerales se presenta tanto en medios de cultivo acuosos como en medios de cultivo con endoesporas bacterianas y nutrientes inmovilizados, dentro de una matriz de alginato de sodio entrecruzado con CaO .

Palabras clave: CaCO_3 ; biomineralización; grieta; endoespora.

OBTAINING CaCO_3 WITH *BACILLUS SUBTILIS* FOR THE MANUFACTURE OF SELF-REPAIRING CONCRETE

Abstract.- The main of this work is to obtain CaCO_3 by bacterial biomineralization in order to seal cracks in concrete. For this, *Bacillus subtilis* endospores were used and inoculated in different culture media, looking for the best ratio of mineral precursor nutrients, likewise different means of immobilization for both nutrients and bacterial endospores were compared to obtain a vehicle suitable for the conditions of production and useful life of the concrete. Finally, to confirm the production of CaCO_3 , the metabolism products of *Bacillus subtilis* were analyzed by FT-IR, XRD and SEM, observing the production of CaCO_3 in the form of calcite, vaterite and aragonite, the first being in the highest percentage. Production of these minerals occurs both in aqueous culture media and in culture media with bacterial endospores and immobilized nutrients, within a matrix of sodium alginate crosslinked with CaO .

Keywords: Interdisciplinarity, Modular System, Object of Transformation, Collegiate Life

Introducción

El concreto es un material de construcción diseñado especialmente para resistir esfuerzos a la compresión, pero desafortunadamente su capacidad de resistir esfuerzos a la tensión solo representa el 10% de su resistencia, por lo que se le incorpora acero de refuerzo que satisfaga la necesidad de soportar esfuerzos a tensión. Aún así, una de las fallas más características del concreto son la aparición de grietas, estos agrietamientos han llegado a ser inevitables en las estructuras de concreto, ya que el concreto a pesar de que posee gran desempeño estructural, el método de su fabricación y colocado requiere de un estricto control de calidad, debido a que es un material en el que existe mucha interferencia del factor humano en el proceso de producción, desde el control de calidad en el banco de materiales pétreos, así como el control de calidad en la planta cementera, además del control de calidad en la planta concretera donde es mezclado, por lo tanto las variaciones de calidad son muchas ya que aunque existen normas y lineamientos establecidos para el aseguramiento de la calidad del concreto, muchas veces el criterio del personal operativo no es el correcto, lo que puede repercutir en fallas al final de su aplicación y vida útil. Existen diferentes factores que afectan al concreto ya instalado: una correcta labor de curado, una limpieza correcta del cimbrado, desastres naturales, así como su seguimiento de mezclado en obra y colocación, si cualquiera de estos factores denota un mal resultado, esto afectará a la matriz del concreto, primero en la formación de grietas, que además de la disminución de las propiedades de resistencia del concreto, causa desprendimientos y crea mayores puntos de ruptura. Por otra parte, también se verá

¹ Juan Andrés Cuadros Portales. Maestría en Ciencia y Tecnología de Materiales. Universidad Autónoma de Coahuila. j.cuadros@uadec.edu.mx (Autor correspondiente)

² Gerardo de Jesús Sosa Santillán. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila.

³ Felipe Avalos Belmontes. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila.

⁴ Elia Martha Múzquiz Ramos Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila.

afectado el acero de refuerzo embebido dentro del concreto ya que dichos agrietamientos permiten el paso a humedad y diversos agentes químicos que causan principalmente oxidación, lo que repercute en una serie de efectos secundarios, como lo son la corrosión del acero y adelgazamiento de su área de refuerzo para el concreto, por lo tanto el concreto pierde la resistencia a la tensión, llegando a representarse fallas mayores como, rupturas de elementos que componen la estructura de concreto y desprendimientos de fragmentos de la misma, lo que resulta en una constante degradación de la estructura. La suma de estos daños pueden causar desde pequeñas goteras hasta el colapso total de una estructura de concreto que puede poner en riesgo vidas humanas que la utilicen (Harmsen, 2005).

Es evidente que se debe erradicar la penetración de humedad para conservar en buenas condiciones una estructura de concreto el mayor tiempo posible, entonces para lograr esto se deben sellar los agrietamientos que el concreto llegue a presentar a lo largo de su vida útil. Actualmente se utilizan varios materiales para sellar dichos agrietamientos, los más usuales son: resinas epóxicas, silicones y morteros de concreto, pero estos métodos además de que representan un costo adicional de mantenimiento, no llegan a ser del todo eficaces en la mayoría de los casos debido a los movimientos de contracción y expansión que causan las inclemencias del tiempo tales como: altas temperaturas en temporadas de calor, congelamiento y deshielo en época de invierno. Esto causa que los materiales que se utilizaron para sellar los agrietamientos, se lleguen a desprender del concreto dejando libre el paso a humedad, la cual se trata de erradicar (Seifan, Khajeh, Berenjian, 2016).

Cuando se tiene que dar mantenimiento más frecuentemente a una estructura de concreto, es porque la composición del concreto ya sea solo o con la adición de acero de refuerzo, está comprometida y en algunos casos se tiene que demoler un inmueble por causa de deterioro o por antigüedad, entonces, un concreto libre de mantenimiento, significa que no tiene aparición de agrietamientos y está directamente relacionado con un mayor tiempo de vida útil, que además de que evita gastos adicionales a los de su construcción, también ayuda al medio ambiente y bienestar del planeta, principalmente a la atmosfera, ya que al tener mayor vida útil un inmueble, significa que no tiene que demolerse para construirse uno nuevo. De esta forma se disminuye el uso de cemento, el cual al producirse genera indirectamente CO₂, este gas es el principal causante del cambio climático ya que dentro de su función en la atmosfera el CO₂ absorbe y emite radiación impidiendo que la energía escape al espacio, causando el efecto invernadero que afecta a la distribución y abundancia de las especies marinas y terrestres llegando a causar la extinción de las mismas, por lo que el dióxido de carbono cumple una función primordial en el control climático del planeta (Badii, Guillen, Rodríguez, Lugo, Aguilar, Acuña, 2015).

