

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Optimización de la producción de carbonato de calcio por tres cepas del género *Lysinibacillus*, aisladas del suelo de una cantera, para la formación de bioconcreto.

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Ana Marcela Morales Valenzuela
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala,
2021

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

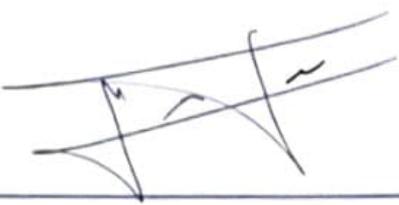


Optimización de la producción de carbonato de calcio por tres cepas del género *Lysinibacillus*, aisladas del suelo de una cantera, para la formación de bioconcreto.

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Ana Marcela Morales Valenzuela
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y
Microbiología

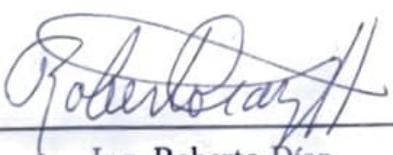
Guatemala,
2021

Vo.Bo.:

(f) 
MSc. Julio Roberto Matute

Tribunal Examinador:

(f) 
MSc. Julio Roberto Matute

(f) 
Ing. Roberto Díaz

(f) 
Dra. Pamela Marie Pennington

Fecha de aprobación: Guatemala, 6 de diciembre de 2021.

El presente trabajo de graduación es parte de un proyecto en conjunto del Centro de Estudios en Biotecnología CEB de la Universidad del Valle de Guatemala con Cementos Progreso. Esta tesis es la continuación de un proyecto que combina la investigación académica con la iniciativa en la industria privada, para el desarrollo de bioconcreto en Guatemala. Esta tesis me permitió combinar trabajo en laboratorio con su aplicación industrial, y observar cómo esta transferencia de tecnología y colaboración de distintas áreas de las ciencias pueden resultar en un proyecto exitoso.

Me gustaría dar las gracias a mi asesor, Julio Matute por su excelente orientación y soporte durante todo el proceso de realización de mi trabajo. También me gustaría agradecer a la Doctora Pamela Pennington por su apoyo y orientación durante la realización de este trabajo. Me gustaría agradecer a mis abuelos, quienes apoyaron tanto emocionalmente como financieramente este año de estudio en Bioquímica y Microbiología, lo que me permitió llevar a finalización esta tesis y este proyecto personal llamado doble titulación. Me permito dar un agradecimiento especial a mi familia, en especial a mis padres, por su acompañamiento en la realización de este trabajo, por acompañarme y motivarme durante el tiempo que dediqué a realizarlo y por su confianza en esta tesis y en mí.

Prefacio	III
Lista de figuras	XII
Lista de cuadros	XIV
Resumen	XV
Abstract	XVI
1. Introducción	1
2. Objetivos	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. Justificación	3
4. Marco teórico	4
4.1. Biomineralización	4
4.1.1. Mecanismos de biomineralización	4
4.2. Precipitación de calcita	5
4.3. Bioconcreto	6
4.4. Producción de calcita mediante hidrólisis de urea	6
4.5. Género <i>Lysinibacillus</i>	7
4.6. Crecimiento bacteriano	8
4.6.1. Curva de crecimiento bacteriano	8
4.6.2. Esporulación	9
4.6.3. Medio de cultivo	10
4.7. Microestructura de bioconcreto	11
4.7.1. Microscopía electrónica de barrido	11
4.7.2. Cristalografía de rayos X	11
5. Metodología	13
5.1. Sitio de estudio	14
5.2. Sujetos de estudio	14
5.3. Enfoque, diseño y tipo de investigación	14
5.4. Tipo y tamaño de muestra	14

5.5. Estudios previos	14
5.6. Criterios de inclusión y exclusión	14
5.7. Variables	15
5.8. Hipótesis	15
5.9. Viabilidad	16
5.10. Materiales y métodos	17
6. Resultados	22
6.1. Identificación de la cepa bacteriana con mayor producción de carbonato de calcio . .	22
6.2. Producción y recuperación de esporas de las cepas bacterianas que se aislaron del suelo de la planta cementera de Sanarate, El Progreso	23
6.3. Optimización de la producción de carbonato de calcio de las cepas bacterianas que se aislaron del suelo de la planta cementera de Sanarate, El Progreso	25
6.3.1. Ensayo de reparación de grietas en cubos de concreto	26
6.3.2. Ensayo de resistencia a compresión de los cubos de concreto	28
6.3.3. Ensayo de porcentaje de carbonato de calcio calculado a partir de difracción de rayos X	32
6.3.4. Ensayo de microscopía electrónica de barrido de las grietas en cubos de concreto	36
6.3.5. Ensayo en laboratorio de titulación para suplementación de medios de precipitación	37
6.3.6. Índice para optimización de la producción de calcita	42
7. Análisis de resultados	44
8. Conclusiones	48
9. Recomendaciones	49
10. Bibliografía	50
Referencias	50
11. Anexos	53

Lista de figuras

1.	Tipos de polimorfismos de carbonato de calcio.	5
2.	Hidrólisis de urea para producción de carbonato de calcio.	7
3.	Esquema de curva de crecimiento bacteriano.	9
4.	Calcita en microscopio electrónico de barrido	12
5.	Espectrograma de calcita con cristalografía de rayos X	12
6.	Metodología a llevar a cabo este estudio	13
7.	Gel de electroforesis para perfil plasmídico de las cepas del estudio.	23
8.	Comparación de curvas de crecimiento bacteriano de las cepas en el estudio	24
9.	Porcentaje de reparación de grietas de cubos de concreto con distintos tratamientos.	27
10.	Resistencia a compresión de cubos de concreto al día 28	29
11.	Porcentajes de carbonato de calcio obtenidos mediante difracción de rayos X.	33
12.	Concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con la cepa P.4.1.A	39
13.	Concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con la cepa P.5.2.A	39
14.	Concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con la cepa P. 5.3.A	40
15.	Concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con el medio de precipitación LUC	41
16.	Concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con el medio de precipitación TSUC	42
17.	Grieta A del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC	63
18.	Grieta A del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18	63
19.	Grieta A del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30	63
20.	Grieta B del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC	63
21.	Grieta B del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18	63
22.	Grieta B del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30	63
23.	Grieta C del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC	63
24.	Grieta C del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18	63
25.	Grieta C del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30	63
26.	Grieta A del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC	63
27.	Grieta A del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18	64
28.	Grieta A del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30	64
29.	Grieta B del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC	64
30.	Grieta B del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18	64
31.	Grieta B del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30	64
32.	Grieta C del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC	64
33.	Grieta C del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18	64
34.	Grieta C del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30	64
35.	Grieta A del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC	64

306. Grieta A del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación el día 30	91
307. Grieta B del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación	92
308. Grieta B del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación el día 18	92
309. Grieta B del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación el día 30	92
310. Grieta C del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación	92
311. Grieta C del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación el día 18	92
312. Grieta C del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación el día 30	92
313. Grieta A del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación	92
314. Grieta A del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18	92
315. Grieta A del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30	92
316. Grieta B del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación	92
317. Grieta B del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18	93
318. Grieta B del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30	93
319. Grieta C del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación	93
320. Grieta C del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18	93
321. Grieta A del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación	93
322. Grieta A del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18	93
323. Grieta A del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30	93
324. Grieta B del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación	93
325. Grieta B del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18	93
326. Grieta B del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30	93
327. Grieta C del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación	94
328. Grieta C del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18	94
329. Grieta C del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30	94
330. Grieta A del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación	94
331. Grieta A del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18	94
332. Grieta A del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30	94
333. Grieta B del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación	94
334. Grieta B del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18	94
335. Grieta B del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30	94
336. Grieta B del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación	94
337. Grieta B del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18	95
338. Grieta B del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30	95
339. Grieta C del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación	95
340. Grieta C del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18	95
341. Grieta C del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30	95
342. Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio TSUC cepa P.4.1.A y espectros de fluorescencia representativos	96
343. Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio TSUC cepa P.5.2.A y espectros de fluorescencia representativos	96
344. Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio TSUC cepa P.5.3.A y espectros de fluorescencia representativos	97
345. Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio LUC cepa P.4.1.A y espectros de fluorescencia representativos	97
346. Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio LUC cepa P.5.2.A y espectros de fluorescencia representativos	98
347. Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio LUC cepa P.5.3.A y espectros de fluorescencia representativos	98

Lista de cuadros

1.	Variables para la producción y recuperación de esporas de las cepas bacterianas que se aislaron del suelo de la planta cementera de Sanarate, El Progreso.	15
2.	Variables para la optimización de la producción de carbonato de calcio de las cepas bacterianas que se aislaron del suelo de la planta cementera de Sanarate, El Progreso	15
3.	Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas del estudio para su identificación.	22
4.	Cinética del crecimiento bacteriano de las cepas en el estudio	24
5.	Recuperación de esporas bacterianas	25
6.	Medias de porcentajes de reparación de grietas de las cepas bacterianas.	26
7.	Comparación estadística de reparación de grietas de cada cepa según cada medio de precipitación.	27
8.	Comparación estadística de reparación de grietas de cada medio de precipitación según cada cepa.	28
9.	Comparación estadística de reparación de grietas de cada medio de precipitación con cada cepa en pares.	28
10.	Medias de resistencia a compresión de cubos de concreto bajo distintos tratamientos	29
11.	Comparación estadística de resistencia a compresión de cada cepa según cada medio de precipitación.	30
12.	Comparación estadística de resistencia a compresión de cada medio de precipitación según cada distinta cepa.	31
13.	Medias de porcentajes de carbonato de calcio obtenidos por difracción de rayos X	32
14.	Comparación estadística de porcentaje de carbonato de calcio de cada cepa según cada medio de precipitación.	34
15.	Comparación estadística de porcentaje de carbonato de calcio de cada medio de precipitación según cada distinta cepa.	35
16.	Cantidad de cristales de calcita localizados en SEM bajo distintos tratamientos.	36
17.	Medias de controles en ensayo de titulación para concentración de carbonato de calcio en medios de precipitación con suplementación	37
18.	Medias de tratamientos en ensayo de titulación para concentración de carbonato de calcio en medios de precipitación con suplementación	38
19.	Comparación estadística de porcentaje de carbonato de calcio de cada cepa según cada medio de precipitación.	38
20.	Comparación estadística de porcentaje de carbonato de calcio de cada medio de precipitación según cada distinta cepa.	40
21.	Índice para optimización de producción de calcita	42
22.	Resultados prueba de concepto en cubos de concreto en seco.	43
23.	Lecturas de densidad óptica para las curvas de crecimiento para la cepa P.4.1.A	53

24.	Lecturas de densidad óptica para las curvas de crecimiento para la cepa P.5.2.A . . .	53
25.	Lecturas de densidad óptica para las curvas de crecimiento para la cepa P.5.3.A . . .	54
26.	Conteos de las curvas de crecimiento para la cepa P.4.1.A	55
27.	Conteos de las curvas de crecimiento para la cepa P.5.2.A	56
28.	Conteos de las curvas de crecimiento para la cepa P.5.3.A	57
29.	Datos originales para recuperación de biomasa con el método propuesto	57
30.	Monitoreo de reparación de grietas para todas las cepas con medio TSUC	58
31.	Monitoreo de reparación de grietas para todas las cepas con medio LUC	59
32.	Monitoreo de reparación de grietas para todas las cepas sin medio	60
33.	Datos originales de resistencia a compresión para medios TSUC, LUC y control a diferentes edades de curado.	61
34.	Datos originales de cristalografía de rayos x para cuantificar calcita en las muestras de biocemento con medios TSUC, LUC y controles	62

El concreto es un material esencial en la construcción, pero con el paso del tiempo sufre de fracturas que comprometen su resistencia y durabilidad. Para la reparación de las grietas es posible utilizar microorganismos biomineralizadores del género *Lysinibacillus*, aislados del suelo de una planta de producción de cemento en un estudio previo. El presente estudio utilizó pruebas de microbiología como batería bioquímica y perfil plasmídico para la caracterización de tres cepas de *Lysinibacillus*. Además se estudió el crecimiento y esporulación de las tres cepas mediante una curva de crecimiento, choque térmico y floculación. Finalmente se analizó cómo las esporas de estas cepas mejoran la resistencia y permiten el sellado de grietas, en cubos de concreto utilizando dos distintos medios de precipitación (LUC y TSUC). Se realizaron pruebas de estereoscopia para llenado de grietas, resistencia a compresión, cristalografía de rayos X, microscopía electrónica de barrido y titulación de carbonato de calcio. Se observa que la combinación de la cepa P.4.1.A con el medio de precipitación LUC tiene la mayor cantidad de carbonato de calcio por cubo de concreto. La cepa P.5.3.A con el medio de precipitación LUC tiene el mayor porcentaje de rellenado de grietas y mayor resistencia a compresión. Se concluye que la combinación recomendada para aplicación industrial es la cepa P.5.3.A con el medio de precipitación LUC.

Concrete is an essential material in construction, but over time it suffers from fractures that compromise its strength and durability. For the repair of cracks, it is possible to use biomineralizing microorganisms of the genus *Lysinibacillus*, isolated from the soil of a cement production plant in a previous study. The present study used microbiology tests such as biochemical battery and plasmid profile for the characterization of three strains of textit *Lysinibacillus*. In addition, the growth and sporulation of the three strains were studied by means of a growth curve, heat shock and flocculation. Finally, it was analyzed how the spores of these strains improve resistance and allow the sealing of cracks, in concrete cubes using two different means of precipitation (LUC and TSUC). Stereoscopic tests were performed for crack filling, compressive strength, X-ray crystallography, scanning electron microscopy, and calcium carbonate titration. It is observed that the combination of the P.4.1.A strain with the LUC precipitation medium has the highest amount of calcium carbonate per concrete cube. The P.5.3.A strain with the LUC precipitation medium has the highest percentage of crack filling and the highest resistance to compression. It is concluded that the recommended combination for industrial application is the P.5.3.A strain with the LUC precipitation medium.

CAPÍTULO 1

Introducción

Existen dos materiales esenciales para la industria de construcción debido a su amplio uso: el concreto y el acero. El concreto es una mezcla de cemento, agua y diversos minerales. El cemento se compone de calcita (en forma de piedra caliza) y arcillas calcinadas (Neville y Brooks, 1987). Debido al desgaste con el tiempo; contacto con sustancias corrosivas; y debido a movimientos telúricos, el concreto llega a sufrir fracturas. Estas grietas comprometen la dureza y resistencia de la estructura de concreto y permiten el paso del agua, la cual corroe la estructura de acero que da soporte al concreto. La reparación y restauración del concreto conlleva una serie de gastos, usuales en la industria, y el uso de lechada química. La lechada química incluye silicato de sodio, hidróxido de calcio, acrilatos y acrilamidas, que son compuestos tóxicos y dañinos para el ambiente (Seifan, Samani, y Berenjjan, 2016).

La biomineralización representa una alternativa biotecnológica para la reparación de las grietas en concreto. Los microorganismos biomineralizadores, como los del género *Lysinibacillus*, son capaces de producir carbonato de calcio en forma de calcita. La acumulación de este mineral, al entrar en contacto con el agua que penetra por las grietas, permite sellar estas fisuras, alargando la vida útil de la estructura y restableciendo la dureza y resistencia del material (Stabnikov, Jian, Ivanov, y Li, 2013; Anbu, Kang, Shin, y So, 2016).

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue evaluar la optimización de producción de carbonato de calcio en tres cepas del género *Lysinibacillus* para facilitar su aplicación a nivel industrial en la producción de bioconcreto. Esta optimización permitió establecer un precedente para futuras investigaciones cuyo objetivo sea la aplicación del proceso de curación del concreto utilizando bacterias biomineralizadoras.

2.1. Objetivo general

Optimizar la producción de carbonato de calcio en cubos de concreto por tres cepas del género *Lysinibacillus*, aisladas de una cantera cementera, para facilitar su aplicación a nivel industrial en la formación de bioconcreto.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar las cepas bacterianas, mediante batería bioquímica, para poder depositarlas en un repositorio.
- Optimizar la producción y recuperación de esporas bacterianas de cada cepa según sus curvas de crecimiento en tripticasa soya, en escala menor a un litro.
- Comparar, por medio de titulación y análisis de imagen estereoscópica la cantidad y tasa de cristalización del carbonato de calcio producido por las cepas bacterianas, en medio Tripticasa soya con urea y cloruro de calcio (TSUC) y sustrato con urea y cloruro de calcio (LUC), con distintos cofactores (Hidróxido de bario, citrato de calcio y sulfato de níquel).
- Comparar por difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido, la identidad y calidad de los cristales de carbonato de calcio producidos en cubos de concreto por las cepas bacterianas en TSUC y LUC.

La biotecnología es definida por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) como: “La aplicación de la ciencia y la tecnología a los organismos vivos... , con el fin de producir conocimientos, bienes o servicios” (OECD, 2005). La biomineralización es una alternativa biotecnológica para la industria de construcción al utilizar el metabolismo de microorganismos para la producción de calcita. Las grietas que se forman en el concreto con el paso del tiempo conllevan un alto costo de reparación, implican lechada química, con compuestos altamente tóxicos. La producción de calcita por microorganismos biomineralizadores, permite sellar estas grietas de una forma sostenible y económicamente rentable.

Para llevar la biomineralización del laboratorio a la industria, es necesario optimizar el proceso metabólico de producción de calcita. Para ello se puede realizar modificaciones genéticas sobre el microorganismo de interés o bien, modificar el ambiente del microorganismo. El adaptar el medio de cultivo para las necesidades especiales del microorganismo para la producción de calcita lleva a un aumento de la cantidad de carbonato de calcio como una alternativa a la modificación genética del mismo. También es necesario realizar pruebas piloto a escala laboratorio en cubos de concreto, para optimizar los procesos para la aplicación industrial de los microorganismos.

4.1. Biomineralización

La biomineralización es un proceso metabólico que lleva a la precipitación de minerales al combinar materia orgánica e inorgánica. Los microorganismos realizan este proceso para formar tejidos resistentes para su protección y soporte. El término biomineralización se vio por primera vez en 1924, en el libro publicado por W. J. Schmidt sobre el tema. Actualmente, se conocen 62 minerales diferentes, de distintos cationes, que pueden ser producidos (Evans, 2019; Weiner y Dove, 2003). La biomineralización se lleva a cabo en cinco fases: empezando con la delimitación del espacio celular para poder llevar a cabo el procedimiento de nucleación, seguido de la formación de la matriz, la supersaturación de iones, el control de la nucleación y termina con la detención del proceso. La detención del proceso de biomineralización ocurre cuando se alcanza el límite del espacio delimitado (Y. Chen y cols., 2019; Weiner y Dove, 2003; Achal, Mukherjee, Kumari, y Zhang, 2015).