El principio de autoreparación significa que si el concreto sufre algún agrietamiento, este debe tener la capacidad de sellarse de manera autónoma, es decir sin la intervención humana u otro agente externo a la misma matriz de concreto, por lo que para incorporar microorganismos dentro de la matriz del concreto se debe considerar que al momento de su fraguado el concreto poco a poco se convierte en una estructura como un solo elemento y los poros que se llegan a formar tienen un tamaño alrededor de 0.5 µm, mientras que los microorganismos, en este caso las bacterias, su tamaño puede ir desde 1 hasta 3 µm, por lo que si se agregan bacterias a la mezcla de concreto, este al ir completando su proceso de fraguado llegara aplastar las bacterias dentro de la mezcla, además de que el concreto es un material que alcanza un pH muy alcalino que puede llegar hasta 12, por lo que en el proceso de mezclado la mayoría de las bacterias no resistirán las condiciones extremas de alcalinidad y las bacterias residuales terminarán siendo apastadas debido a la cristalización del concreto (Wang, Mignon, Snoeck, Wiktor, Vlierghe, Boon, Belie, 2015). Así que para evitar esto se debe buscar un vehículo para encapsular las bacterias que aislé su contacto directo con el concreto y además no modifique las características fisiológicas del microorganismo. Una de las soluciones mayormente usada en investigaciones recientes, como vehículo y agente inmovilizador para las bacterias es el alginato de sodio, este polisacárido tiene una afinidad inerte con los microorganismos y también con nutrientes para las mismas bacterias, logrando conservarlas por periodos de tiempo muy largos.

Pero las bacterias no pueden ser inmovilizadas dentro del alginato de sodio en estado reproductivo o en vivo, ya que necesitan constantes nutrientes para seguir reproduciéndose o de lo contrario morirán. Afortunadamente las bacterias del género *Bacillus* llegan a formar endoesporas, estas endoesporas son un estado latente de la bacteria, que puede soportar el ambiente altamente alcalino que se forma al momento de la producción y fraguado del concreto, además en este estado, dependiendo de las condiciones ambientales, pueden llegar a sobrevivir de 50 hasta 200 años. Uno de los *Bacillus* más usados para aplicaciones en concreto en su forma de endoesporas es el *Bacillus sphaericus*, debido a que ha sido muy utilizado para producir CaCO₃ (Jonkers, Thijssen, Muyzer, Copuroglu, Schlangen, 2010). Pero en esta investigación se utilizarán endoesporas de *Bacillus subtilis*, ya que este microorganismo sobrevive en una gran variedad de ambientes, tanto acuáticos como terrestres o en la vegetación, además logra tomar muy fácilmente nutrientes

del ambiente para su reproducción, lo que lo hace más idóneo ya que el concreto es utilizado en todo el mundo y está expuesto a una amplia variedad de ambientes, con cambios de temperatura, humedad, oxígeno, etc.

Se ha demostrado que el *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de precipitar CaCO_3 por medio de biomineralización, si bien aún no se ha utilizado como propuesta para remediar agrietamientos en el concreto, si se ha utilizado como precursor de minerales de calcio, en aplicaciones como fertilizante para agricultura y como restaurador de monumentos históricos antiguos. Esto es gracias a la capacidad de precipitación de carbonatos mediante la formación de ácidos orgánicos, estos ácidos se forman con la interacción de las moléculas de agua al momento de entrar en contacto con la grieta y la urea como se presenta en la ecuación (1), donde las bacterias actúan como catalizadores de la urea, secretando los carbonatos necesarios para la precipitación de CaCO_3 , por lo tanto se debe tener una fuente de calcio dentro de los nutrientes necesarios para la formación de CaCO_3 , como se muestra en la ecuación (2). Por lo que se decidió usar nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y acetato de calcio ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Ca}$) como fuente de calcio ya que son fácilmente solubles en agua, y de esta forma asegurar y favorecer la precipitación de carbonato de calcio. Así que en esta investigación se utilizará como medio de producción de carbonato la hidrólisis ureasa ya que es fácilmente controlada, además que permite producir mayor cantidad de carbonatos en periodos de tiempo más cortos (Aguilera, Zapata, Morales, 2015).

Ureasa bacteriana



Por otro lado el alginato de sodio, aunque sirve como buen vehículo y agente inmovilizador tanto para las endoesporas bacterianas como para los nutrientes necesarios para la producción de CaCO_3 , debido a que su resistencia a la compresión es nula, ya que forma un gel porque el alginato se prepara con la adición de agua, es importante adicionar algún agente entrecruzante que le brinde mejorar su resistencia a la compresión, ya que es el principal tipo de esfuerzo al que está sometido el concreto. Dentro de las investigaciones realizadas se han utilizado diferentes variedades de polímeros para entrecruzar el alginato, sin embargo, estos no llegan a tener buena afinidad con el concreto debido a su propia naturaleza (Wang, Soens, Verstraete, Belie, 2014). En cambio un material cerámico tendría mejor cohesión con el concreto al momento de su fraguado, así como una adherencia permanente en el concreto, ya que sus coeficientes de expansión y contracción térmica son similares, por lo que los cambios de temperatura que son las mayores causas por las que se separan las cápsulas del concreto no tendrán un efecto significativo con un agente entrecruzante de naturaleza cerámica, por lo que en este caso tener un vehículo de alginato entrecruzado con un material cerámico será más viable.

Debido al proceso de biomineralización, mediante el cual se producirá el CaCO_3 , se puede decidir que agente entrecruzante elegir, para que proporcione mayor dureza al alginato y afinidad al concreto, y además ayude al proceso de biomineralización, por lo que se decidió usar CaO como agente entrecruzante para el alginato, debido a que el entrecruzamiento con calcio forma una estructura conocida como "caja de huevos", ya que el alginato está formado por dos monosacáridos, con un grupo ácido, el gulurónico y manurónico, en esta estructura, los iones de calcio se sitúan como puentes entre los grupos con carga negativa del ácido gulurónico, entonces la estructura que forman las cadenas de alginato con los iones calcio no es plana, sino que tiene forma helicoidal, con el calcio situado en el eje, así las cadenas de alginato pueden ligarse en forma múltiple, acorde a la cantidad de calcio presente este proporcionara mayor dureza al gel. A causa de que la viscosidad de las soluciones de alginato se eleva mucho a partir del 2%, ya que se encuentra casi en su punto de saturación de agua, se considera un 2% como buena concentración de alginato para tomarlo como contenido de punto base para adicionar CaO , de esta forma se puede obtener una red de entrecruzamiento alginato-calcio que brinde mayor protección a los nutrientes y endoesporas bacterianas.

Además, la adición de CaO al alginato podría ayudar indirectamente al proceso de biomineralización, como se puede apreciar en la ecuación (3), debido a que el alginato absorbe la mayoría de agua para formar el gel, al momento de incorporar el CaO para entrecruzar y encapsular endoesporas y nutrientes, se puede quedar atrapado CaO inerte, el cual al momento de agrietarse el concreto e ingresar la humedad, el CaO residual formará hidróxido de calcio que más el dióxido de carbono del medioambiente o producto de la actividad metabólica bacteriana llegará a formar CaCO_3 y H_2O residual (Mors, Jonkers, 2012).



Pero lo más importante es tomar en cuenta el aspecto económico, ya que según las investigaciones que actualmente se han desarrollado para obtener bioconcretos o concretos autorreparables, su precio de producción aumenta alrededor del 30% por m³, este aumento mayormente se atribuye a los compuestos que se utilizan como medio protector para la encapsulación de nutrientes y endoesporas, por lo que en este aspecto el entrecruzamiento de CaO con alginato resultaría ser un buen vehículo para incorporar endoesporas y nutrientes dentro del concreto, gracias a que su costo es significativamente más bajo. A comparación de los agentes de entrecruzamiento poliméricos utilizados en investigaciones anteriores, se podría reducir del 30% a un rango del 10% al 20% de costo adicional por m³, para lograr producir un concreto autorreparable que pueda competir con los concretos convencionales en el mercado actual.

Por lo tanto en esta investigación se evalúan diferentes medios de cultivo y encapsulación de nutrientes junto a endoesporas, buscando la mejor relación de nutrientes precursores de CaCO₃, como la mejor relación de alginato y agente entrecruzante para incorporar nutrientes y endoesporas dentro de la matriz de concreto, de esta manera se podrá observar y semi-cuantificar la producción de CaCO₃, por el análisis de muestras mediante FT-IR, DRX y MEB.

Metodología: materiales y métodos

Para determinar la viabilidad de los nutrientes antes de encapsularlos en el alginato, se realizaron medios de cultivo acuosos, y así poder constatar y semi-cuantificar la cantidad de CaCO₃ que se produce por medio de bimineralización. La composición de los medios de cultivo quedó establecida como se muestra en la Tabla 1, el proceso de incubación se realizó por 7 días a una temperatura constante de 38 °C, en una incubadora tipo shaker, con una velocidad de agitación de 100 rpm. Para realizar la germinación del medio se utilizaron endoesporas de *Bacillus subtilis* almacenadas en una solución salina estéril de cloruro de sodio al 0.85%, con una concentración de 1.63 X 10⁹±930 endoesporas/mL.

Tabla 1. Medios de cultivo acuosos para producir CaCO₃.

BioCa1	BioCa2	BioCa3
Agua destilada (100 mL)	Agua destilada 100 (mL)	Agua destilada (100 mL)
Urea (2 g)	Urea (2 g)	Urea (2 g)
Extracto de levadura (2 g)	Extracto de levadura (2 g)	Extracto de levadura (2 g)
Ca(NO ₃) ₂ (2 g)	C ₄ H ₆ O ₄ Ca (2 g)	Ca(NO ₃) ₂ (2 g)
Endoesporas (1 mL)	Endoesporas (1 ml)	C ₄ H ₆ O ₄ Ca (2 g)
		Endoesporas 1 mL

Al final del proceso de incubación, se separaron los residuos metabólicos precipitados por el *Bacillus subtilis*, por medio de centrifugación a una velocidad de 3,500 rpm durante 7 minutos para poder analizar la producción de CaCO₃, después de retirar el sobrenadante separado en la centrifugación y dejando secar durante 24 horas a una temperatura de 100±5°C, este proceso se realizó para poder analizar las muestras mediante espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier (FT-IR), difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de barrido (MEB).