4.1.1. Mecanismos de biomineralización

La biomineralización puede llevarse a cabo en tres mecanismos: mineralización controlada biológicamente (BCM por sus siglas en inglés); mineralización inducida biológicamente (BIM); y mineralización mediada biológicamente (BMM) (Castro-Alonso y cols., 2019).

El mecanismo de la BCM puede ser intracelular, extracelular o intercelular. Este proceso se logra con la comunicación intercelular utilizando macromoléculas de exopolisacáridos. En este mecanismo, el organismo controla la nucleación, la composición, la localización y la morfología de los cristales producidos con su actividad metabólica. Un ejemplo es la formación de huesos en mamíferos (Castro-Alonso y cols., 2019).

En la BMM, no se utiliza actividad biológica intracelular o extracelular. La formación de minerales se da gracias a la interacción de matrices orgánicas con compuestos orgánicos e inorgánicos. Un ejemplo de BMM es la formación de cristales en la matriz extracelular sin necesidad de actividad biológica directa, pero la cristalización ocurre gracias a la presencia de materia orgánica en la superficie celular. En la BIM, la actividad celular es limitada en la nucleación o localización y el microorganismo controla la formación del mineral a partir de vesículas o matrices orgánicas. Los cristales BIM se generalizan por una baja cristalinidad y un amplio rango de tamaños y morfologías.

En este mecanismo la precipitación es indirecta y ocurre por la interacción de iones en el medio ambiente con subproductos del metabolismo del microorganismo (Castro-Alonso y cols., 2019).

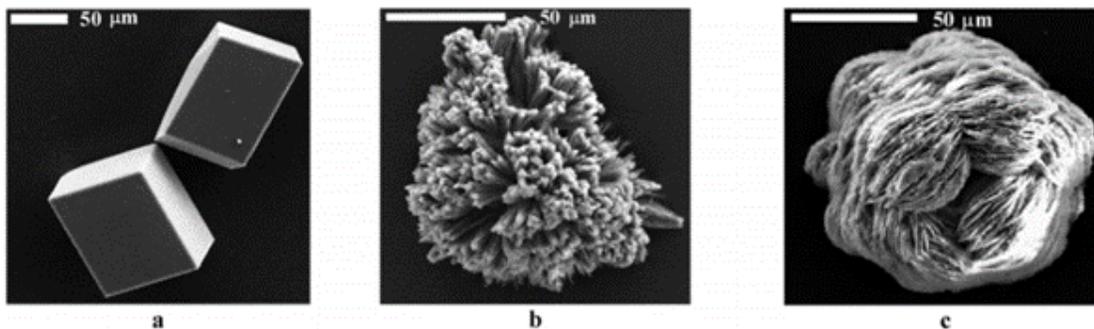
Algunos ejemplos de biomineralización es la formación de huesos en mamíferos, que ocurre mediante BCM, la formación de estromatolitos calcáreos y esteras microbianas que ocurre a través de BIM y la a formación de cristales en la matriz extracelular sin necesidad de actividad biológica directa mediante BMM (Castro-Alonso y cols., 2019).

4.2. Precipitación de calcita

El proceso de biomineralización para la precipitación de carbonato de calcio puede dar como resultado ocho diferentes polimorfos, siendo los tres mayoritarios la calcita, aragonito y vaterita. Las estructuras de estos polimorfos pueden ser diferenciadas mediante microscopía electrónica de barrido, como se observa en la Figura 1. El polimorfo más estable es la calcita, debido a su estructura cuboidea rectangular. La calcita, combinada con el aragonito y dolomita, conforman el 15% de los sedimentos terrestres. La calcita es utilizada en la industria de construcción en forma de piedra caliza y mármol para la producción de cemento y hormigón (Dietrich, 2013).

El polimorfo de CaCO_3 obtenido en un proceso de biomineralización depende del microorganismo utilizado, su concentración y actividad de la ureasa, cuando la ruta metabólica activada es la hidrólisis de urea. El polimorfo también puede variar según factores externos como pH, temperatura y concentraciones de urea y calcio. En industria se busca obtener calcita en la producción de carbonato de calcio y se puede utilizar distintas fuentes de calcio para obtener dicho polimorfo. Acetato de calcio es una fuente de calcio si se desea obtener vaterita en su mayoría, al igual que el lactato de calcio (Chaparro-Acuña, Becerra-Jiménez, Martínez-Zambrano, y Rojas-Sarmiento, 2018; Anbu y cols., 2016).

Figura 1: Tipos de polimorfismos de carbonato de calcio.



Descripción: Fotografías tomadas a través de microscopio electrónico de barrido. a) Calcita b) Aragonito c) Vaterita (Hernández-Hernández y cols., 2008)

La formación de cristales de calcita mediante microorganismos, o MICP por sus siglas en inglés es el proceso más común dentro de la biomineralización. Anteriormente el término utilizado era calcificación, refiriéndose al proceso especialmente con carbonato de calcio. El proceso ocurre espontáneamente cuando se encuentra una solución con exceso de iones de calcio y productos metabólicos de carbonato secretados por las células del microorganismo. Estos metabolitos se unen con calcio para la precipitación de calcita insoluble (Castro-Alonso y cols., 2019; Anbu y cols., 2016; Chaparro-Acuña y cols., 2018).

La precipitación de calcita es un proceso que puede ocurrir a través de distintos procesos me-

tabólicos, dependiendo del microorganismo que esté produciendo el mineral. Entre los procesos que han demostrado precipitación de calcita se encuentran la oxidación anaeróbica de sulfitos, formación de polímeros extracelulares, fotosíntesis e hidrólisis de urea, siendo este último el proceso más estudiado y distribuido en la naturaleza. Durante la hidrólisis de urea, es la enzima ureasa que media el proceso, y la calidad de los cristales depende de factores del medio como pH, concentración de carbonos inorgánicos disueltos (DIC), la concentración de iones de calcio y los sitios de nucleación (Castro-Alonso y cols., 2019; Anbu y cols., 2016; Chaparro-Acuña y cols., 2018).

4.3. Bioconcreto

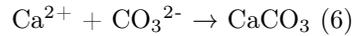
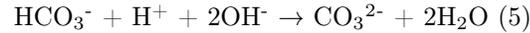
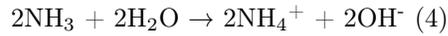
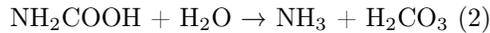
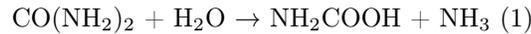
El cemento es usado como material de construcción para robustecer el suelo. Sin embargo, la producción de cemento tiene un impacto ecológico significativo en todas las etapas de su producción. Globalmente, la producción de cemento representa el 5% del total de energía industrial y es responsable del 8.6% de la producción de dióxido de carbono causado por el hombre (Miller, Horvath, y Monteiro, 2016). Un método alternativo al concreto para endurecer los suelos es la lechada química. Esta contiene silicato de sodio, cloruro de calcio, hidróxido de calcio, acrilatos y acrilamidas. Su composición hace que la lechada química sea un proceso sumamente costoso y tóxico, para tanto el hombre, como para el ambiente (Stabnikov y cols., 2013).

La precipitación de calcita incitada por microorganismos hace viable el sellado de fracturas de apertura fina ($<100\mu\text{m}$) de una estructura, lo que mejora la resistencia del material y aumenta la durabilidad de este (Tobler, Minto, El Mountassir, Lunn, y Phoenix, 2018). Todo esto se debe a la reducida absorción de agua del material. En 1990, JP Adolf y su equipo patentaron la técnica de restauración de piedra decorativa MICP con el nombre de "Biodeposición". Esta patente expiró en 2010 (Adolphe, Loubière, Paradas, y Soleilhavoup, 1990). Hoy, este material se llama bioconcreto. Bioconcreto se define como un hormigón tratado con microorganismos que precipitan el carbonato de calcio para cerrar las grietas del cemento. Esta capacidad, denominada autorreparación, convierte al bioconcreto en una alternativa atractiva al cemento convencional. El bioconcreto no solo se es autorreparable (permitiendo así una reducción de gastos de reparación), sino que su fabricación es más sostenible que el cemento convencional (Stabnikov y cols., 2013; Seifan y cols., 2016). De igual manera, reduce la permeabilidad del cemento, disminuyendo su erosión por congelación y descongelación. Asimismo, participa en la defensa de superficies de concreto contra el ingreso de sustancias dañinas (Anbu y cols., 2016; Chaparro-Acuña y cols., 2018; Castro-Alonso y cols., 2019).

4.4. Producción de calcita mediante hidrólisis de urea

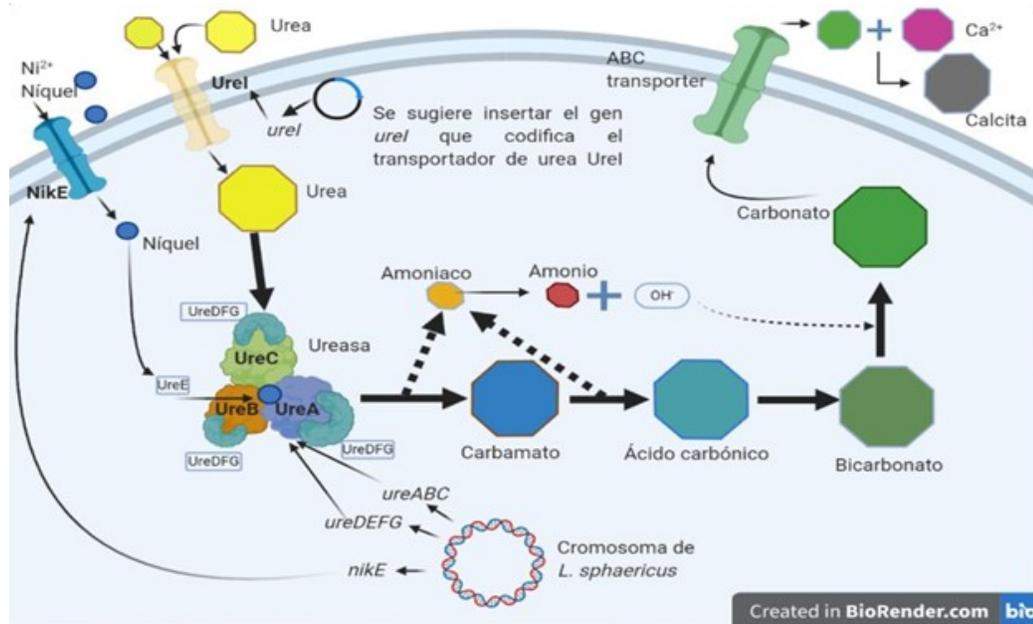
La hidrólisis de urea es un proceso metabólico mediado por la ureasa (EC 3.5.1.5) y la anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1). En la Figura No.2 se observa la ruta metabólica para producción de CaCO_3 en *Lysinibacillus* descrita mediante análisis computacional genético (Morales, 2020). La hidrólisis de urea es una serie de reacciones químicas que se dividen en dos etapas, mediadas por la ureasa. En la primera, un mol de urea se hidroliza a amoníaco y carbamato (reacción 1). En la siguiente fase el carbamato se hidroliza a amoníaco y ácido carbónico (reacción 2). La anhidrasa carbónica convierte el ácido carbónico en bicarbonato (reacción 3) y los moles de amoníaco se convierten en amonio por hidrólisis (reacción 4). Luego, el bicarbonato busca estabilidad y reacciona dando lugar al ion carbonato y agua, utilizando los iones hidrógeno de la conversión a bicarbonato y los iones hidroxilo de la hidrólisis de amoníaco (reacción 5). Los iones hidroxilo restantes aumentan el pH del medio. Por último, el ion carbonato creado reacciona con un ion de calcio formando carbonato de calcio (reacción 6). El amonio y carbonato son liberados del citoplasma celular y al entrar en contacto con los iones de calcio, atraídos por la carga negativa de la superficie celular, se forma el precipitado de carbonato de calcio de forma extracelular (Dhami, Alsubhi, Watkin, y Mukherjee, 2017; Chou,

Aydilek, Seagren, y Mangel, 2008; Castro-Alonso y cols., 2019).



Las ureasas (EC 3.5.1.5) pertenecen a la superfamilia de las amilohidrolasas y fosfotriesterasas. Son metaloenzimas con níquel en su centro activo. Por otro lado, la anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1) es también una metaloenzima, pero utiliza zinc en lugar de níquel en su centro activo (Nelson y Cox, 2018).

Figura 2: Hidrólisis de urea para producción de carbonato de calcio.



Descripción: Ruta metabólica utilizada por los microorganismos para la producción de calcita a partir de hidrólisis de urea, con ejemplificación de las enzimas necesarias y los genes involucrados (Morales, 2020)

4.5. Género *Lysinibacillus*

El género *Lysinibacillus* es uno de los géneros que producen CaCO₃ mediante biomineralización, por lo cual puede ser aplicado en bioconcreto. Este género pertenecía previamente al género *Bacillus*. Este género es de la familia Bacillaceae y del filo Firmicutes. Los microorganismos *Lysinibacillus* son Gram positivas, ubicuas, móviles, aeróbicas o anaeróbicas facultativas. Su morfología es bacilar, con forma de varilla. Los *Lysinibacillus* son formadores de endosporas. Existen 26 especies reportadas de este género. Este género demuestra interés en diversas investigaciones debido a su aplicación

industrial de distintos campos por sus habilidades biopesticidas, de biorremediación, capacidad antimicrobiana y baja patogenicidad en humanos. Su especie representativa es *L. sphaericus* (Kayath y cols., 2019).

4.6. Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano es un proceso complejo que involucra numerosas reacciones anabólicas y catabólicas. La finalidad de estas reacciones es la división celular. Cada microorganismo tiene sus propias especificaciones de nutrientes y condiciones para su crecimiento óptimo. El descubrimiento esta información se lleva a cabo en estudios controlados en laboratorio, utilizando cultivos puros de cada microorganismo. Existen dos posibles escenarios para el estudio del crecimiento bacteriano: el cultivo en lote o cultivo continuo. En el cultivo por lote se evalúa el crecimiento bacteriano con una cantidad establecida de sustrato añadido al lote. En cambio, en el cultivo continuo el sustrato se añade en un flujo constante, manteniendo la concentración del sustrato constante en el medio de cultivo. Ambos escenarios de crecimiento bacteriano se han estudiado tanto fisiológicamente como descrito matemáticamente. Esta información puede ser utilizada para optimizar el medio de cultivo y cantidad de nutrientes para cierto microorganismo para un desarrollo específico de un metabolito de interés (Maier y Pepper, 2015).

4.6.1. Curva de crecimiento bacteriano

Para el estudio del crecimiento bacteriano se utiliza un cultivo en lote de un aislado puro de microorganismos en condiciones ambientales y condiciones de nutrientes controlados. En dichas condiciones el crecimiento bacteriano puede medirse como una función de tiempo, obteniendo una curva de crecimiento. Esta curva incluye fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. Cada fase representa una etapa distinta del crecimiento bacteriano, asociado a cambios fisiológicos del cultivo celular. Estas fases se pueden observar en la curva de crecimiento bacteriano de la Figura 3. Una curva de crecimiento bacteriano se realiza en laboratorio al medir el número celular en el cultivo en un periodo de tiempo. Para esta medición de número de células puede utilizarse métodos como densidad óptica en espectrofotometría, conteo en Placa Petri de unidades formadoras de colonias (UFC) y conteo por microscopía utilizando una cámara de Neubauer (Maier y Pepper, 2015).

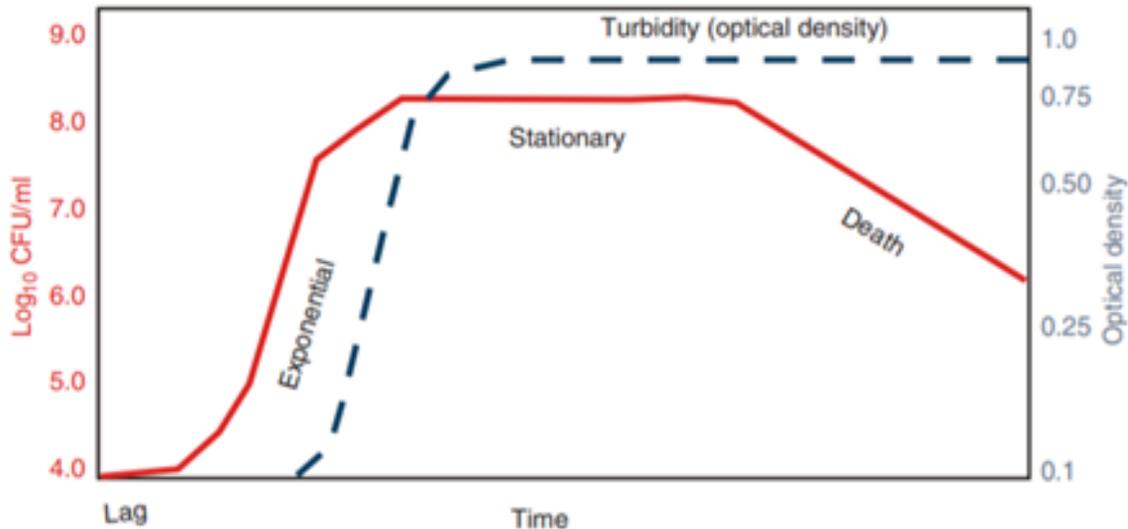
Fase de latencia

La primera fase que se observa en cultivo por lotes es la fase de latencia. En esta fase la tasa de crecimiento es cero. Este periodo de tiempo ocurre después de colocar un inóculo en medio de cultivo fresco. En esta fase ocurre la adaptación fisiológica del microorganismo a las condiciones del medio. Esto puede requerir de tiempo para la inducción de ARN mensajero específico y síntesis de proteínas según los requerimientos del nuevo medio de cultivo. Esta fase puede durar de minutos a horas y se puede controlar según el tipo de medio y el tamaño del inóculo inicial (Maier y Pepper, 2015; Monod, 1949).

Fase exponencial

La segunda fase de crecimiento es la fase exponencial. En este periodo se observa un crecimiento exponencial, es decir el crecimiento más rápido posible bajo las condiciones del cultivo por lote. En esta fase se aumenta exponencialmente el número de células en un tiempo determinado. Durante esta fase el crecimiento celular se puede expresar matemáticamente con la siguiente ecuación:

Figura 3: Esquema de curva de crecimiento bacteriano.



Descripción: Una curva de crecimiento bacteriano típica. Se pueden comparar las fases de crecimiento (Maier y Pepper, 2015).

$$dX/dt = \mu X$$

donde X es el número de células, t es tiempo y μ es la tasa de crecimiento específico. El tiempo que tarda una célula en dividirse es conocido como el tiempo de generación (Maier y Pepper, 2015; Monod, 1949).

Fase estacionaria

La tercera fase de crecimiento es la fase estacionaria. En esta fase no hay crecimiento neto. En esta fase todavía existe crecimiento y división celular, simplemente existe un balance entre el número de células en división y el número de células que mueren. Esta fase se alcanza cuando la fuente de carbono o demás nutrientes se terminaron (Maier y Pepper, 2015; Monod, 1949).

Fase de muerte

La última fase de crecimiento es la fase de muerte. Esta fase se caracteriza por una pérdida neta de células vivas. Esta fase es exponencial, aunque a una menor tasa que la fase de crecimiento exponencial. Debido a que las células muertas permanecen en el medio, si se determina la curva de crecimiento mediante densidad óptica en lugar de mediante conteo en Placa Petri, esta fase puede no ser evidente (Maier y Pepper, 2015; Monod, 1949).

4.6.2. Esporulación

Las especies bacterianas tienen distintos mecanismos de adaptación cuando se someten a condiciones ambientales selectivas. Uno de los mecanismos de supervivencia más comunes es la formación

de esporas. Las esporas bacterianas son la forma más inactiva de bacterias ya que exhiben un metabolismo y respiración mínimos y una producción de enzimas reducida. Las bacterias Grampositivas son más conocidas por producir esporas intracelulares conocidas como endosporas. Las endosporas se forman dentro de las células bacterianas y son comunes en especies de *Bacillus* y *Clostridium*. Las endosporas pueden resistir la inactivación con etanol y sobrevivir a temperaturas de hasta 150°C, pueden proteger a las células de radiación ultravioleta, a pH extremos, sequía y agotamiento de nutrientes.

Las endosporas vuelven a germinar en células vegetativas cuando las condiciones ambientales que la rodean favorecen el crecimiento y la reproducción bacteriana. El proceso de formación de esporas conlleva una serie de pasos. Comienza con la replicación de ADN bacteriano, seguida de la formación de preespora, continúa con la formación de corteza entre las membranas interna y externa para encerrar a la espora. Finalmente, la capa de espora externa rodea la endospora antes de su liberación. La tinción de muestras bacterianas inactivas con verde de malaquita como tinte primario y safranina como tinte de contraste da como resultado la aparición de endosporas ovaladas verdes encerrados dentro de células bacterianas vegetativas rosadas (Basta y Annamaraju, 2020).

4.6.3. Medio de cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La variedad de medios de cultivo se debe a la diversidad metabólica de los microorganismos, por lo cual no existe un cultivo universal adecuado para todos. Algunos de los componentes habituales de los medios de cultivo son el agar, extractos, peptonas, fluidos corporales, sistemas amortiguadores, indicadores de pH, agentes reductores y/o agentes selectivos. El agar se utiliza como agente gelificante para dar solidez a los medios de cultivo, los extractos y peptonas proporcionan nutrientes, especialmente proteínas, nitrógenos y sales minerales. Los fluidos corporales aportan factores de crecimiento e inhibidores para algunas bacterias. Los sistemas amortiguadores permiten mantener el pH dentro del rango óptimo para crecimiento bacteriano y los indicadores detectan variaciones debido a fermentación y otros procesos metabólicos. Los agentes reductores crean condiciones en el medio para permitir crecimiento de microorganismos anaerobios o microaerófilos y los agentes selectivos permiten frenar el crecimiento a determinados microorganismos (Tanner, 2007).

Existen medios de cultivo generales, que son aquellos que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. También se encuentran los medios de enriquecimiento, que favorecen el crecimiento de determinado tipo de microorganismo sin inhibir el crecimiento de los demás. Los medios selectivos permiten el crecimiento de un tipo específico inhibiendo el desarrollo de los demás y los medios diferenciales ponen de manifiesto propiedades de un determinado tipo de microorganismo (Tanner, 2007).

Se puede utilizar una composición específica de medio de cultivo para optimizar la producción de carbonato de calcio en especies del género *Lysinibacillus*. Para dicha optimización el medio debe de incluir cloruro de calcio para aumentar la carga negativa de la membrana y facilitar la atracción de iones de calcio, también aportados por este compuesto, para la formación del mineral. También se debe mejorar la actividad de la ureasa, al ser la enzima responsable de la producción de calcita por hidrólisis de urea. Para mejorar la actividad de la ureasa se debe utilizar un medio pobre en nitrógeno, con un pH básico de aproximadamente 8, También se debe adicionar níquel, debido a que es un compuesto necesario para la ureasa, al ser una metaloenzima. Se ha observado que el bario y citrato aumentan la actividad de la ureasa. Se debe evitar los iones de litio, magnesio, zinc o yodo, ya que actúan como inhibidores de la ureasa (Al-Thawadi, 2011).

4.7. Microestructura de bioconcreto

Para su aplicación industrial y optimización es necesario conocer a fondo la microestructura del bioconcreto desarrollado bajo ciertas condiciones y con cada microorganismo específico. Para estudiar los cambios a micro niveles de la estructura de concreto durante la reparación mediante biomineralización se utilizan la tomografía computarizada de rayos X, la microscopía electrónica de barrido y la espectroscopía de dispersión de energía mayoritariamente.

4.7.1. Microscopía electrónica de barrido

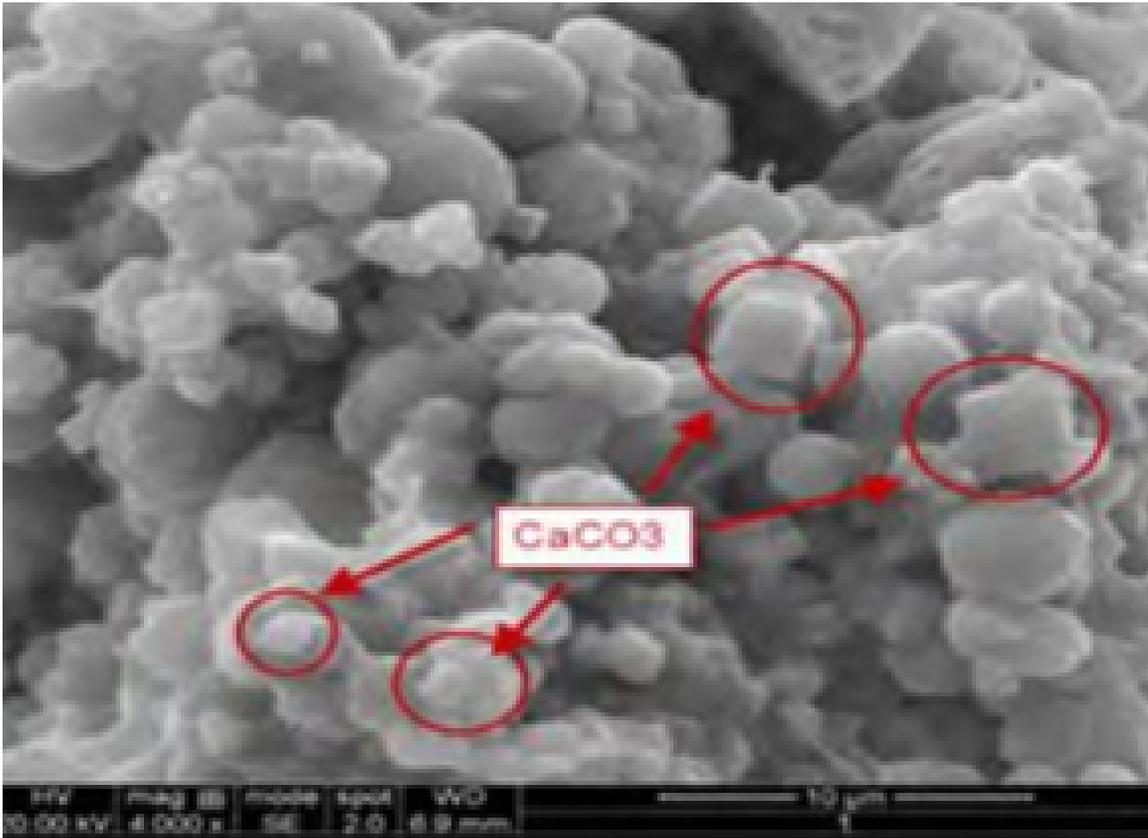
El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un tipo de microscopio electrónico diseñado para estudiar las superficies de objetos sólidos. Este microscopio utiliza un haz de electrones enfocados de energía baja como sonda de electrones que escanea sobre la muestra. Este microscopio produce imágenes de alta resolución, por lo que pueden ser examinadas a una alta magnificación. Para preparación de muestra solo se requiere que sean conductoras, ya que el funcionamiento depende del haz de electrones. En el microscopio electrónico de barrido la muestra generalmente se recubre con una capa de carbono o de un metal como el oro para darle propiedades conductoras (Britannica, 2013).

El microscopio electrónico de barrido tiene aplicaciones variadas, desde la industria petroquímica o metalurgia hasta la medicina forense. Los análisis realizados en este microscopio proporcionan datos como textura, tamaño y forma de la muestra. En geología se realizan investigaciones geomineras, cristalográficas, mineralógicas y petrológicas. Para estudio de materiales se realiza caracterización microestructural de materiales, identificación y análisis de fases cristalinas y transiciones de fases en materiales como cerámicos, semiconductores, polímeros y minerales. También se puede determinar el grado de cristalinidad y presencia de defectos en la muestra. Esta técnica se utiliza para control de calidad en industria textil, electrónica y en medicina forense, botánica y biomedicina para comprender la estructura de la muestra a nivel microscópico (Penagos, 2013).

4.7.2. Cristalografía de rayos X

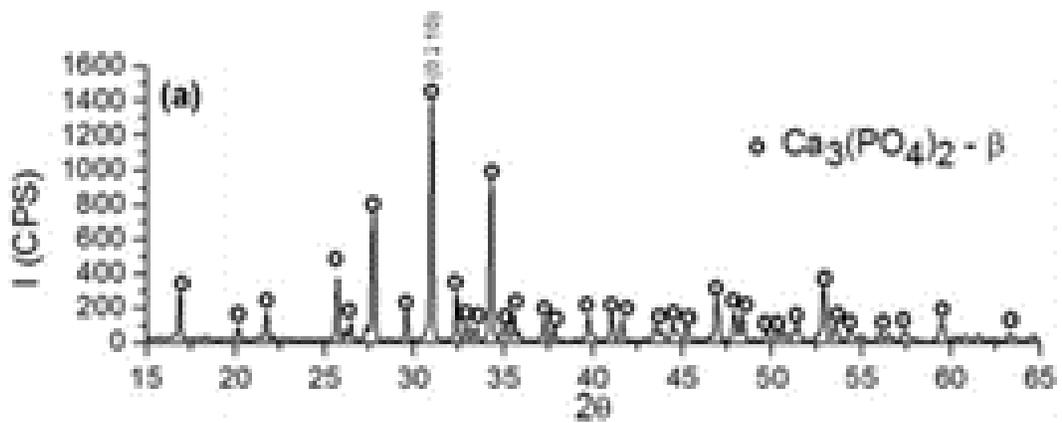
La cristalografía de rayos X ha sido una herramienta fundamental en el desarrollo de campos de la ciencia y la biología. Esta técnica permite averiguar la estructura, mecanismo molecular y actuación de moléculas biológicas como las proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos. También puede ser utilizada para el diseño de fármacos. La cristalografía de rayos X permite visualizar objetos que se pueden detectar a simple vista y requieren de radiación electromagnética de cierta longitud de onda para poder visualizarse. A diferencia de la luz visible, los rayos X no pueden ser focalizados con facilidad, por lo que se separa el proceso en dos operaciones de forma simultánea. La primera fase se encarga de la difracción. La difracción de una sola molécula es demasiado débil para medirse, pero el grado interno de un cristal permite medir la difracción de sus moléculas, obteniendo una estructura más detallada. La información de la estructura cristalina permite conocer las posiciones de los átomos en el espacio y el estado de vibración térmica (Kumar y cols., 2013).

Figura 4: Calcita en microscopio electrónico de barrido



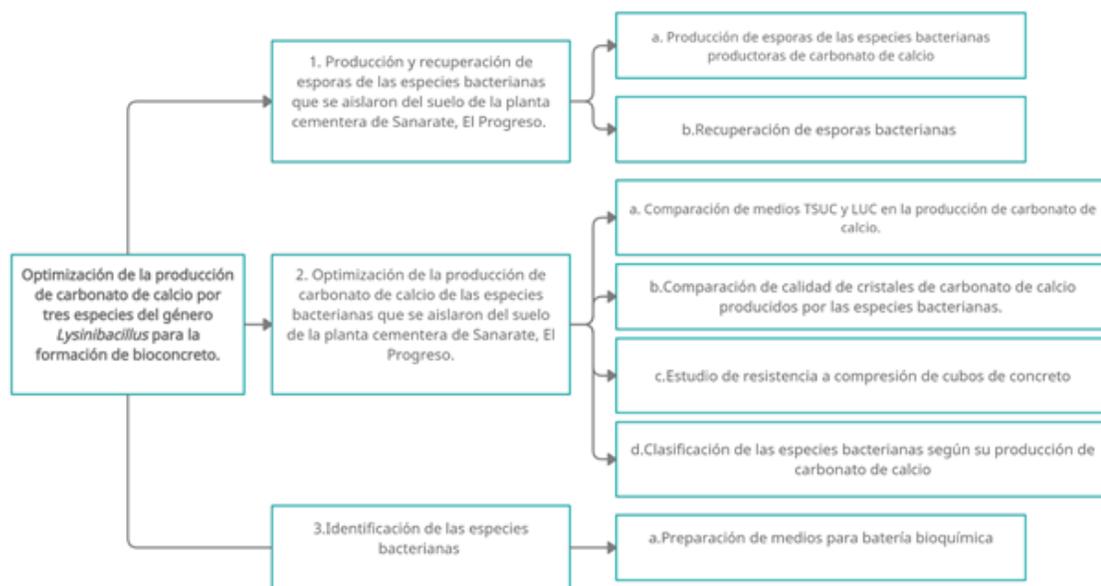
Descripción: Visualización de calcita producida por precipitación microbiana en microscopio electrónico de barrido (Kumar, Prabhakara, y Pushpa, 2013).

Figura 5: Espectrograma de calcita con cristalografía de rayos X



Descripción: Patrón generado por bioconcreto en cristalografía de rayos X (Kumar y cols., 2013).

Figura 6: Metodología a llevar a cabo este estudio



Descripción: Diagramación de metodología a llevar a cabo en este estudio. La primera sección cumple con los objetivos específicos 1 y 2. La segunda sección con el objetivo 3 y la sección 3 con el objetivo 4.
 Fuente: Autoría propia

5.1. Sitio de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en la ciudad de Guatemala, Guatemala en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala: Laboratorio del Departamento de Bioquímica y Microbiología y Laboratorio del Centro de Estudios en Biotecnología de la misma universidad.

5.2. Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio fueron bacterias aisladas del suelo del género *Lysinibacillus*, productoras de carbonato de calcio y obtenidas de la cementera de Cementos Progreso ubicada en Sanarate, El Progreso.

5.3. Enfoque, diseño y tipo de investigación

Esta investigación tuvo un enfoque combinado dominante, siendo el enfoque cuantitativo el dominante, y un diseño experimental verdadero.

5.4. Tipo y tamaño de muestra

Se utilizaron bacterias aisladas del suelo seleccionadas de manera discrecional, debido a su efectividad en la producción de carbonato de calcio.

5.5. Estudios previos

Este proyecto conjunto de la Universidad del Valle de Guatemala, el Centro de Estudios en Biotecnología y Cementos Progreso comenzó en el 2018. Bajo este proyecto se realizaron dos estudios que dieron lugar a el presente estudio. El primero titulado "Determinación de biomineralización a partir de bacterias de suelo y subsiguiente formulación de medio de cultivo a base de desechos industriales para la biorreparación de microgrietas en concreto"(Heredia, 2019). En este primer estudio se aislaron distintas cepas bacterianas de una cantera cementera y se comprobó su capacidad de biomineralización mediante hidrólisis de urea. El segundo se titula Identificación de la ruta metabólica para producción industrial de calcita por hidrólisis de urea en *Lysinibacillus sphaericus* mediante análisis computacional genético de *Sporosarcina*, *Bacillus* y *Lysinibacillus* spp.(Morales, 2020). En este estudio se describió la ruta metabólica de las especies del género *Lysinibacillus* para la producción de CaCO_3 mediante hidrólisis de urea *in silico* a partir de un análisis computacional genético.

5.6. Criterios de inclusión y exclusión

Se excluyeron aquellas bacterias aisladas del suelo de la cementera de Cementos Progreso cuya producción de carbonato de calcio sea menor a las bacterias que se incluyen. Se incluyeron las tres cepas de bacterias que tengan mayor producción comprobada de carbonato de calcio del género *Lysinibacillus* spp.

5.7. Variables

En el Cuadro No.1 se describen las variables a controlar durante la producción y recuperación de esporas de las cepas bacterianas. Estas variables alteran la tasa de duplicación y el tiempo de consumo de nutrientes de las cepas bacterianas. Entre mayor el número de células bacterianas se encuentren en el medio mayor será la recuperación de esporas. En el Cuadro No. 2 se describen las variables a controlar en la producción de carbonato de calcio de las esporas bacterianas. Al igual que en el Cuadro No.1 estas condiciones deben de ser reguladas para optimizar la producción de calcita.

Cuadro 1: Variables para la producción y recuperación de esporas de las cepas bacterianas que se aislaron del suelo de la planta cementera de Sanarate, El Progreso.