Para lograr obtener una consistencia tipo polvo y, encapsular las endoesporas y los nutrientes antes de incorporarlos, se realizaron mezclas preliminares solamente con alginato entrecruzado con CaO, con ayuda de un agitador magnético con parrilla de calentamiento, a una velocidad de agitación constante de 500 rpm. Para esto se calentó el agua destilada a una temperatura de 50 °C, después se le incorporó el alginato dejándolo gelificar por 5 minutos, después se incorporó el CaO dejando mezclar durante otros 5 minutos. Los proporcionamientos utilizados en las diferentes mezclas de entrecruzamiento se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Mezclas de entrecruzamiento de alginato con CaO.

M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7
Agua destilada (100 mL)	Agua destilada (100 mL)	Agua destilada (100 mL)	Agua destilada (100 m)	Agua destilada (100 mL)	Agua destilada (100 mL)	Agua destilada (100 mL)
Alginato (2 g)	Alginato 2 (g)	Alginato (2 g)	Alginato (2 g)	Alginato (2 g)	Alginato (2 g)	Alginato (2 g)
CaO (10 g)	CaO 20 (g)	CaO (30 g)	CaO (40 g)	CaO (50 g)	CaO (60 g)	CaO (70 g)

Después de obtener los resultados de la mejor relación de nutrientes para producir CaCO_3 , así como el medio con la consistencia deseada para encapsular nutrientes y endoesporas, estos dos se inmovilizaron realizando mezclas con ayuda de un agitador magnético con parrilla de calentamiento, a una velocidad de agitación constante de 500 rpm. Para ésto se calentó el agua destilada a una temperatura de $50\text{ }^\circ\text{C}$, después se incorporaron las endoesporas con una relación de endoesporas-agua de 1:2, luego se le incorporó el alginato dejándolo gelificar por 5 minutos, seguido de los nutrientes dejando mezclar durante 3 minutos más y finalmente se incorporó el CaO , dejando mezclar durante otros 5 minutos. Los proporcionamientos de la encapsulación de nutrientes y endoesporas se muestran en la Tabla 3. En donde **E** indica solamente encapsulación de endoesporas; **N** indica solamente encapsulación de nutrientes; **EN**: indica encapsulación de nutrientes y endoesporas.

Tabla 3. Encapsulación de nutrientes y endoesporas.

E	N	EN
Agua destilada (10 mL)	Agua destilada (10 mL)	Agua destilada (100 mL)
Endoesporas (5 mL)	Alginato (0.2 g)	Endoesporas (5 mL)
Alginato (0.2 g)	CaO (4 g)	Alginato (0.2 g)
CaO (4 g)	Urea (0.3 g)	CaO (4 g)
	Extracto de levadura (0.3 g)	Urea (0.3 g)
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0.3 g)	Extracto de levadura (0.3 g)
		$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0.3 g)

En la Tabla 3, se puede observar encapsulamiento por separado de endoesporas y nutrientes en las muestras **E** y **N**, mientras que en la muestra **EN** se encapsularon juntas, por lo que se sometieron a proceso de incubación dentro de cajas Petri de dos maneras: la primer caja mezclando las muestras **E** y **N**, y en la segunda solamente la muestra **EN**, el proceso de incubación se realizó durante 7 días, a una temperatura de $35\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ incorporando 5 ml de agua destilada cada 48 horas, después de terminado el proceso de incubación debido a que las muestras estarán compuestas por polímeros de origen natural del alginato entrecruzado con CaO , estas no pueden ser analizadas mediante DRX, ya que se obtendrían resultados poco confiables, así que se tomara de apoyo el MEB para corroborar el crecimiento de cristales del carbonato de calcio, de esta manera se determinara cual es la mejor forma de incorporar los nutrientes y endoesporas a la matriz del concreto.

Resultados

En la Figura 1 se presentan los productos del metabolismo del microorganismo en los diferentes medios, después de retirar el sobrenadante separado en la centrifugación y dejando secar durante 24 horas a una temperatura de $100\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$, este proceso se realizó para poder analizar las muestras mediante FT-IR, DRX y MEB.

Primero se analizaron por medio de FT-IR las muestras secas resultantes de los medios acuosos: BioCa1, BioCa2 y BioCa3, pero además se analizaron por esta técnica espectroscópica los nutrientes utilizados: nitrato de calcio, urea, acetato de calcio y de carbonato de calcio para obtener un espectro infrarrojo de referencia y corroborar la producción de carbonato de calcio en las muestras recolectadas, así como determinar si hay nutrientes residuales que no hayan sido metabolizados por las bacterias. En la Figura 2 se presentan los espectros infrarrojos de las muestras analizadas utilizando un equipo PerkinElmer Frontier acoplado a un analizador de tipo ATR (reflectancia total atenuada), empleando un intervalo de análisis de 550 a 4000 cm^{-1} y 20 escaneos por análisis.