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Temperatura	Temperatura de incubación de crecimiento de las bacterias.	Cuantitativo	°C
Tiempo	Tiempo de crecimiento de las bacterias.	Cuantitativo	Horas
Agitación	Velocidad de agitación de incubadora para el crecimiento bacteriano	Cuantitativo	cm3
Absorbancia	Turbidez del medio de cultivo según concentración bacteriana	Cuantitativo	-
Conteo celular	Número de células por mililitro en cada punto de crecimiento bacteriano	Cuantitativo	Cel/ml
Conteo de esporas	Número de esporas recuperadas mediante esporulación y floculación	Cuantitativo	Cantidad de esporas

Cuadro 2: Variables para la optimización de la producción de carbonato de calcio de las cepas bacterianas que se aislaron del suelo de la planta cementera de Sanarate, El Progreso

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Temperatura	Temperatura de la incubadora para el crecimiento bacteriano.	Cuantitativo	°C
Tiempo	Tiempo de crecimiento de las bacterias.	Cuantitativo	Horas
Volumen	Volumen de EDTA para titulación de carbonato de calcio	Cuantitativo	mL
Concentración de carbonato de calcio	Concentración de carbonato de calcio producida por cada cepa bacteriana	Cuantitativo	g/mL
Presencia de precipitado	Precipitado de carbonato de calcio	Cualitativo	Presente/ ausente

5.8. Hipótesis

- Objetivo 1
 - Hipótesis nula 1:
 - - La cepa bacteriana con mayor producción de carbonato de calcio no es una cepa de *Lysinibacillus sphaericus*.
 - Hipótesis alternativa 1:
 - La cepa bacteriana con mejores índices de calidad en cubos de concreto de carbonato de calcio es una cepa de *Lysinibacillus sphaericus*.
- Objetivo 2
 - Hipótesis nula 2:
 - Al realizar una curva de crecimiento no se puede encontrar el tiempo de incubación apropiado para la detención de la curva y consiguiente esporulación de las cepas bacterianas aisladas de una cementera en Sanarate, El Progreso
 - Hipótesis alternativa 2:
 - Al realizar una curva de crecimiento se puede encontrar el tiempo de incubación apropiado para la detención de la curva y consiguiente esporulación de las cepas bacterianas aisladas de una cementera en Sanarate, El Progreso.
 - Hipótesis nula 3:

- No es factible la recuperación de esporas bacterianas mediante esporulación por choque térmico y floculación con cloruro de calcio.
- Hipótesis alternativa 3:
 - Es factible la recuperación de esporas bacterianas mediante esporulación por choque térmico y floculación con cloruro de calcio.
- Objetivo 3
 - Hipótesis nula 4:
 - No existe una diferencia significativa en la cantidad de carbonato de calcio producida en el medio TSUC en comparación a la cantidad producida en sustrato LUC con y sin cofactores.
 - Hipótesis alternativa 4:
 - Existe una diferencia significativa en la cantidad de carbonato de calcio producida en el medio TSUC en comparación a la cantidad producida en sustrato LUC con y sin cofactores.
 - Hipótesis nula 5:
 - Existe una diferencia significativa en la calidad de carbonato de calcio producida en el medio TSUC en comparación a la cantidad producida en sustrato LUC.
 - Hipótesis alternativa 5:
 - No existe una diferencia significativa en la cantidad de carbonato de calcio producida en el medio TSUC en comparación a la cantidad producida en sustrato LUC con y sin cofactores.
- Objetivo 4
 - Hipótesis nula 6:
 - No existe una diferencia significativa en la calidad de carbonato de calcio producida en el medio TSUC en comparación a la cantidad producida en sustrato LUC.
 - eHipótesis alternativa 6:
 - Existe una diferencia significativa en la calidad de carbonato de calcio producida en el medio TSUC en comparación a la cantidad producida en sustrato LUC.

5.9. Viabilidad

Para llevar a cabo este estudio se contó con la autorización del departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala, de utilizar las instalaciones de laboratorio del departamento para llevar a cabo la parte microbiológica de este estudio. No se requirió una revisión de bioética para este estudio. La elección de los géneros de bacterias que se utilizan en este estudio se fundamenta en cepas productoras de calcita obtenidas en los terrenos de Cementos Progreso S.A. y analizadas por el Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) de la Universidad del Valle de Guatemala. Se contó con la aprobación de ambas instituciones para la realización de este estudio. Cabe mencionar que para poder cumplir con los objetivos descritos anteriormente tenía acceso a los equipos requeridos. En la Universidad del Valle de Guatemala tuve acceso a autoclave, incubadora con agitación, espectrofotómetro, microscopio, cámara de Neubauer, baño térmico, centrifugadora, balanzas, horno de secado, cámara de electroforesis y transiluminador. En los laboratorios CETEC de Cementos Progreso tuve acceso a estereoscopio, prensa hidráulica, microscopio electrónico de barrido, difractor de rayos X y mezcladora.

5.10. Materiales y métodos

1. Identificación de las cepas bacterianas

I Preparación de medios para batería bioquímica

1) Prueba de motilidad

- Se seleccionó una colonia aislada del cultivo realizado.
- Se picó la colonia con un asa en punta e inoculó en medio SIM pinchando una sola vez en el centro.
- Se incubó a 36°C por 120 horas y se examinó cada 24 horas
- Resultado positivo: Crecimiento bacteriano a través del medio, no únicamente en el asado.

2) Prueba de oxidasa

- Se seleccionó una colonia aislada del cultivo realizado.
- Se sumergió papel filtro en solución de reactivo de Kovac (1% tetrametil-p-fenilediamina dihidrocloruro en agua)
- Se observó el cambio de color en 10 segundos
- Resultado positivo: cambió de color a morado o azulado.

3) Prueba de fijación de nitrógeno

- Se prepararon 500mL de medio Burk (10g de dextrosa, 0.41g de KH_2PO_4 , 0.52g de K_2HPO_4 , 0.05g de Na_2SO_4 , 0.2g de CaCl_2 , 0.1g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0025g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 15g de agar, con ajuste de pH a 7)
- Se sembraron placas con cada bacteria y se dejaron incubando 24h, después se re-aislaron en nuevas cajas y dejaron incubando 24 horas más. Se repitió el proceso 5 veces.
- Resultado positivo: crecimiento bacteriano.

4) Prueba de solubilización de fosfatos

- Se preparó medio de agar nutritivo suplementado con 5% lectina y medio agar nutritivo suplementado con 5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- Se sembraron colonias en ambas placas y se observó crecimiento tras incubación por 4-5 días.
- Se interpretó un resultado positivo como un halo de solubilización alrededor del crecimiento bacteriano.

5) Prueba de producción de amoníaco

- Se preparó medio urea con indicador de pH fenolftaleína, que viró rosa en pH básico.
- Se incubaron placas inoculadas por 24 horas a 37°C.
- Resultado positivo: Cambio de color de agar a rosa intenso.

Se utilizó la metodología descrita por (Benavides y Hermida, 2008; Hashmi, Bindschedler, y Junier, 2020)

II Perfil plasmídico de las cepas bacterianas

- Se realizó un cultivo de 8 horas en caldo tripticasa soya de las tres cepas bacterianas.
- Se centrifugó 1.5mL de cultivo bacteriano a 10,000 g por 30 segundos.
- Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 100uL de solución de 25mM tris-HCl pH8, 50mM de glucosa y 10mM EDTA.
- Se mezcló la solución en vortex por 2 minutos.
- Se añadió 200uL de 0.2N de NaOH y 1.0% de SDS.
- Se incubó 5 minutos en hielo y se añadió 150uL de solución de 120mL de 5M acetato de potasio, 23mL de ácido acético glacial y 57mL de agua destilada. incubó por 5 minutos en hielo y se centrifugó por 5 minutos a 12,000g.

- Se desplazó el sobrenadante a un nuevo tubo y se agregó 700uL de etanol 100resuspendió el precipitado en 25uL de buffer TE,
- Se preparó un gel de agarosa 1.5 % y se corrieron las muestras a 100V por 45 minutos.

2. Crecimiento de cepas bacterianas y producción de esporas

I Producción y recuperación de esporas de las cepas bacterianas que se aislaron del suelo de la planta cementera de Sanarate, El Progreso.

- 1) Producción de esporas de las cepas bacterianas productoras de carbonato de calcio
 - a' Medición de curvas de crecimiento bacteriano.
 - Se prepararon 400mL de caldo tripticasa de soya según las instrucciones del fabricante ajustando el pH a 8.
 - Se inoculó el caldo con 1 colonia de la bacteria aislada del suelo de la planta cementera de Sanarate, El Progreso y se dejó incubando 48 horas a 37°C y 190rpm en una incubadora con agitación.
 - Se prepararon 4 litros de caldo tripticasa de soya según las instrucciones del fabricante y se ajustó el pH a 8. Se dividió el medio en tres Erlenmeyer de 1L con 900mL de medio de cultivo y tres Erlenmeyer de 250mL con 225mL de medio de cultivo.
 - Se inoculó el nuevo medio preparado con el cultivo de 48 horas de la bacteria. Los Erlenmeyer de 1L se inocularon con 100mL del cultivo bacteriano y los Erlenmeyer de 250mL se inocularon con 25mL del cultivo bacteriano.
 - Se incubaron los 6 Erlenmeyer inoculados a 37°C y 190rpm.
 - Cada hora y media se tomó un mililitro de cada Erlenmeyer para medir crecimiento celular a OD₆₀₀. Además, se tomó un mililitro para conteo en placa de Neubauer.

Esta metodología fue modificada de (T. Chen y cols., 2019; Heredia, 2019)

- 2) Recuperación de esporas bacterianas
 - a' Esporulación y recuperación de esporas bacterianas mediante floculación
 - Se realizaron cultivos en Erlenmeyer hasta fase exponencial, identificada por la curva de crecimiento previa.
 - Se colocaron en un baño de agua a 80°C por 15 minutos para fomentar la generación de esporas. Se tomaron 5mL para realizar conteo de esporas en placa.
 - Se añadieron 3.5g/L de cloruro de calcio dihidratado a los Erlenmeyer.
 - Se colocaron a 90rpm por 5 minutos y luego a 40rpm por 10 minutos para la formación de flóculos.
 - Se dejaron en reposo la suspensión por 30 minutos y se recuperaron los flóculos mediante centrifugación.
 - Se dejaron secar los flóculos en horno para el secado de esporas.
 - Se pesaron las esporas secadas y se calculó la eficiencia de recuperación de acuerdo con el conteo bacteriano de la curva de crecimiento.

Esta metodología fue modificada de (Luna, Lopes, y Massarani, 2005; Guidi, Lehner, Lüthy, y Tonolla, 2013)

- b' Tinción de esporas
 - Se realizó un frotis con las esporas recuperadas mediante floculación
 - Se cortó papel filtro del tamaño del frotis y se colocó encima del frotis.
 - Se colocó el frotis con papel filtro en un asa y malla con un soporte de metal, para colocar por debajo un mechero.
 - Se encendió el mechero y se colocó verde de malaquita sobre el papel filtro, manteniéndolo húmedo durante 5 minutos.

- Se dejó enfriar el frotis.
- Se lavó con agua destilada.
- Se tiñó con safranina por un minuto y se lavó con agua destilada.
- Se observó la tinción en microscopio.

Esta metodología fue modificada de (Kozuka y Tochikubo, 1991; Heredia, 2019)

c' Cuento de esporas bacterianas

- Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-8} con 1mL de cultivo bacteriano expuesto a choque térmico.
- Se observaron las diluciones seriadas de 10^{-6} y 10^{-7} en cámara de Neubauer y contaron las esporas en cada dilución.
- Se calculó el porcentaje de recuperación de esporas bacterianas.

Esta metodología fue modificada de (Kozuka y Tochikubo, 1991)

d' Reactivación de esporas

- Se colocó 0.01g de esporas en agar tripticasa soya preparado según las especificaciones del fabricante y con pH ajustado a 8.
- Se incubaron por 48 horas a 37°C.
- Se observó crecimiento bacteriano después de ese periodo de tiempo.

Esta metodología fue modificada de (Kozuka y Tochikubo, 1991)

3. Optimización de la producción de carbonato de calcio de las cepas bacterianas que se aislaron del suelo de la planta cementera de Sanarate, El Progreso.

I Comparación de medios TSUC y LUC en la producción de carbonato de calcio.

- Se prepararon 180 Eppendorf de 1.5mL con 1mL cada una de las siguientes soluciones: TSUC, TSUC con 1 % hidróxido de bario, TSUC con 10μM sulfato de níquel y TSUC con 20mM citrato de calcio, LUC con 1 % hidróxido de bario, LUC con 10μM sulfato de níquel y LUC con 20mM citrato de calcio.
- Se inocularon Eppendorf de cada solución con $2.5 * 10^7$ esporas por pulgada cúbica de cada una de las cepas bacterianas y 1 Eppendorf sirvió de control
- Se titularon 3 Eppendorf de cada solución a las 24 horas, 3 Eppendorf a los 3 días, 3 Eppendorf a los 7 días, 3 Eppendorf a los 15 días y 3 Eppendorf a los 30 días de la siguiente forma:
- Se ajustó el pH de cada Eppendorf para la titulación a 10 utilizando NaOH
- Se añadieron unas 2-3 gotas de eriocromo negro 0.5 % (p/v) a cada muestra y se tituló con EDTA 0.01M hasta alcanzar un color azul del indicador. La precipitación total de carbonato de calcio se calculó en base al volumen de EDTA agregado al cambio de color.
- Se realizó el procedimiento en triplicado.

Esta metodología fue modificada de (Hashmi y cols., 2020)

II Comparación de calidad de cristales de carbonato de calcio producidos por las cepas bacterianas.

- Con la colaboración de Cementos Progreso, se generaron 39 cubos de concreto mezcla con alta resistencia inicial (ARI+) normados según ASTM C109, con modificación de 3 cubos por ensayo, en escala 1:50 con un mortero de concentración 2.5×10^7 esporas por pulgada cúbica, el medio necesario para el volumen de agua a agregar y una proporción de 1:2.75 de volumen de arena. Se ensayaron las tres cepas, con ambos medios, además de controles para cada cepa y medio, un blanco y un tratamiento en seco.
- Se agrietaron los cubos de concreto mediante prensa hidráulica Toni Technik, modelo ToniPACT II, según la norma ASTM C 109, después de 24 horas de curado en cámara con humedad al 95 % y 23°C y 72 horas de secado a temperatura ambiente.

- Se identificaron las grietas para monitorear la producción de carbonato de calcio por parte de las bacterias utilizando el estereoscopio marca LEICA, modelo MZ10F, con cámara LEICA MC170 ubicado en el Centro de Investigación y Desarrollo (CETEC), de Cementos Progreso.
- Se sumergieron los cubos en agua con medio TSUC o sustrato LUC, según el tratamiento, a una temperatura de 21-25°C y se monitorearon las grietas por estereoscopia, con estereoscopio marca LEICA, modelo MZ10F, con cámara LEICA MC170 HD, en aumento 2.5X, cada 15 días por 30 días.
- Se midió el porcentaje de reparación de grietas según el cambio de la longitud de las grietas seleccionadas, utilizando las fotografías del monitoreo por estereoscopia y el Software de análisis para medición de imágenes Digimizer.
- Se cortó el cubo de concreto después de los 30 días para su observación en microscopio electrónico de barrido.
- Se visualizó la muestra en el microscopio electrónico de barrido ubicado en CETEC, marca JEOL, modelo JSM-IT500, con espectroscopia de fluorescencia de AZtec por Oxford Instruments, obteniendo así la imagen de los cristales de carbonato de calcio y el espectro de fluorescencia de los puntos observados.
- Los colaboradores de CETEC cortaron el cubo de concreto después de su agrietamiento y curado para realizar un análisis de mineralogía mediante cristalografía de rayos X en difractor de rayos X marca Paralytical Empyrean serie 2.
- Se obtuvo los porcentajes de carbonato de calcio en la muestra de acuerdo a la cristalografía de rayos X.

Esta metodología fue modificada de (Lutfian, 2020)

III Estudio de resistencia a compresión de cubos de concreto

- Con la colaboración de Cementos Progreso, se generaron 144 cubos de concreto ARI+ normados según ASTM C109 escala 1:50 con un mortero de concentración 2.5×10^7 esporas por pulgada cúbica, el medio necesario para el volumen de agua a agregar y una proporción de 1:2.75 de volumen de arena. Se añadirá medio en estado sólido, tanto TSUC como sustrato LUC.
- Se agrietaron los cubos de concreto mediante prensa hidráulica Toni Technik, modelo ToniPACT II según la norma ASTM C 109, después de 24 horas de curado en cámara con humedad al 95 % y 23°C y 1, 3, 7 y 28 días de curado en agua saturada con cal a 23°C. Se anotó el valor de la presión ejercida por la prensa hidráulica hasta que se agrietaron los cubos de concreto.

Esta metodología fue modificada de (Harshali, Mitali, Neha, y Pragati, 2016)

IV Clasificación de las cepas bacterianas según su producción de carbonato de calcio

- Se midió el porcentaje de grieta cubierto por carbonato de calcio del inicio al final del periodo de producción de carbonato de calcio, midiendo los micrómetros de las grietas mediante estereoscopio.
- Se midió el porcentaje de cubos de calcita en la fotografía de microscopia electrónica de barrido realizada. Este porcentaje se obtuvo de la división con el mayor número de cubos de calcita que se encontró en los diversos tratamientos y la multiplicación por 100.
- Se midió la concentración de carbonato de calcio en la muestra tomada en cristalografía de rayos X y la cantidad producida durante la titulación.
- Se tomaron estos tres factores, se sumaron y dividió el total entre 300 para dar un número entre 0 y 1. ($\% \text{ de grieta recubierta} + \% \text{ cubos de calcita en SEM} + \% \text{ de calcita en XRD}$) / 300
- La bacteria con un índice más cercano a 1 es la bacteria con mejor producción de carbonato de calcio.

V Prueba de concepto en cubos de concreto en seco

- Con la colaboración de Cementos Progreso, se generaron 9 cubos de concreto ARI+ normados según ASTM C109 escala 1:50 con un mortero de concentración 2.5×10^7 esporas por pulgada cúbica de la cepa P.5.3.A, el medio de precipitación LUC necesario para el volumen de agua a agregar y una proporción de 1:2.75 de volumen de arena.
- Se realizaron los ensayos de reparación de grietas, difracción de rayos X y Microscopía electrónica de barrido.

6.1. Identificación de la cepa bacteriana con mayor producción de carbonato de calcio

De acuerdo con la batería bioquímica realizada, las tres cepas bacterianas son cepas de la especie *Lysinibacillus sphaericus*, como se observa en el Cuadro No. 3. Las tres cepas mostraron capacidad fijadora de nitrógeno. La cepa denominada como P.5.3.A mostró capacidad de solubilizar fosfatos a diferencia de las otras dos cepas. Las tres cepas dieron positivo a ureasa, a la prueba de motilidad y a la prueba oxidasa. Las tres dieron negativo para solubilización de hierro. En la Figura No. 7 se puede observar el gel de electroforesis para establecer un perfil plasmídico de las cepas del estudio, donde se observan distintas bandas en los carriles de cada cepa.

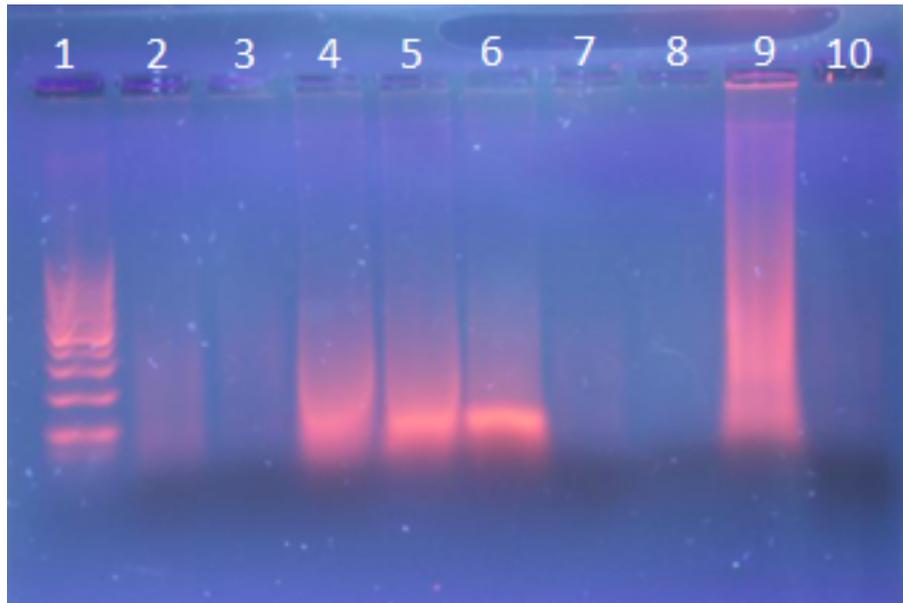
Cuadro 3: Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas del estudio para su identificación.

Cepa	Motilidad	Oxidasa	Fijación de N	Solubilización de P	Producción de NH ₃	Posible especie identificada
P.4.1.A	+	+	+	-	+	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
P.5.2.A	+	+	+	-	+	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
P.5.3.A	+	+	+	+	+	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>

Leyenda Cuadro No.3: En este Cuadro se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas. El símbolo “+” indica un resultado positivo en dicha prueba mientras que el símbolo “-“ indica un resultado negativo. El orden de pruebas de izquierda a derecha es: Prueba de motilidad, prueba de oxidasa, prueba de fijación de nitrógeno, prueba de solubilización de fosfatos y producción de amoníaco.

Fuente: Autoría propia

Figura 7: Gel de electroforesis para perfil plasmídico de las cepas del estudio.



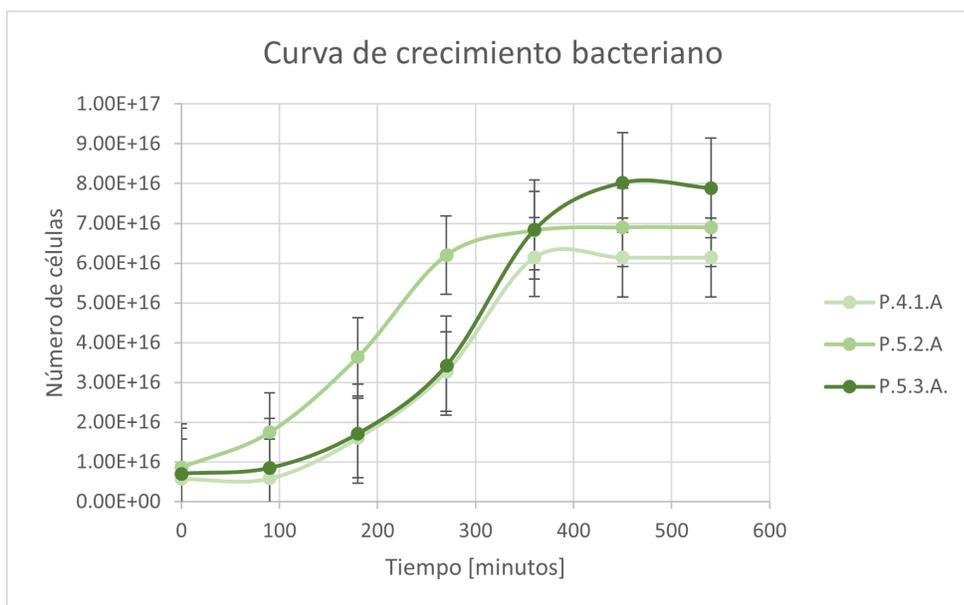
Descripción: El primer carril tiene una escalera de 100bp marca Novagen, el segundo y tercer carril son la cepa P.4.1.A, el cuarto y quinto carril tienen la cepa P.5.2.A, el sexto y séptimo carril tienen la cepa P.5.3.A, el octavo carril tiene la cepa P.4.1.A, el noveno carril tiene la cepa P. 5.2.A y el décimo carril tiene la cepa P.5.3.A.

Fuente: Autoría propia

6.2. Producción y recuperación de esporas de las cepas bacterianas que se aislaron del suelo de la planta cementera de Sanarate, El Progreso

En la Figura No. 8 se observa la curva de crecimiento bacteriano a escala de 250mL de las tres cepas en el estudio. Se puede observar que la cepa P.5.3.A y P.4.1.A se comportan de forma similar durante los primeros 300 minutos de su crecimiento, mientras que la cepa P.5.2.A tiene un tiempo de duplicación mayor, alcanzando mayor número de células en ese tiempo. Se observa que al finalizar los 500 minutos de crecimiento bacteriano la cepa P.5.3.A es la que presenta mayor número de células. En el Cuadro No. 4 se puede observar la cinética del crecimiento bacteriano de las tres cepas. De acuerdo con lo observado en las curvas de crecimiento bacteriano el tiempo de duplicación de las cepas P.4.1.A y P.5.3.A son similares, mientras que el tiempo de duplicación de P.5.2.A es menor, pero se observa tanto en la Figura No.8 como en el Cuadro No.4 en capacidad de carga, al finalizar el periodo de crecimiento exponencial el sistema de 250mL con la cepa P.5.3.A tiene la capacidad de carga para un mayor número de células y supera a la cepa P.5.2.A.

Figura 8: Comparación de curvas de crecimiento bacteriano de las cepas en el estudio



Descripción: En el eje vertical se observa el número de células, mientras que el eje horizontal se encuentra el tiempo de crecimiento. Cada punto representa una medición realizada en esta curva de crecimiento, que se contabilizó utilizando Cámara de Neubauer. Se observa también barras de error representativas de 1 desviación estándar.

Fuente: Autoría propia

Una vez establecida la curva de crecimiento bacteriano se observó que la producción de esporas debía de realizarse alrededor de los 330 a 360 minutos después de la inoculación del medio de producción, previo a la fase estacionaria del crecimiento de las tres cepas. La esporulación, floculación y centrifugación dio como resultado las cantidades que se observan en el Cuadro No. 5. Se observa que la cepa P.5.2.A tiene un mayor peso recuperado pero una menor cantidad de esporas por gramo, siendo la recuperación menos eficiente, mientras que la cepa P.4.1.A tiene la mayor cantidad de esporas por gramo, siendo la recuperación más eficiente de las tres cepas bacterianas.

Cuadro 4: Cinética del crecimiento bacteriano de las cepas en el estudio

Cepa	CDC (No. de cel.)	Pob. inicial (No. de cel.)	T. de duplicación (Minutos)	TDC [μ (en min^{-1})]	Fórmula final
P.4.1.A	$8.237 \cdot 10^{16}$	$5.566 \cdot 10^{14}$	43.32	0.016	$N = (4.58 \cdot 10^{31}) / (5.566 \cdot 10^{14} + (8.18 \cdot 10^{16})e^{(-0.016)t})$
P.5.2.A	$6.175 \cdot 10^{16}$	$1.294 \cdot 10^{15}$	33.01	0.021	$N = (7.99 \cdot 10^{31}) / (1.294 \cdot 10^{15} + (6.05 \cdot 10^{16})e^{(-0.021)t})$
P.5.3.A	$1.130 \cdot 10^{17}$	$7.131 \cdot 10^{14}$	46.21	0.015	$N = (8.06 \cdot 10^{31}) / (7.131 \cdot 10^{14} + (1.12 \cdot 10^{17})e^{(-0.015)t})$

Descripción: Se observa la cinética del crecimiento bacteriano. CDC es capacidad de carga, descrita en número de células. Pob. inicial es la población inicial descrita en número de células. T. de duplicación es tiempo de duplicación en minutos. TDC es tasa de crecimiento en minutos^{-1} . En capacidad de carga el número de células que el sistema de 250mL puede producir en su totalidad, en población inicial se encuentra el número de células inoculado al sistema en el tiempo 0, en tiempo de duplicación se encuentra en minutos la cantidad de tiempo que necesita el sistema para duplicar el número de células presentes, en tasa de crecimiento se encuentra la constante de crecimiento bacteriano de las tres cepas para este medio de producción y en fórmula final la fórmula para poder calcular el número de células en la fase logarítmica de esta curva.

Fuente: Autoría propia

Cuadro 5: Recuperación de esporas bacterianas

Cepa	Peso rec. (gramos)	Esporas/gramo (cel/g)	Esporas recuperadas	Peso prueba TSUC (g)	Peso prueba LUC (g)
P.4.1.A	0.219	$3.75 * 10^{10}$	$8.20 * 10^{10}$	0.009	0.177
P.5.2.A	0.396	$1.30 * 10^{11}$	$5.15 * 10^{10}$	0.025	0.530
P.5.3.A	0.260	$2.58 * 10^{11}$	$6.70 * 10^{10}$	0.013	0.250

Descripción: Se observa el peso recuperado después del proceso de floculación, centrifugación y secado para recuperación de esporas bacterianas. Peso rec. es peso recuperado en gramos, esporas/gramo es el número de esporas por gramo y esporas recuperadas es el total de esporas recuperadas. Los pesos para las pruebas en ambos medios de precipitación se refiere al peso total necesario para un cubo de 2pulg³. Las cepas bacterianas se encontraban a 37°C, 200rpm en caldo de tripticasa soya. Se esporularon con choque térmico a los 300 minutos de inoculación. Luego se calculó la cantidad de esporas por gramo mediante conteo en cámara de Neubauer y el número de esporas recuperadas por 250mL. Se observa también el peso necesario por cubo de concreto de 2 pulg³.

Fuente: Autoría propia

6.3. Optimización de la producción de carbonato de calcio de las cepas bacterianas que se aislaron del suelo de la planta cementera de Sanarate, El Progreso

Para cumplir con el objetivo de optimización de producción de carbonato de calcio de las cepas bacterianas se realizaron cuatro ensayos de producción de bioconcreto y un ensayo en laboratorio para la suplementación de los medios de precipitación. Estos ensayos nos permiten encontrar la combinación de cepa y medio de precipitación correcta para la formulación de bioconcreto bajo diferentes aspectos del concreto como material de construcción.

6.3.1. Ensayo de reparación de grietas en cubos de concreto

Cuadro 6: Medias de porcentajes de reparación de grietas de las cepas bacterianas.

Tratamiento	Porcentaje de reparación de grietas
Blanco	0.00
Cepa P.4.1.A	27.38
Cepa P.5.2.A	26.52
Cepa P.5.3.A	27.39
TSUC	2.32
LUC	0.36
TSUC + P.4.1.A	64.33
TSUC + P.5.2.A	42.45
TSUC + P.5.3.A	74.71
LUC + P.4.1.A	75.27
LUC + P.5.2.A	30.90-
LUC + P.5.3.A	77.46*

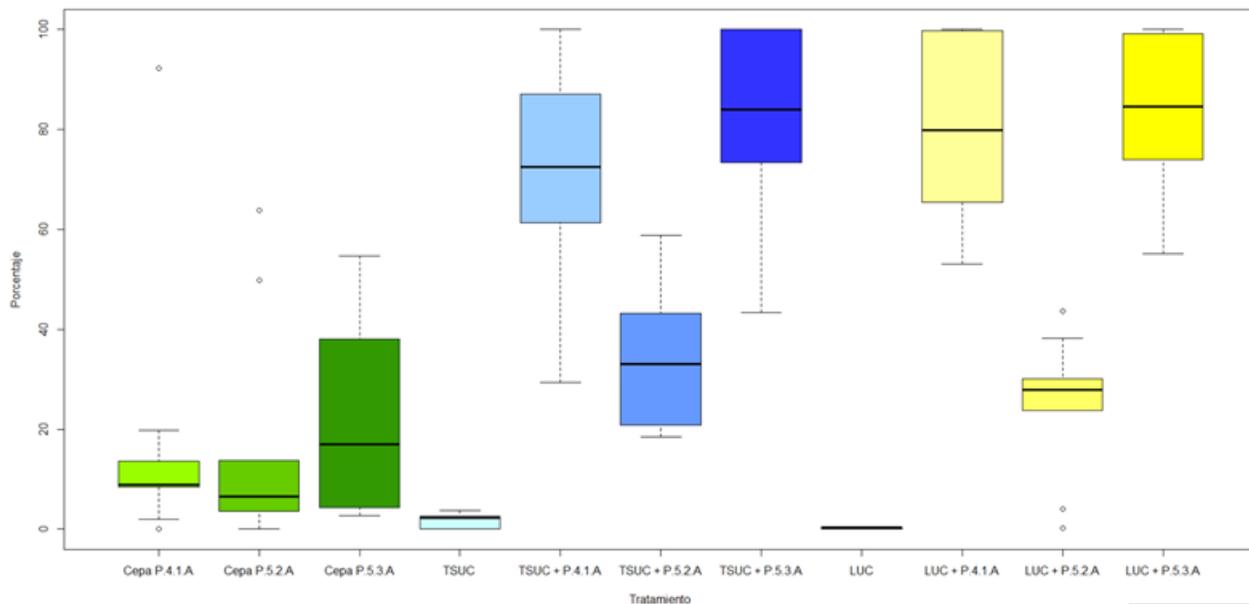
Descripción: Se observa la media de los porcentajes de reparación de grietas de los cubos de concreto según el cambio en la longitud de las grietas monitoreadas en cada tratamiento. En negrilla se encuentran los tratamientos control. Con un asterisco (*) en superíndice se encuentra el tratamiento con mayor promedio en porcentaje de reparación de grietas y con un signo menos (-) se encuentra el tratamiento con menor promedio en porcentaje de reparación de grietas.

Fuente: Autoría propia.

Se observa en el Cuadro No. 6 que la cepa P.5.3.A con el medio de precipitación LUC fue la combinación más eficiente para la reparación de grietas en cubos de concreto, reparando el 77.46 % de las grietas medidas. Mientras que la combinación de la cepa P.5.2.A con el medio de precipitación LUC fue la menos eficiente, reparando únicamente el 30.90% de las grietas. Se puede observar que los controles tanto de las cepas como de los medios de precipitación sin cepa reparan un menor porcentaje de grietas, siendo significativamente menos eficientes que las combinaciones. En la Figura No.9 se puede observar la representación gráfica de los porcentajes de reparación de grietas, donde se observa las diferencias significativas entre los controles y las combinaciones de cepas con medio de precipitación. También se puede observar en la Figura No.9 la diferencia significativa entre la cepa P.5.2.A y las cepas P.4.1.A y P.5.3.A en ambos medios de precipitación, siendo la cepa P.5.2.A. la que mostró un mayor promedio en porcentaje de reparación de grietas en cada tratamiento. Los tratamientos con medio de precipitación TSUC mostraron un color amarillento y desprendían un olor desagradable.

Se puede observar en el Cuadro No. 7 que no existe una diferencia significativa en la reparación de grietas con los distintos medios de precipitación. Es decir, la cepa P.4.1.A repara estadísticamente igual en el medio TSUC que en el medio LUC al igual las cepas P.5.2.A y P.5.3.A. Sin embargo, como se observa en el Cuadro No. 8, existe una diferencia significativa en la reparación de grietas al utilizar las distintas cepas en el mismo medio de precipitación, pero no en el blanco, por lo que, las tres cepas reparan estadísticamente igual al no utilizar un medio de precipitación. En el Cuadro No. 9 se puede observar que la diferencia significativa mencionada en el Cuadro No. 8 con cada medio de precipitación se da entre las cepas P.4.1.A y P.5.2.A y las cepas P.5.2.A y P.5.3.A pero que entre las cepas P.4.1.A y P.5.3.A no existe una diferencia significativa de reparación de grietas.

Figura 9: Porcentaje de reparación de grietas de cubos de concreto con distintos tratamientos.



Descripción: Se observa el diagrama de caja y bigotes de los porcentajes de reparación de grietas en cubos de concreto según cada tratamiento analizado. En verde se observan los controles de las cepas, en azul el medio de precipitación TSUC con su control y distintas combinaciones con las cepas y en amarillo el medio de precipitación LUC con su control y distintas combinaciones con las cepas.

Fuente: Autoría propia

Cuadro 7: Comparación estadística de reparación de grietas de cada cepa según cada medio de precipitación.

Cepa	Prueba	Valor-p	Conclusión
P.4.1.A	Wilcoxon	0.5344	-
P.5.2.A	Wilcoxon	0.3865	-
P.5.3.A	Wilcoxon	0.9646	-

Descripción: Se observa la prueba estadística realizada a cada cepa en los dos medios de precipitación, el valor -P resultado de dicha prueba estadística y la conclusión según el valor-P obtenido. En Conclusión un símbolo + indica que existe diferencia significativa y un símbolo - indica que no existe diferencia significativa.

Fuente: Autoría propia

Cuadro 8: Comparación estadística de reparación de grietas de cada medio de precipitación según cada cepa.