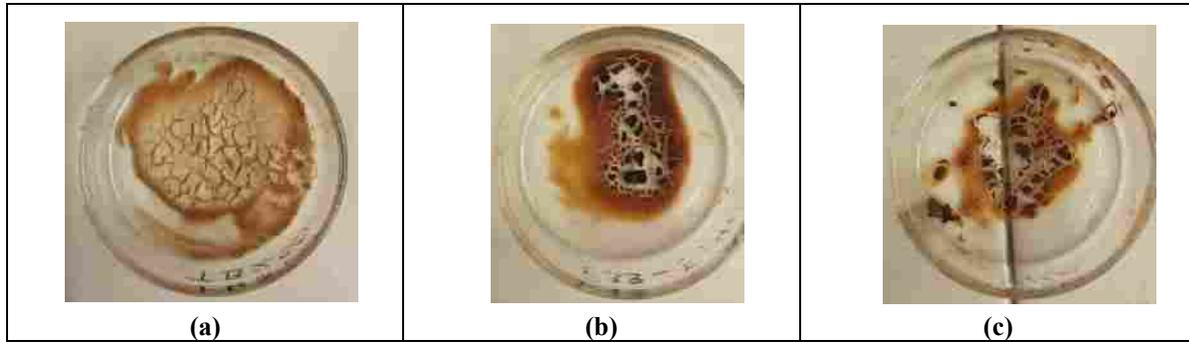


Figura 1. Residuo final recolectado de medios de cultivo acuosos para producir CaCO_3 : (a) BioCa1; (b) BioCa2; (c) BioCa3.

Como puede observarse en la Figura 2, todos los medios nutritivos muestran una banda a 1410 cm^{-1} característica del carbonato de calcio en sus formas de calcita, aragonita y vaterita, además de una señal intensa entre 1010 y 1015 cm^{-1} que corresponde solamente a la aragonita y la vaterita (Vazquez-Moreno, Blanco-Varela, 1981). También puede observarse que en ningún medio nutritivo hay coincidencia de bandas con las características de los nutrientes, por lo cual se puede determinar que el medio BioCa1 compuesto por: urea, extracto de levadura y nitrato de calcio es el mejor prospecto para producir carbonato de calcio, ya que coincide con otra banda característica del carbonato de calcio a 870 cm^{-1} , además que se muestra un espectro infrarrojo más limpio, y con menos variaciones de bandas, así como menor contenido de humedad que puede estar asociado a un carbonato de calcio con una estructura inestable o con un compuesto diferente al deseado, esta presencia de humedad figura en las muestras BioCa2 y BioCa3 entre los 3500 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} .

Para poder cerciorarse de que medio nutritivo produce CaCO_3 , se analizaron las mismas muestras BioCa1, BioCa2 y BioCa3 mediante DRX, para seguir con el procedimiento de encapsulación en alginato entrecruzado con CaO . En la Figura 3 se muestran los difractogramas obtenidos de las muestras, además de las cartas patrón de las estructuras de CaCO_3 características. Se utilizó en esta determinación un Equipo de Difracción de Rayos-X Marca PANalytical Modelo Empyrean con Voltaje: 40 kV y Corriente: 30 mA .

Analizando los difractogramas de rayos X, para la identificación de fases cristalinas presentes de los medios BioCa1, BioCa2 y BioCa3, se encontró que en el medio BioCa1 existen reflexiones características de las tres estructuras del carbonato de calcio a 25° , 26° , 28° , 29° , 33° , 45° y 49° a una escala de 2θ , según las cartas patrón: PDF 01-072-4582 (calcita), PDF 98-016-9896 (aragonita) y PDF 01-072-0506 (vaterita).

En los medios BioCa2 y BioCa3 solo se pueden observar reflexiones a 28° y 33° a una escala de 2θ , según la carta patrón PDF 01-072-0506, esta estructura es perteneciente a la Vaterita, pero esta formación de carbonato de calcio llega a ser soluble en agua, por lo que se decidió usar los nutrientes del medio BioCa1 para encapsularlos.

Para determinar que proporcionamiento de CaO se utilizaría para realizar el encapsulamiento de nutrientes y endoesporas, se probaron las muestras secas resultantes de la Tabla 2 utilizando como referencia la escala de Mohs. Se obtuvo como resultado una buena consistencia tipo polvo con una dureza de 2 en la escala de Mohs, en la M4 con una concentración de 20 g/L de alginato y 400 g/L de CaO .