Medio de precipitación	Prueba	Valor-p	Conclusión
TSUC	ANOVA	9.93 *10 ⁻⁵	+
LUC	ANOVA	4.76 *10 ⁻⁸	+
Control	Kruskal-Wallis	0.4759	-

Descripción: Se observa la prueba estadística realizada a cada medio de precipitación con las tres distintas cepas, el valor -P resultado de dicha prueba estadística y la conclusión según el valor-P obtenido. En Conclusión un símbolo + indica que existe diferencia significativa y un símbolo - indica que no existe diferencia significativa.

Fuente: Autoría propia

Cuadro 9: Comparación estadística de reparación de grietas de cada medio de precipitación con cada cepa en pares.

Medio de precipitación	Comparación de cepas	Prueba	Valor-p	Conclusión
TSUC	P.4.1.A con P.5.2.A	Tukey HSD	0.0017436	+
	P.4.1.A con P.5.3.A	Tukey HSD	0.5430681	-
	P.5.2.A con P.5.3.A	Tukey HSD	0.0001193	+
LUC	P.4.1.A con P.5.2.A	Tukey HSD	0.0000005	+
	P.4.1.A con P.5.3.A	Tukey HSD	0.9295495	-
	P.5.2.A con P.5.3.A	Tukey HSD	0.0000002	+

Descripción: Se observa la comparación estadística de cepas en pares con cada medio de precipitación, la prueba utilizada para cada comparación, los valores-P de estas comparaciones estadísticas y la conclusión según el valor-P obtenido. En conclusión un símbolo + indica que existe diferencia significativa y un símbolo - indica que no existe diferencia significativa.

Fuente: Autoría propia

6.3.2. Ensayo de resistencia a compresión de los cubos de concreto

En el Cuadro No. 10, se pueden observar los resultados de la prueba de resistencia a compresión de los cubos de concreto bajo distintos tratamientos en los días 1, 3, 7 y 28. Es evidente que existe un constante aumento de la resistencia a compresión según el paso de los días. También se puede observar que al día 28 la combinación de la cepa P.5.3.A con el medio de precipitación LUC es la que demuestra una mayor resistencia a compresión, mientras que en ese mismo día el medio TSUC muestra la menor resistencia compresión, siendo menor que la resistencia a compresión del blanco. En la Figura No.10, se aprecia la resistencia a compresión de los cubos de concreto al día 28, donde se observa una diferencia notable del aumento de resistencia a compresión entre la combinación de la cepa P.5.3.A con el medio de precipitación LUC y el resto de los tratamientos. Con la información en el Cuadro No. 11 y Cuadro No.12 se evidencia una tendencia de que existe una diferencia significativa de la resistencia a compresión entre las distintas cepas y los distintos medios de precipitación, por lo que la combinación de la cepa P.5.3.A con el medio LUC es la combinación con el mayor aumento de forma significativa a comparación del resto de tratamientos.

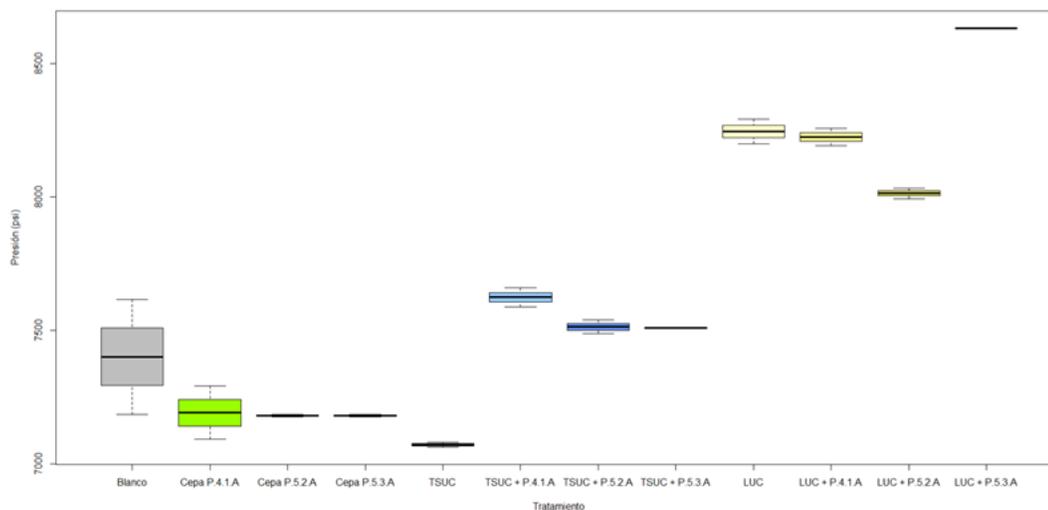
Cuadro 10: Medias de resistencia a compresión de cubos de concreto bajo distintos tratamientos

Tratamiento	Res. al día 1 (psi)	Res. al día 3 (psi)	Res. al día 7 (psi)	Res. al día 28 (psi)
Blanco	3552	5489	6258	7169
Cepa P.4.1.A	3685	5714	6790	7290
Cepa P.5.2.A	3822	5803	6284	7400
Cepa P.5.3.A	3337	5503	5897	7302
TSUC	3850	5508	6613	7039
LUC	4027	6256	6943	8342
TSUC + P.4.1.A	3678	5708	6358	7551
TSUC + P.5.2.A	4109	5606	6979	7228-
TSUC + P.5.3.A	4033	5766	6581	7250
LUC + P.4.1.A	3515	5945	6946	8299
LUC + P.5.2.A	3671	5815	6850	8034
LUC + P.5.3.A	4098	6688	7137	8659*

Descripción: Se puede observar las medias de resistencia a compresión (Res.) de los cubos de concreto en los días 1, 3, 7 y 28 bajo cada uno de los distintos tratamientos. En negrilla se encuentran los tratamientos control. Con un asterisco (*) en superíndice se encuentra el tratamiento con mayor resistencia al día 28 y con un signo menos (-) se encuentra el tratamiento con menor resistencia al día 28.

Fuente: Autoría propia

Figura 10: Resistencia a compresión de cubos de concreto al día 28



Descripción: Se puede observar las medias de resistencia a compresión de los cubos de concreto en el día 28 bajo distintos tratamientos. En gris se observa el blanco. En verde se observan los controles de las cepas, en azul el medio de precipitación TSUC con su control y distintas combinaciones con las cepas y en amarillo el medio de precipitación LUC con su control y distintas combinaciones con las cepas.

Fuente: Autoría propia

Cuadro 11: Comparación estadística de resistencia a compresión de cada cepa según cada medio de precipitación.

Cepa	Comparación	Comparación	Valor-p	Conclusión
P.4.1.A	Control y TSUC	ANOVA/ TukeyHSD	$2.29 * 10^{-11} / 0$	+
	Control y LUC	ANOVA/ TukeyHSD	$2.29 * 10^{-11} / 0$	+
	TSUC y LUC	ANOVA/ TukeyHSD	$2.29 * 10^{-11} / 0$	+
P.5.2.A	Control y TSUC	ANOVA/ TukeyHSD	$1.16 * 10^{-07} /$	+
			$1.30 * 10^{-06}$	
	Control y LUC	ANOVA/ TukeyHSD	$1.16 * 10^{-07} /$	+
			$5.98 * 10^{-05}$	
	TSUC y LUC	ANOVA/ TukeyHSD	$1.16 * 10^{-07} /$	+
			$2.00 * 10^{-07}$	
P.5.3.A	Control y TSUC	ANOVA/ TukeyHSD	$5.42 * 10^{-11} /$	+
			0	
	Control y LUC	ANOVA/ TukeyHSD	$5.42 * 10^{-11} /$	+
0				
TSUC y LUC	ANOVA/ TukeyHSD	$5.42 * 10^{-11} /$	+	
			0.0001549	

Descripción: Se observa la prueba estadística realizada a cada medio de precipitación con las tres distintas cepas, el valor -P resultado de dicha prueba estadística y la conclusión según el valor-P obtenido. En conclusión un símbolo -indica que existe diferencia significativa y un símbolo ÷ indica que no existe diferencia significativa.

Fuente: Autoría propia

Cuadro 12: Comparación estadística de resistencia a compresión de cada medio de precipitación según cada distinta cepa.

Medio de precipitación	Comparación	Comparación	Valor-p	Conclusión
TSUC	P.4.1.A y P.5.2.A	ANOVA/ TukeyHSD	5.38 *10 ⁻⁰⁸ /	+
			0.0000001	
	P.4.1.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	5.38 *10 ⁻⁰⁸ /	+
			0.0000002	
	P.5.2.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	5.38 *10 ⁻⁰⁸ /	+
			0.0219930	
LUC	P.4.1.A y P.5.2.A	ANOVA/ TukeyHSD	1.96 *10 ⁻¹⁰ /	+
			7.00*10 ⁻⁰⁷	
	P.4.1.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	1.96 *10 ⁻¹⁰ /	+
			0	
	P.5.2.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	1.96 *10 ⁻¹⁰ /	+
			0	
Control	P.4.1.A y P.5.2.A	ANOVA/ TukeyHSD	1.41 *10 ⁻¹⁰ /	+
			3.7 *10 ⁻⁰⁶	
	P.4.1.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	1.41 *10 ⁻¹⁰ /	+
			0	
	P.5.2.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	1.41 *10 ⁻¹⁰ /	+
			0	

Descripción: Se observa la prueba estadística realizada a cada cepa según cada medio de precipitación, el valor -P resultado de dicha prueba estadística y la conclusión según el valor-P obtenido. En conclusión un símbolo + indica que existe diferencia significativa y un símbolo - indica que no existe diferencia significativa.

Fuente: Autoría propia

6.3.3. Ensayo de porcentaje de carbonato de calcio calculado a partir de difracción de rayos X

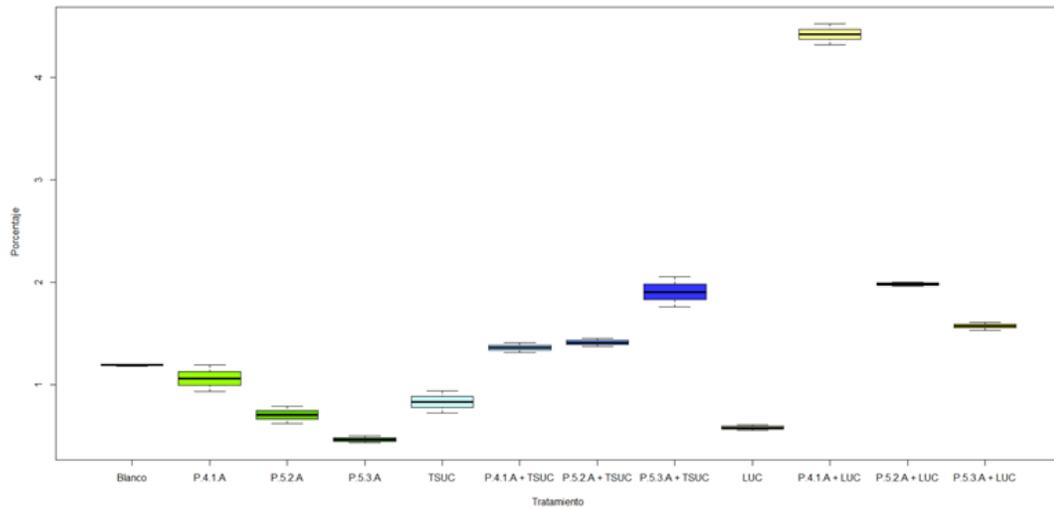
Cuadro 13: Medias de porcentajes de carbonato de calcio obtenidos por difracción de rayos X

Tratamiento	Porcentaje de carbonato de calcio
Blanco	1.21
Cepa P.4.1.A	0.83
Cepa P.5.2.A	0.59
Cepa P.5.3.A	0.82
TSUC	1.02
LUC	0.51
TSUC + P.4.1.A	1.28-
TSUC + P.5.2.A	1.50
TSUC + P.5.3.A	1.74
LUC + P.4.1.A	3.69*
LUC + P.5.2.A	2.71
LUC + P.5.3.A	1.65

Descripción: Se observa la media de los porcentajes de carbonato de calcio obtenidos mediante difracción de rayos X en cada uno de los distintos tratamientos. En negrilla se encuentran los tratamientos control. Con un asterisco (*) en superíndice se encuentra el tratamiento con mayor porcentaje de carbonato de calcio y con un signo menos (-) se encuentra el tratamiento con menor porcentaje de carbonato de calcio.

Fuente: Autoría propia.

Figura 11: Porcentajes de carbonato de calcio obtenidos mediante difracción de rayos X.



Descripción: Se observa la media de los porcentajes de carbonato de calcio obtenidos mediante difracción de rayos X en cada uno de los distintos tratamientos. En gris se observa el blanco. En verde se observan los controles de las cepas, en azul el medio de precipitación TSUC con su control y distintas combinaciones con las cepas y en amarillo el medio de precipitación LUC con su control y distintas combinaciones con las cepas.

Fuente: Autoría propia

En el Cuadro No. 13 se indican los resultados de la prueba de difracción de rayos X de los cubos de concreto bajo distintos tratamientos y el porcentaje de carbonato de calcio encontrado en esta prueba. Se puede observar que la combinación que presenta un mayor porcentaje de carbonato de calcio es la cepa P.4.1.A con el medio de precipitación LUC. También se puede apreciar que los controles presentan un menor porcentaje de carbonato de calcio que el blanco, mientras que todos los tratamientos presentan un aumento. La combinación menos efectiva es la cepa P.4.1.A con el medio de precipitación TSUC. En la Figura No. 11 se puede observar gráficamente los resultados de la prueba de difracción de rayos X para porcentaje de carbonato de calcio en la muestra, donde se observa un claro aumento del porcentaje de carbonato de calcio con la combinación de la cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC sobre el resto de los tratamientos. En el Cuadro No. 14 se puede observar que existe una diferencia significativa del porcentaje de carbonato de calcio entre las distintas cepas con cada distinto medio de precipitación. En el Cuadro No. 16 se puede observar que no existe una diferencia significativa entre la combinación de cepa P.4.1.A y medio TSUC con la combinación de cepa P.5.2.A y medio TSUC, pero entre el resto de los tratamientos existe una diferencia significativa, por lo que la combinación de cepa P.4.1.A con el medio LUC es la combinación con el mayor porcentaje de carbonato de calcio de forma significativa con el resto de los tratamientos.

Cuadro 14: Comparación estadística de porcentaje de carbonato de calcio de cada cepa según cada medio de precipitación.

Cepa	Comparación	Comparación	Valor-p	Conclusión
P.4.1.A	Control y TSUC	ANOVA/ TukeyHSD	2.26 *10 ⁻⁰⁸ / 0.0232075	+
	Control y LUC	ANOVA/ TukeyHSD	2.26 *10 ⁻⁰⁸ /0	+
	TSUC y LUC	ANOVA/ TukeyHSD	2.26 *10 ⁻⁰⁸ / 0.0000001	+
P.5.2.A	Control y TSUC	ANOVA/ TukeyHSD	4.19 *10 ⁻⁰⁷ /	+
			1.06 *10 ⁻⁰⁵	
	Control y LUC	ANOVA/ TukeyHSD	4.19 *10 ⁻⁰⁷ /	+
			5.00 *10 ⁻⁰⁷	
	TSUC y LUC	ANOVA/ TukeyHSD	4.19 *10 ⁻⁰⁷ /	+
			3.79 *10 ⁻⁰⁵	
P.5.3.A	Control y TSUC	ANOVA/ TukeyHSD	2.63 *10 ⁻⁰⁶ /	+
			0.0000025	
	Control y LUC	ANOVA/ TukeyHSD	2.63 *10 ⁻⁰⁶ /	+
			0.0000124	
	TSUC y LUC	ANOVA/ TukeyHSD	2.63 *10 ⁻⁰⁶ /	+
			0.0087777	

Descripción: Se observa la prueba estadística realizada a cada medio de precipitación con las tres distintas cepas, el valor -P resultado de dicha prueba estadística y la conclusión según el valor-P obtenido. En conclusión un símbolo + indica que existe diferencia significativa y un símbolo - indica que no existe diferencia significativa.

Fuente: Autoría propia

Cuadro 15: Comparación estadística de porcentaje de carbonato de calcio de cada medio de precipitación según cada distinta cepa.

Medio de precipitación	Comparación	Comparación	Valor-p	Conclusión
TSUC	P.4.1.A y P.5.2.A	ANOVA/ TukeyHSD	0.000603/	-
			0.7890165	
	P.4.1.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	0.000603/	+
LUC	P.4.1.A y P.5.2.A	ANOVA/ TukeyHSD	0.0008272	+
			0.000603/	
	P.4.1.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	4.76 *10 ⁻⁰⁹ /	+
Control	P.4.1.A y P.5.2.A	ANOVA/ TukeyHSD	0	+
			4.76 *10 ⁻⁰⁹ /	
	P.4.1.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	0	+
Control	P.5.2.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	4.76 *10 ⁻⁰⁹ /	+
			0.0005199	
	P.5.2.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	0.00064/	+
Control	P.4.1.A y P.5.2.A	ANOVA/ TukeyHSD	0.0076971	+
			0.00064/	
	P.4.1.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	0.0005243	+
Control	P.5.2.A y P.5.3.A	ANOVA/ TukeyHSD	0.00064/	+
			0.0426773	

Descripción: Se observa la prueba estadística realizada a cada cepa según cada medio de precipitación, el valor -P resultado de dicha prueba estadística y la conclusión según el valor-P obtenido. En conclusión un símbolo + indica que existe diferencia significativa y un símbolo - indica que no existe diferencia significativa.

Fuente: Autoría propia

6.3.4. Ensayo de microscopía electrónica de barrido de las grietas en cubos de concreto

Cuadro 16: Cantidad de cristales de calcita localizados en SEM bajo distintos tratamientos.

Tratamiento	Cantidad de cristales
Blanco	15
Cepa P.4.1.A	35
Cepa P.5.2.A	12
Cepa P.5.3.A	43
TSUC	08
LUC	23
TSUC + P.4.1.A	63
TSUC + P.5.2.A	18-
TSUC + P.5.3.A	267
LUC + P.4.1.A	124
LUC + P.5.2.A	53
LUC + P.5.3.A	308*

Descripción: Se la cantidad de cristales de calcita localizados en la imagen de microscopía electrónica de barrido para los cubos de concreto bajo distintos tratamientos. En negrilla se encuentran los tratamientos control. Con un asterisco (*) en superíndice se encuentra el tratamiento con mayor cantidad de cristales de calcita y con un signo menos (-) se encuentra el tratamiento con menor cantidad de cristales de calcita.