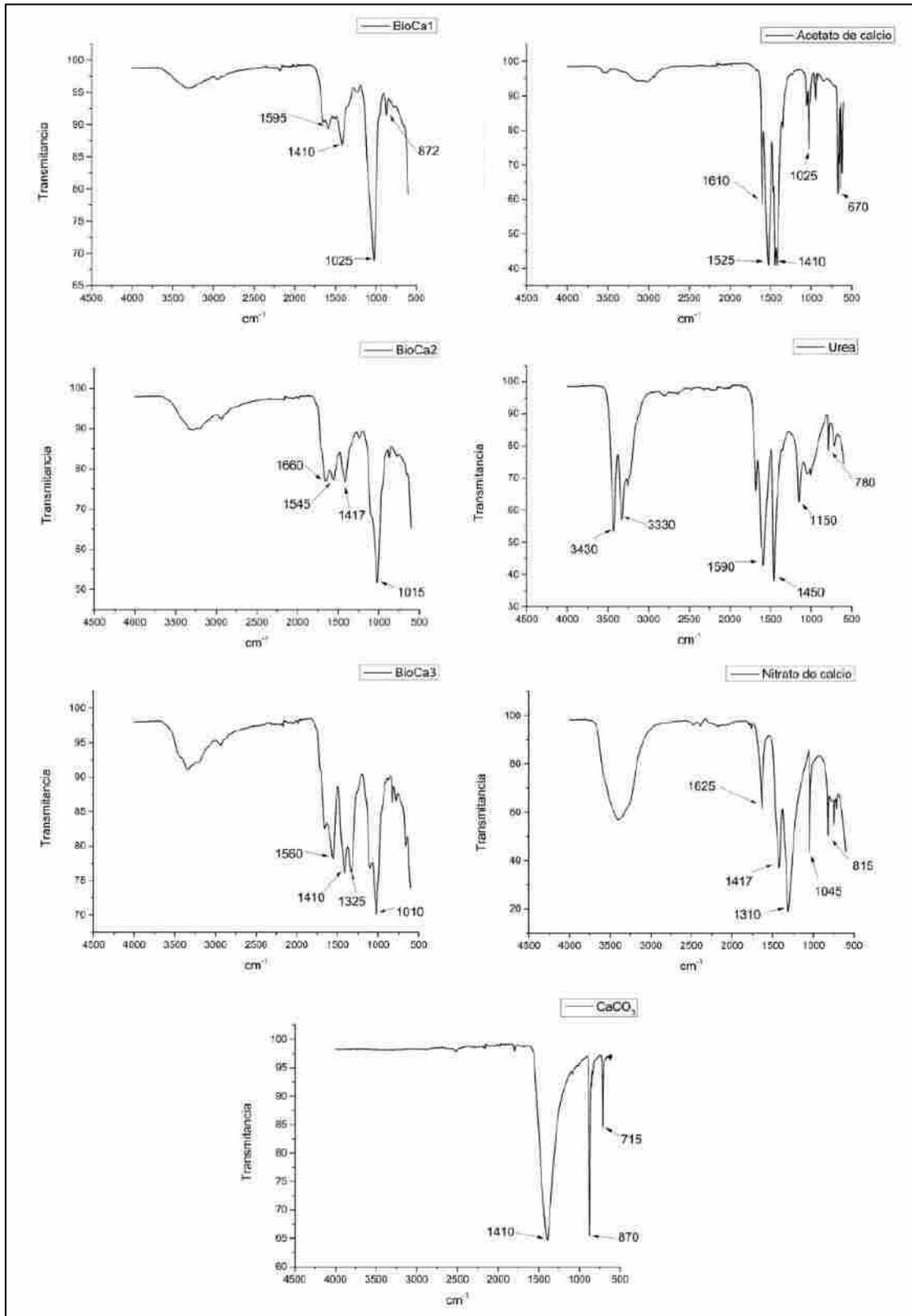


Figura 2. Espectros infrarrojos de muestras resultantes de medios acuosos así como de nutrientes utilizados para los mismos.

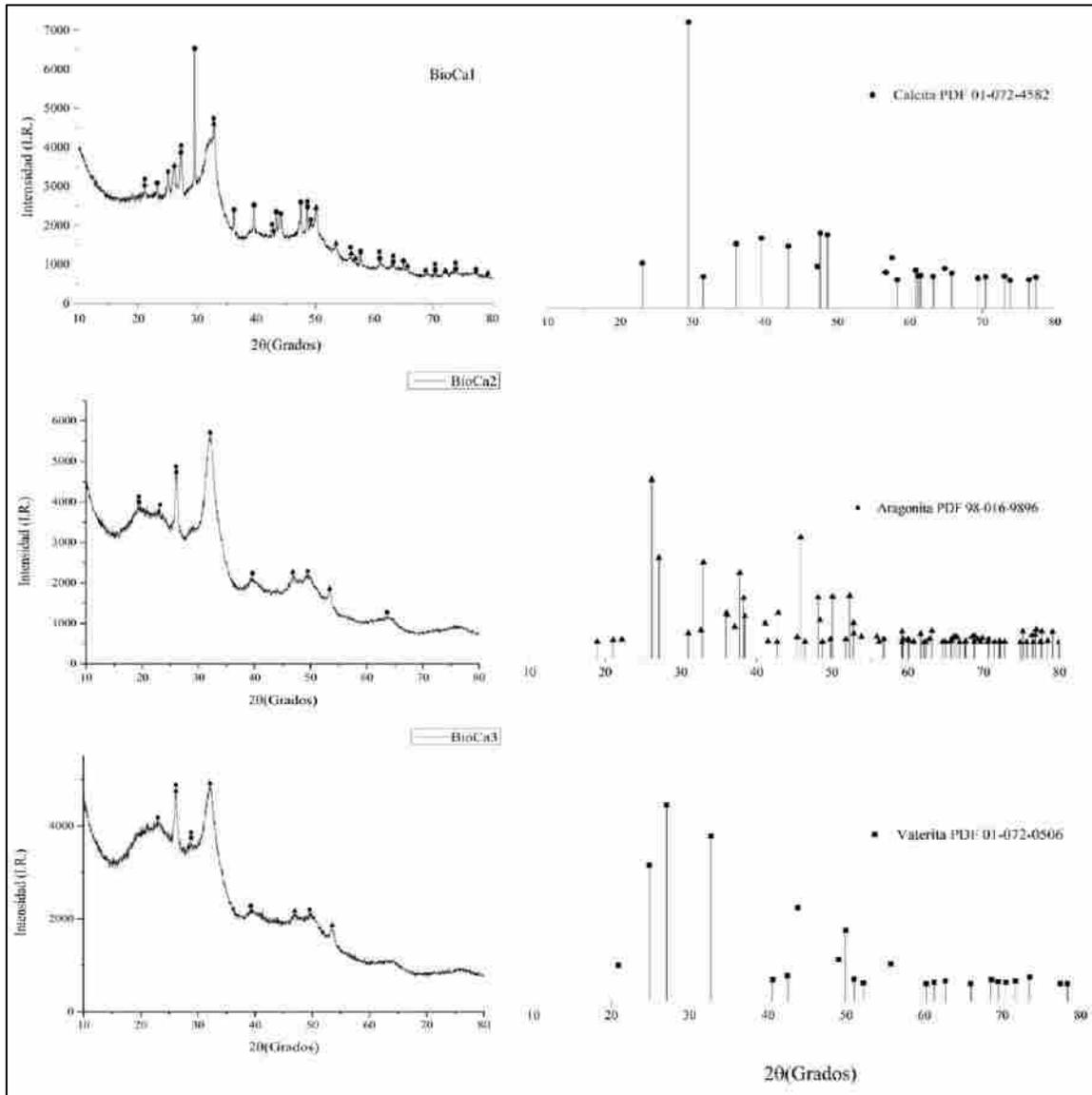


Figura 3. DRX de los medios BioCa1, BioCa2 y BioCa3, y cartas patrón de calcita, aragonita y vaterita.

En la Figura 4 se presentan las imágenes de los cultivos de las endosporas y los nutrientes antes de incubar, y en las Figura 4b y Figura 4d una vez pasado el tiempo de incubación. Cabe recordar que en la primer caja Petri se mezclaron las muestras **E** y **N** (a), y en la segunda solamente la muestra **EN** (c) de acuerdo a la Tabla 3.

En la Figura 4, se puede observar una clara saturación de color blanco en las cajas Petri una vez pasado el tiempo de incubación, lo que se atribuye a que existe producción de carbonato de calcio lo cual será confirmado el equipo de microscopía electrónica de barrido (MEB) Hitachi SU 8010.

En la Figura 5 se presentan las microfotografías de las muestras después de incubar. En la Figura 5a, que corresponde a las muestras **E** y **N** se observa la formación de cristales cúbicos, siendo una clara estructura de CaCO_3 en forma de calcita, además de que se observa la presencia de sitios de nucleación y el desarrollo de cristales de CaCO_3 en forma de aragonita en la Figura 5b. Aunque en las Figuras 5c y 5d se puede observar la formación de CaCO_3 , en forma de vaterita y aragonita, la estructura en forma de calcita que se observa en la Figura 5a es la forma más estable del CaCO_3 , por lo que es más conveniente incorporar en igual cantidad nutrientes y endoesporas encapsuladas por separado, a la matriz de concreto.

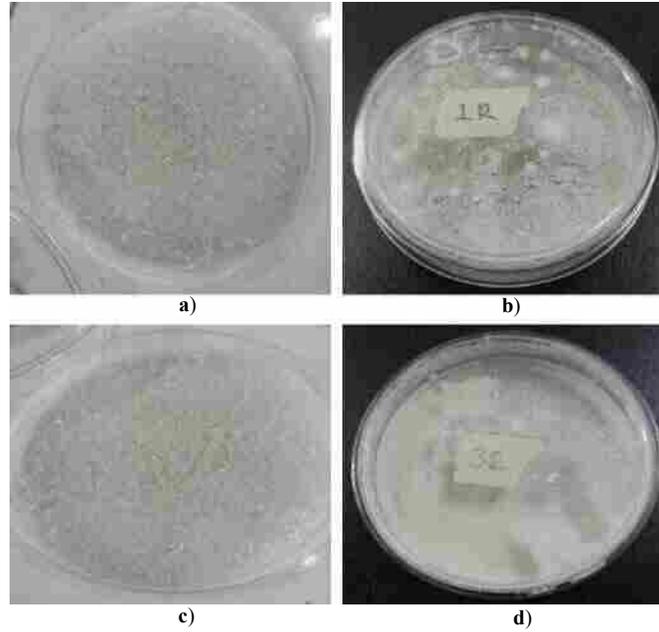


Figura 4. Encapsulación de nutrientes y endosporas descritos en la Tabla 3: (a) Muestra E y N antes de incubar; (b) Muestra E y N después de incubación; (c) Muestra EN antes de incubar; (d) Muestra EN después de incubación.