Fuente: Autoría propia

En el Cuadro No. 16 se observa el conteo de cristales de calcita en las imágenes de microscopía electrónica de barrido que se obtuvieron de cada grieta. Estos cristales se reconocieron por su forma cuboidea rectangular y se confirmó su identidad como carbonato de calcio mediante espectroscopía de fluorescencia. Se puede observar que la combinación con una mejor producción de cristales de calcita fue la cepa P.5.3.A con el medio de precipitación LUC.

6.3.5. Ensayo en laboratorio de titulación para suplementación de medios de precipitación

Cuadro 17: Medias de controles en ensayo de titulación para concentración de carbonato de calcio en medios de precipitación con suplementación

Tratamiento	[CaCO ₃] en día 1 (g/mL)	[CaCO ₃] en día 3 (g/mL)	[CaCO ₃] en día 7 (g/mL)	[CaCO ₃] en día 15 (g/mL)	[CaCO ₃] en día 28 (g/mL)
Blanco	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Cepa P.4.1.A	0.0014	0.0017	0.0041	0.0076	0.0148
Cepa P.4.1.A + Ba	0.0015	0.0018	0.0043	0.0080	0.0155
Cepa P.4.1.A + Cit	0.0015	0.0017	0.0041	0.0076	0.0148
Cepa P.4.1.A + Ni	0.0015	0.0018	0.0042	0.0078	0.0152
Cepa P.5.2.A	0.0010	0.0012	0.0029	0.0054	0.0104
Cepa P.5.2.A + Ba	0.0012	0.0015	0.0035	0.0065	0.0127
Cepa P.5.2.A + Cit	0.0011	0.0014	0.0032	0.0059	0.0115
Cepa P.5.2.A + Ni	0.0010	0.0013	0.0029	0.0055	0.0106
Cepa P.5.3.A	0.0016	0.0019	0.0045	0.0084	0.0163
Cepa P.5.3.A + Ba	0.0017	0.0020	0.0047	0.0088	0.0171
Cepa P.5.3.A + Cit	0.0016	0.0019	0.0045	0.0084	0.0162
Cepa P.5.3.A + Ni	0.0016	0.0019	0.0045	0.0084	0.0163
TSUC	0.0022	0.0026	0.0061	0.0115	0.0223
TSUC + Ba	0.0020	0.0024	0.0056	0.0104	0.0202
TSUC + Cit	0.0020	0.0024	0.0056	0.0104	0.0202
TSUC + Ni	0.0019	0.0023	0.0054	0.0102	0.0197
LUC	0.0012	0.0014	0.0034	0.0063	0.0123
LUC + Ba	0.0012	0.0015	0.0034	0.0064	0.0124
LUC + Cit	0.0012	0.0014	0.0033	0.0062	0.0119
LUC + Ni	0.0012	0.0014	0.0033	0.0062	0.0119

Descripción: Se puede observar las medias de los controles del ensayo de concentración de carbonato de calcio en medios de precipitación suplementados en los días 1, 3, 7, 15 y 28 bajo cada uno de los distintos tratamientos.

Fuente: Autoría propia

En el Cuadro No. 17 se observa las medias de los controles del ensayo de titulación. Se puede observar cómo aumenta la concentración de carbonato de calcio conforme el paso de los días, lo que es coherente con el proceso de cristalización. También se debe recalcar que el control con mayor concentración de carbonato de calcio en el día 28 es el medio de precipitación TSUC. En el Cuadro No. 18 se pueden observar las medias del ensayo de titulación por parte de los tratamientos. Se puede observar que sigue el mismo patrón que en el Cuadro No. 19 de controles, que aumenta la concentración con el paso de los días. También se observa que la combinación con una mayor concentración de carbonato de calcio al día 28 es la cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC suplementado con Bario con una concentración final de 0.1018g/mL de CaCO₃ y la combinación con menor concentración al día 28 fue la cepa P.5.2.A con el medio de precipitación TSUC suplementado con citrato con una concentración final de 0.0147g/mL de CaCO₃. En los Cuadros No. 19 y No. 20 se pueden observar las pruebas estadísticas que dieron una diferencia significativa entre los tratamientos. La combinación de la cepa P.5.3.A con el medio LUC suplementado con Bario presentó una mayor concentración de carbonato de calcio al día 28. Esta concentración fue significativamente mayor a la de los controles tanto de LUC como los controles de la cepa P.5.3.A, pero no fue significativamente mayor que las combinaciones de cepa P.5.3.A con LUC sin suplementar. En la Figura No. 12 se representa la comparación de las titulaciones de tratamientos con la cepa P.4.1.A, en la Figura No. 13, la comparación de tratamientos con P.5.2.A y en la Figura No.14 la comparación de tratamientos con la cepa P.5.3.A. En la Figura No. 15 se comparan los tratamientos con el medio de precipitación LUC y en la Figura No. 16 se comparan los tratamientos con TSUC como medio de precipitación.

Cuadro 18: Medias de tratamientos en ensayo de titulación para concentración de carbonato de calcio en medios de precipitación con suplementación

Tratamiento	[CaCO ₃] en día 1 (g/mL)	[CaCO ₃] en día 3 (g/mL)	[CaCO ₃] en día 7 (g/mL)	[CaCO ₃] en día 15 (g/mL)	[CaCO ₃] en día 28 (g/mL)
TSUC + P.4.1.A	0.0035	0.0042	0.0098	0.0183	0.0354
TSUC + P.4.1.A + Ba	0.0048	0.0058	0.0136	0.0254	0.0493
TSUC + P.4.1.A + Cit	0.0041	0.0050	0.0116	0.0218	0.0422
TSUC + P.4.1.A + Ni	0.0040	0.0047	0.0111	0.0208	0.0403
TSUC + P.5.2.A	0.0023	0.0027	0.0064	0.0120	0.0233
TSUC + P.5.2.A + Ba	0.0021	0.0025	0.0059	0.0111	0.0215
TSUC + P.5.2.A + Cit	0.0014	0.0017	0.0041	0.0076	0.0147
TSUC + P.5.2.A + Ni	0.0020	0.0024	0.0057	0.0106	0.0206
TSUC + P.5.3.A	0.0068	0.0081	0.0190	0.0355	0.0689
TSUC + P.5.3.A + Ba	0.0080	0.0095	0.0223	0.0418	0.0810
TSUC + P.5.3.A + Cit	0.0061	0.0073	0.0172	0.0321	0.0623
TSUC + P.5.3.A + Ni	0.0090	0.0108	0.0252	0.0471	0.0914
LUC + P.4.1.A	0.0054	0.0065	0.0152	0.0285	0.0553
LUC + P.4.1.A + Ba	0.0084	0.0101	0.0236	0.0442	0.0857
LUC + P.4.1.A + Cit	0.0055	0.0066	0.0154	0.0288	0.0559
LUC + P.4.1.A + Ni	0.0052	0.0062	0.0145	0.0271	0.0526
LUC + P.5.2.A	0.0022	0.0026	0.0061	0.0114	0.0221
LUC + P.5.2.A + Ba	0.0024	0.0028	0.0066	0.0124	0.0240
LUC + P.5.2.A + Cit	0.0021	0.0025	0.0060	0.0111	0.0216
LUC + P.5.2.A + Ni	0.0021	0.0025	0.0059	0.0111	0.0215
LUC + P.5.3.A	0.0088	0.0106	0.0247	0.0462	0.0897
LUC + P.5.3.A + Ba	0.0100	0.0120	0.0280	0.0525	0.1018
LUC + P.5.3.A + Cit	0.0092	0.0110	0.0258	0.0482	0.0935
LUC + P.5.3.A + Ni	0.0090	0.0108	0.0252	0.0471	0.0914

Descripción: Se puede observar las medias de los tratamientos del ensayo de concentración de carbonato de calcio en medios de precipitación suplementados en los días 1, 3, 7, 15 y 28 bajo cada uno de los distintos tratamientos. En negrilla se encuentran los tratamientos con mayor y menor concentración de carbonato de calcio al día 28.

Fuente: Autoría propia

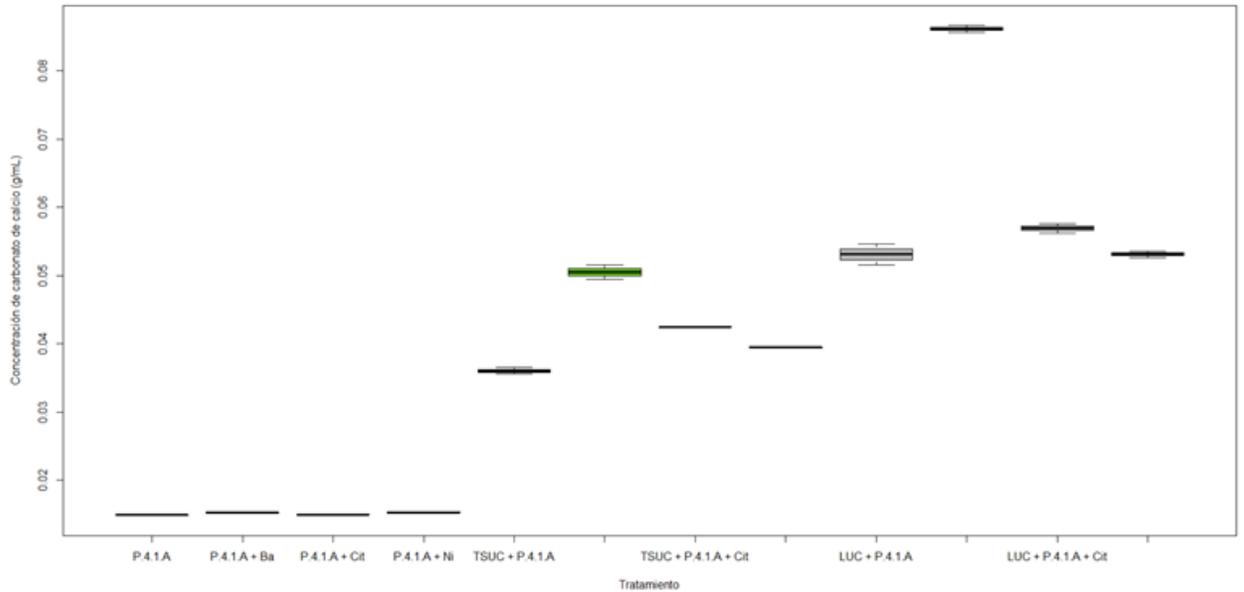
Cuadro 19: Comparación estadística de porcentaje de carbonato de calcio de cada cepa según cada medio de precipitación.

Cepa	Comparación	Comparación	Valor-p	Conclusión
P.4.1.A	Control y	Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	0.0003078/ 0.01124123	+
	LUC + Ba			
	Control y	Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	0.0003078/ 0.04148651	+
	LUC + Cit			
Control + Cit y LUC + Ba		Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	0.0003078/ 0.02359517	+
P.5.2.A	Control y	Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	0.0003473/ 0.008198209	+
	LUC + Ba			
	Control + Ni y		Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	0.0003473/ 0.031540391
P.5.3.A	Control y	Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	0.0003252/ 0.02043138	+
	LUC + Ba			
	Control + Cit y LUC + Ba		Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	0.0003252/ 0.03885561
Control + Ni y LUC + Ba		Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	0.0003252/ 0.03825783	+

Descripción: Se observa la prueba estadística realizada a cada medio de precipitación con las tres distintas cepas, el valor -P resultado de dicha prueba estadística y la conclusión según el valor-P obtenido. Se incluyen únicamente las pruebas con diferencia significativa. En conclusión un símbolo + indica que existe diferencia significativa y un símbolo - indica que no existe diferencia significativa.

Fuente: Autoría propia

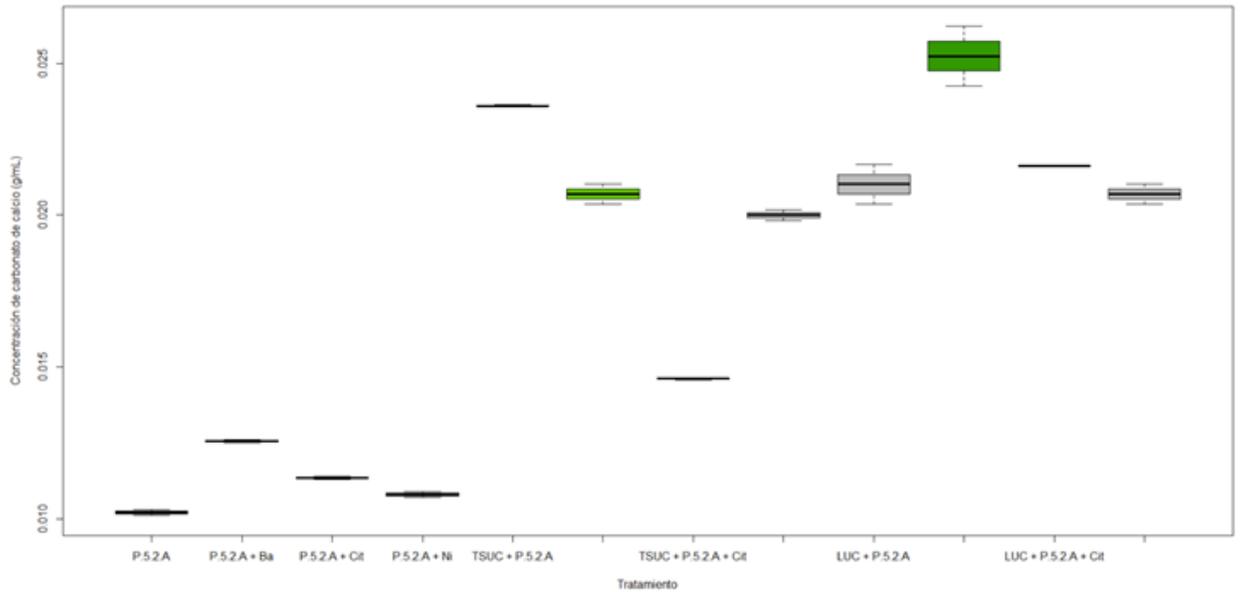
Figura 12: Concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con la cepa P.4.1.A



Descripción: Se observa el diagrama de caja y bigotes de la concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con la cepa P.4.1.A.

Fuente: Autoría propia

Figura 13: Concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con la cepa P.5.2.A



Descripción: Se observa el diagrama de caja y bigotes de la concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con la cepa P.5.2.A.

Fuente: Autoría propia

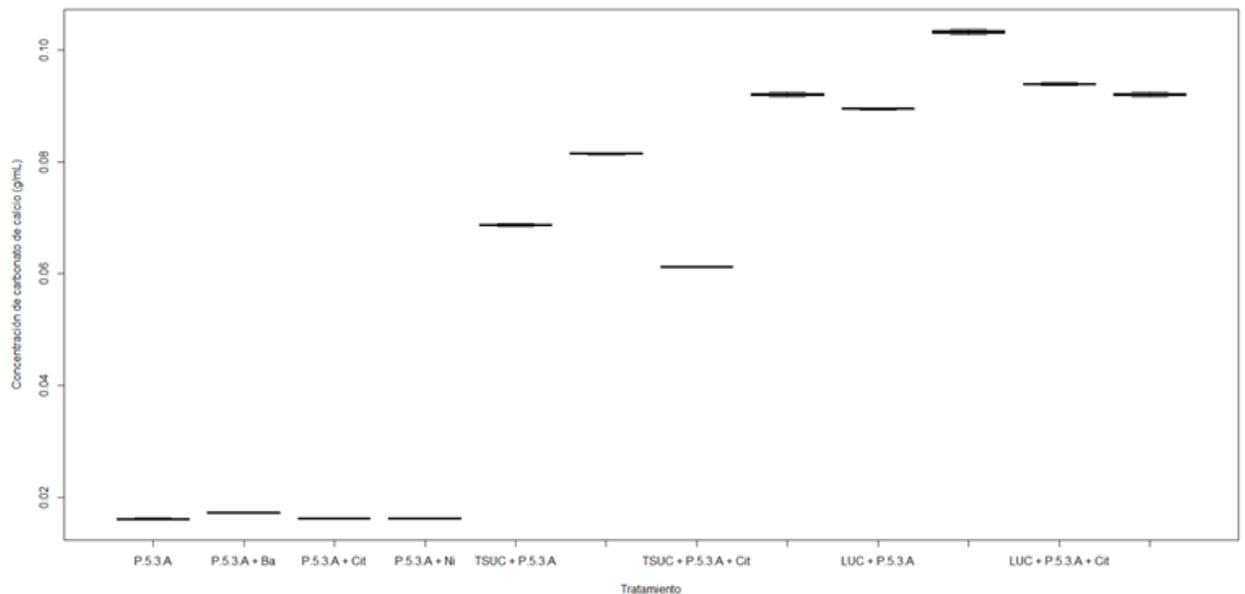
Cuadro 20: Comparación estadística de porcentaje de carbonato de calcio de cada medio de precipitación según cada distinta cepa.

Cepa	Comparación	Comparación	Valor-p	Conclusión
TSUC	P.5.2.A + Cit y P.5.3.A + Ba	Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	4.81 *10-05/	+
			0.028333663	
	P.5.2.A + Cit y P.5.3.A + Ni	Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	4.81 *10-05/	+
			0.009891961	
LUC	Control y P.5.3.A + Ba	Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	4.271 *10-05 /	+
			0.009905181	
	Control + Cit y P.5.3.A + Ba		Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	
	Control y P.5.3.A + Cit	Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	4.271 *10-05 /	+
			0.028128509	
	P.5.2.A y		Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	
Control	P.5.3.A + Ba	Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	0.008124224	+
			0.0003321 /	
	P.5.2.A + Ni y P.5.3.A + Ba		Kruskal Wallis/ Prueba de Dunn	

Descripción: Se observa la prueba estadística realizada a cada cepa según cada medio de precipitación, el valor -P resultado de dicha prueba estadística y la conclusión según el valor-P obtenido. En conclusión un símbolo + indica que existe diferencia significativa y un símbolo - indica que no existe diferencia significativa.