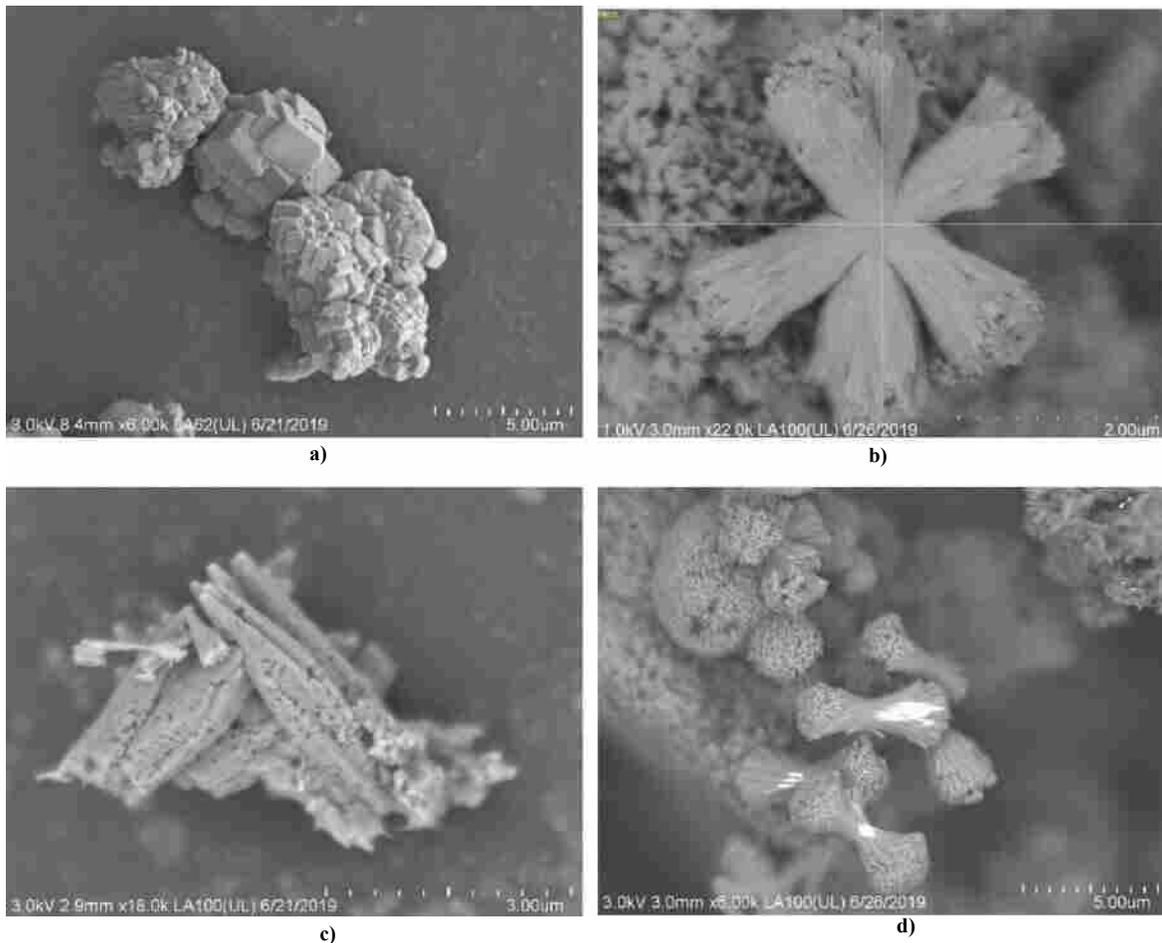


Figura 5. Microfotografías de las muestras después de incubación: (a) y (b) Muestra E y N; (c) y (d) Muestra EN.

Discusión

En suma, de los resultados obtenidos en esta investigación se puede deducir que la formación variada de diversas estructuras de CaCO_3 , como calcita, vaterita y aragonita, está directamente relacionada con un ciclo continuo de formación de carbonato de calcio de diversas formas, primeramente se espera la producción de CaCO_3 , con la operación de las ecuaciones (1) y (2), pero el amonio residual de la ecuación (1), al estar dentro del mismo ambiente donde se forma CO_3^{2-} proveniente de la alimentación de extracto de levadura por parte del microorganismo, se llega a formar más urea que interacciona de nuevo como en la ecuación (1), pero además el mismo CO_3^{2-} más el CaO residual dentro del encapsulamiento, al incorporársele agua forma $\text{Ca}(\text{OH})_2$, que da pie a la formación indirecta de CaCO_3 como se muestra en la ecuación (3), ya que estas reacciones son indirectas al proceso de biomineralización original de ureólisis, para producir carbonato de calcio, gracias a este ciclo continuo de formación de CaCO_3 , se puede obtener un menor tiempo de regeneración de los agrietamientos en el concreto ya que existe una catálisis más rápida y con menos desperdicio de los nutrientes precursores del CaCO_3 .

Conclusiones

Finalmente se determinó que los mejores nutrientes para producir CaCO_3 son: urea 20 g/L, extracto de levadura 20 g/L y nitrato de calcio 20 g/L. También se comprobó que el mejor medio para encapsulación que permite la germinación de endoesporas bacterianas y facilita la producción de CaCO_3 está compuesto de alginato 20 g/L entrecruzado con CaO 400 g/L, con estos factores como nutrientes precursores de minerales y vehículo para encapsular nutrientes y endoesporas, se logró semi-cuantificar por el método de Rietveld y con ayuda del equipo de DRX, una producción de CaCO_3 de: calcita 79.9%, aragonita 13.5% y vaterita 6.6%, esto a una relación de 100% equivalente a 100 g.

Bibliografía

- Belie, N. De. (2015). Application of modified-alginate encapsulated carbonate producing bacteria in concrete : a promising strategy for crack self-healing, 6(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01088>
- Guillen, A., Rodríguez, C. E., Lugo, O., Aguilar, J., & Acuña, M. (2015). Pérdida de Biodiversidad : Causas y Efectos Biodiversity Loss : Causes and Factors, 10(2), 156–174.
- Teodoro E. Harmsen. (2005). (Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú), Diseño de estructuras de concreto armado, Lima Perú.
- Jonkers, H. M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., & Schlangen, E. (2010). Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete, 36, 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.036>
- Paramo, L., & Morales, O. O. (2015). BIOTA NATIVA COMO UN MÉTODO DE RESTAURACIÓN . THE BIOPRECIPITATION OF CALCIUM CARBONATE BY NATIVE MICROBIAL POPULATION AS A RESTORATION METHOD ., (January 2016). <https://doi.org/10.5377/nexo.v28i01.1779>
- Seifan, M., Samani, A. K., & Berenjian, A. (2016). Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(6), 2591–2602. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7316-z>.
- Vazquez-Moreno, T., & Blanco.Varela M.T. (1981). Tabla de frecuencias y espectros de absorción infrarroja de compuestos relacionados con la química del cemento, Materiales de Construcción, 182, 611. <http://materconstrucc.revistas.csic.es/index.php/materconstrucc/article/viewFile/1007/1180>
- Wang, J. Y., Soens, H., Verstraete, W., & Belie, N. De. (2014). Cement and Concrete Research Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. Cement and Concrete Research, 56, 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2013.11.009>