Fuente: Autoría propia

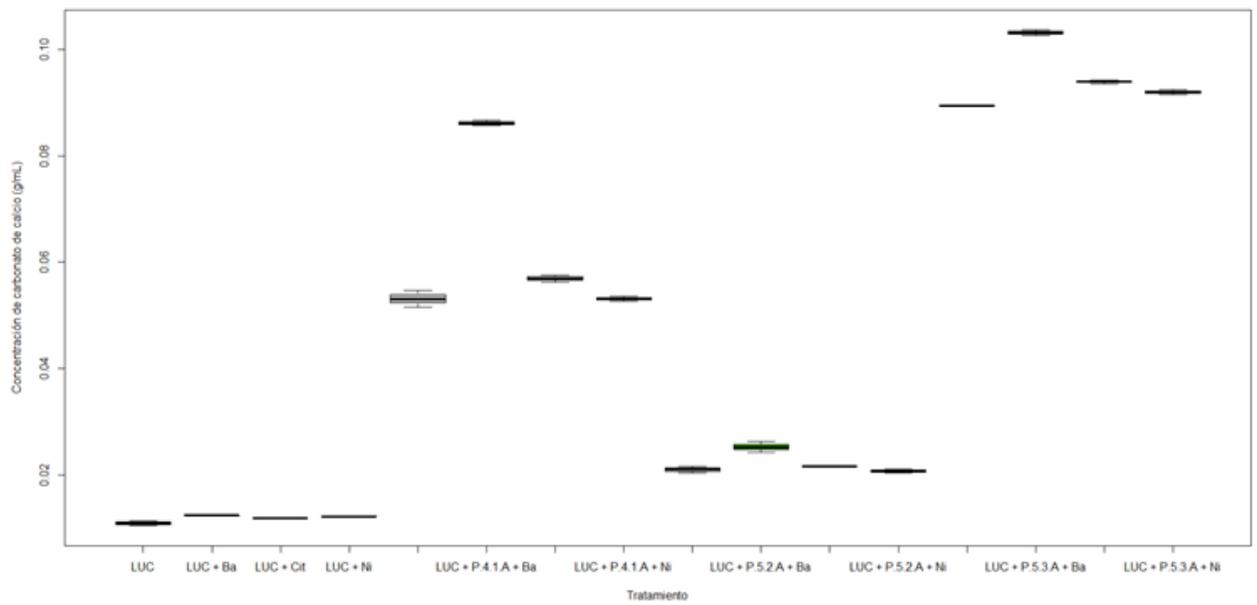
Figura 14: Concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con la cepa P. 5.3.A



Descripción: Se observa el diagrama de caja y bigotes de la concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con la cepa P.5.3.A.

Fuente: Autoría propia

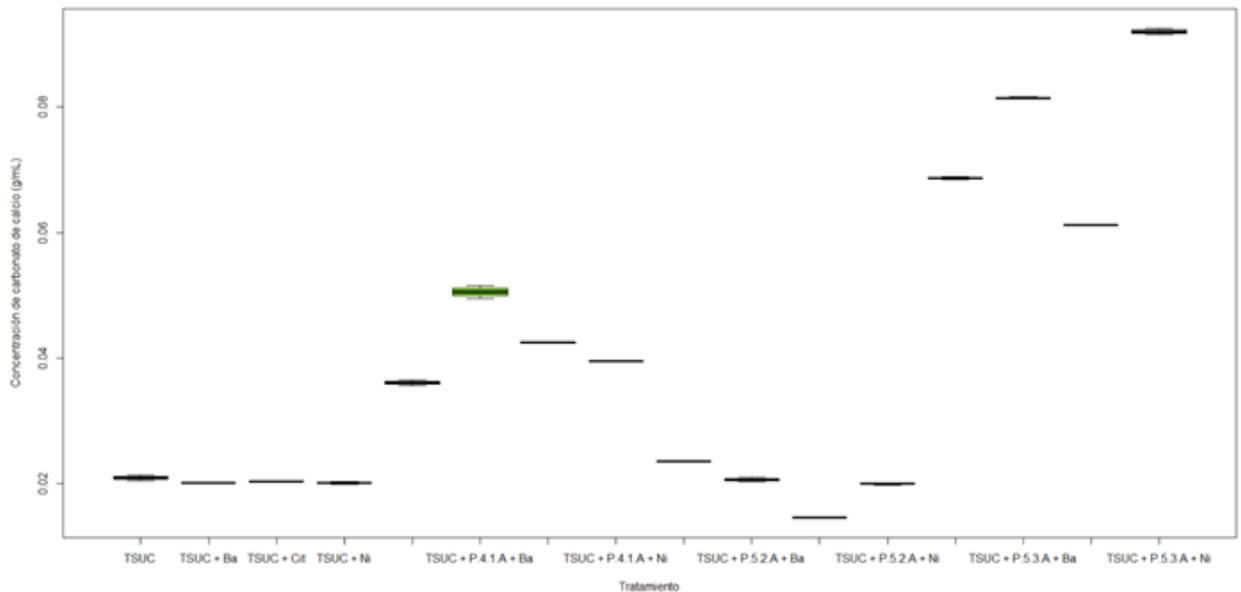
Figura 15: Concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con el medio de precipitación LUC



Descripción: Se observa el diagrama de caja y bigotes de la concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con el medio de precipitación LUC.

Fuente: Autoría propia

Figura 16: Concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con el medio de precipitación TSUC



Descripción: Se observa el diagrama de caja y bigotes de la concentración de carbonato de calcio titulada en los tratamientos con el medio de precipitación TSUC.

Fuente: Autoría propia

6.3.6. Índice para optimización de la producción de calcita

Cuadro 21: Índice para optimización de producción de calcita

Tratamiento	% por difracción de rayos X	% por SEM	% por titulación	Índice
Blanco	32.79	4.87	0.00	0.13
Cepa P.4.1.A	22.49	11.36	39.46	0.24
Cepa P.5.2.A	15.99	3.90	11.59	0.10
Cepa P.5.3.A	22.22	13.96	18.17	0.18
TSUC	27.64	2.60	24.86	0.18
LUC	13.82	7.47	13.71	0.12
TSUC + P.4.1.A	34.69	20.45	39.46	0.32
TSUC + P.5.2.A	40.65	5.84	25.98	0.24-
TSUC + P.5.3.A	47.15	86.69	76.81	0.70
LUC + P.4.1.A	100.00	40.25	61.65	0.67
LUC + P.5.2.A	73.44	17.21	24.64	0.38
LUC + P.5.3.A	44.72	100.00	100.00	0.82*

Descripción: Se observa la media de los porcentajes de carbonato de calcio obtenidos mediante difracción de rayos X en cada uno de los distintos tratamientos. En negrilla se encuentran los tratamientos control. Con un asterisco (*) en superíndice se encuentra el tratamiento con mayor índice de producción de calcita y con un signo menos (-) en superíndice se encuentra el tratamiento con menor índice de producción de calcita.

Fuente: Autoría propia

En el Cuadro No. 21 se observan los parámetros para el índice de producción de calcita. Se puede observar que la combinación con el mayor índice de producción de calcita es la cepa P.5.3.A con el

medio de precipitación LUC, obteniendo un índice de 0.82 sobre 1. La combinación con el menor índice de producción de calcita es el control de la cepa P.5.2.A, con un índice de 0.1 sobre 1.

Prueba de concepto para cubos de concreto en seco

En el Cuadro No. 22 se observan los resultados de las pruebas a cubos de concreto en seco, es decir, sin sumergir en medio de precipitación. Comparando con lo observado en el Cuadro No. 6 se observa que el porcentaje de reparación de grietas es menor que los tratamientos sumergidos en medio de precipitación, pero sigue siendo mayor que los controles. Al observar el Cuadro No. 13 se puede comparar que se tiene un porcentaje de carbonato de calcio menor que los tratamientos sumergidos pero mayor que los controles. Por último, según el Cuadro No. 16 se puede observar el mismo comportamiento, una menor cantidad de cristales de calcita que los tratamientos sumergidos, pero una mayor cantidad que los controles.

Cuadro 22: Resultados prueba de concepto en cubos de concreto en seco.

Ensayo	Resultado
Reparación de grietas	14.55 %
Difracción de rayos X	1.19 %
SEM	17

Descripción: Se observan los resultados de las pruebas realizadas con el cubo de concreto en seco.

Fuente: Autoría propia

Análisis de resultados

El objetivo principal de este trabajo fue optimizar la producción de carbonato de calcio en cubos de concreto por tres cepas del género *Lysinibacillus* sp. aisladas de una cantera cementera, para facilitar su aplicación a nivel industrial en la formación de bioconcreto. Para poder llevar a cabo este análisis, primero se buscó identificar la especie de los sujetos de estudio utilizando una batería bioquímica, cuyos resultados se pueden observar en el Cuadro No. 3 en la sección de Resultados. Las tres cepas bacterianas son móviles, dieron positivo en la prueba de oxidasa y fijan nitrógeno. Además, se puede observar que las cepas dieron positivo en la producción de amoníaco, este resultado se esperaba debido a que la ruta de producción de carbonato de calcio que utiliza el género *Lysinibacillus* es hidrólisis de urea, la cual genera amoníaco al hidrolizar la urea en amoníaco y carbamato. Se puede observar en el Cuadro No. 3 que la cepa P.5.3.A solubiliza fosfatos a diferencia de las cepas P.4.1.A y P.5.2.A. De acuerdo con los resultados de esta batería bioquímica se puede clasificar que las tres cepas son *Lysinibacillus sphaericus*. Se puede observar en la Figura No. 7, en el perfil plasmídico, que las cepas tienen diferentes plásmidos, según las distintas bandas que se observan en la electroforesis. Esto comprueba que, a pesar de ser la misma especie, los sujetos de estudio son distintas cepas (Hashmi y cols., 2020; Morales, 2020).

Una vez caracterizadas las cepas bacterianas; y previo a las pruebas de bioconcreto, se debía optimizar la producción y recuperación de esporas bacterianas de cada cepa según sus curvas de crecimiento en tripticasa soya, en escala menor a un litro. Se puede observar, en la Figura No. 8, que la cepa P.5.2.A tiene un tiempo de duplicación mayor a las cepas P.4.1.A y P.5.3.A, pero que la fase estacionaria de las tres cepas ocurre entre los 330 a 360 minutos después de la inoculación inicial, lo que nos indica que, a pesar de que el tiempo de duplicación de la cepa P.5.2.A es mayor, la capacidad de carga del sistema es similar para las tres cepas. Se evidencia en el Cuadro No. 4, la cinética del crecimiento bacteriano de las tres cepas, donde se puede observar que la cepa P.5.3.A tiene la mayor capacidad de carga del sistema, lo que indica una capacidad de contener una mayor cantidad de células a pesar de que tener un tiempo de duplicación menor a P.5.2.A. Una vez estipulado el inicio de la fase estacionaria, estableció que el momento para flocular y producir esporas es a los 300 minutos de la inoculación inicial, debido a que al comenzar la fase estacionaria las células comienzan a esporular y morir según la cantidad de nutrientes en el medio, lo que disminuye el número de esporas viables producidas (Maier y Pepper, 2015). Se puede observar en el Cuadro No. 5 que, posterior al proceso de producción de esporas por choque térmico, floculación y centrifugación, la

cepa P.4.1.A es la que contiene una mayor cantidad de esporas recuperadas, lo que conlleva un menor peso de esporas necesario por pulgada cúbica de concreto, en cambio la cepa P.5.2.A es la cepa que requiere mayor peso por volumen de concreto. Esto quiere decir que la cepa P.4.1.A es la cepa con mejor rendimiento en la producción de esporas y tendría una mayor facilidad para adaptarse a una producción industrial para aplicación de bioconcreto. Para la separación de las esporas viables del debris celular se recomienda disolver el precipitado de la primera centrifugación en una solución de sacarosa al 50 % y centrifugar nuevamente a 4000 x g por 20 minutos a 4°C, donde las esporas quedarán purificadas en el precipitado (Edwards y McBride, 2016). Cabe resaltar que la cepa P.5.2.A se encuentra en fase estacionaria al transcurrir 300 minutos posterior a la inoculación inicial. Esta diferencia de fase con las otras dos cepas puede explicar las diferencias en esporas recuperadas y su eficiencia en los ensayos posteriores. Debido a lo anterior se recomienda repetir los ensayos de producción de carbonato de calcio con la cepa P.5.2.A, realizando la esporulación previo a los 300 minutos.

En la optimización de la producción de producción de carbonato de calcio de las cepas bacterianas se realizaron cinco ensayos para observar el comportamiento de las distintas combinaciones de cepas bacterianas y medios de precipitación en características del bioconcreto como autorreparación, aumento de resistencia a compresión y cantidad de carbonato de calcio en la mezcla. El primer ensayo se basa en la capacidad de reparación de grietas de cubos de concreto. En el Cuadro No.6, se puede observar que el blanco no tuvo reparación de grietas, como cabe esperar del concreto convencional. También, se puede observar que los controles, tanto de cepas como de medios de precipitación tienen un menor porcentaje de reparación de grietas que las combinaciones que forman bioconcreto. El medio sin bacterias presenta un porcentaje de reparación de grietas debido a la precipitación de cristales, correspondiente a la interacción química de los componentes de los medios de precipitación con el agua, esta mineralización es química y no biológica.

El tratamiento más eficaz en la reparación de grietas fue la combinación del medio de precipitación LUC con la cepa bacteriana P.5.3.A. Se puede observar en la Figura No. 9, y comprobar con los Cuadros No. 7, 8 y 9, que mientras existe una diferencia significativa entre los tratamientos de las cepas P.4.1.A y P.5.3.A comparándolos con P.5.2.A, en ambos medios, no existe diferencia significativa entre las cepas P.4.1.A y P.5.3.A, en ninguno de los dos medios de precipitación. También es importante mencionar que existe diferencia entre las mismas cepas al cambiar de medio.

Esto se debe a que el medio TSUC, al tener tripticasa soya en su preparación, favorece la producción de mayor cantidad de células bacterianas, lo que genera más sitios de nucleación para la creación de carbonato de calcio, pero mantiene activas otras vías celulares, que gastan energía en diferentes funciones que no son producir CaCO_3 . Por otro lado, el medio de precipitación LUC al contener únicamente urea y cloruro de calcio como nutrientes enfoca la maquinaria celular en la producción de carbonato de calcio y es necesario agregar mayor cantidad de esporas para mantener el número de sitios de nucleación. Sin embargo, aunque estadísticamente no exista una diferencia significativa en el tratamiento con TSUC y con LUC, se debe recalcar que la reparación de grietas con TSUC tuvo inconvenientes, que podrían afectar su implementación a gran escala como una tinción con color amarillo o el desprendimiento de un olor desagradable, causado por posibles subproductos producidos por las bacterias. Se observa que la utilización de medio de precipitación LUC no únicamente optimiza la producción de carbonato de calcio en las cepas bacterianas, sino también evita los inconvenientes mencionados anteriormente.

El segundo ensayo fue el de resistencia a compresión. En este ensayo como se puede observar en el Cuadro No. 10 se puede observar que la resistencia a la compresión aumenta conforme el paso de los días, esto se debe al proceso de curado del concreto. En este proceso el concreto mantiene la humedad adecuada dentro de un rango de temperatura para ayudar a la hidratación del concreto. La resistencia a compresión de 28 días es cuando el concreto alcanza el 70 % de la resistencia total del concreto (Li, Fu, Zhang, Achal, y Kawasaki, 2015). El aumento de la resistencia a compresión en los tratamientos que involucran el medio TSUC se puede deber a que el crecimiento bacteriano rellena poros, de forma que se resiste mejor a la compresión al tener menos aire en el interior del

cubo de concreto.

También se observa que el medio de precipitación LUC y los tratamientos con LUC presentan un mayor aumento de resistencia a compresión. Esto se puede deber, no solo al llenado de poros, ya que no existe interacción con compuestos orgánicos como en TSUC, sino que también se genera una mayor cantidad de CaCO_3 con LUC. Este aumento en calcita, rellena poros también, cerrando aún más espacio en los cubos de concreto, generando una mayor resistencia a compresión. Se puede observar en los Cuadros No. 11 y 12 que existe una diferencia significativa entre las cepas y entre los medios de precipitación, por lo que la combinación con una mayor resistencia a compresión estadísticamente hablando es la utilización de la cepa P.5.3.A con el medio de precipitación LUC.

El tercer ensayo fue el cálculo de carbonato de calcio en los cubos de concreto utilizando difracción de rayos X, como se puede observar en el Cuadro No. 13. De acuerdo con la Figura No. 11 los controles tienen una menor cantidad de carbonato de calcio que el blanco. Esto se puede deber a que se agregan otros componentes, que disminuyen el porcentaje que ocupa el carbonato de calcio en el total de los componentes del cubo de concreto. Pero los tratamientos aumentan la cantidad, de acuerdo con lo esperado. Como se observa en los Cuadros No. 14 y 15 existe una diferencia significativa entre las distintas cepas y los dos medios de precipitación. Los tratamientos con el medio de precipitación LUC tiene una mayor cantidad de carbonato de calcio que los tratamientos con TSUC, esto se debe a que se enfocó la maquinaria celular en la producción de carbonato de calcio con este medio de precipitación, por lo que los distintos sitios de nucleación se enfocan en la producción de este mineral, sin utilizar energía celular para la división celular o síntesis de otros subproductos que no son de interés para el bioconcreto. Esta última premisa se enfatiza con los resultados que muestran que la combinación con una mayor cantidad de carbonato de calcio es P.4.1.A con el medio de precipitación LUC (Figura No. 11).

El cuarto ensayo realizado fue la observación en microscopía electrónica de barrido de secciones de los cubos de concreto con reparación de grietas del primer ensayo. Como se observa en la Figura No. 14, el control de TSUC tiene una menor cantidad de cristales de calcita según lo observado, esto coincide con lo observado en el tercer ensayo, esto se debe a que otros compuestos orgánicos toman el lugar del carbonato de calcio y se tiene una menor probabilidad de encontrar cristales de calcita en la grieta sellada. Se puede observar también que se tiene una menor cantidad de cristales de calcita con la combinación LUC + P.4.1.A que con LUC + P.5.3.A, lo que contradice lo observado en el tercer ensayo. Esto se debe a que el cuarto ensayo detecta cristales de calcita, uno de los polimorfos de carbonato de calcio, mientras que en el tercer ensayo se toman en cuenta todos los polimorfos de carbonato de calcio. La combinación que generó una mayor cantidad de calcita es el medio de precipitación LUC con la cepa P.5.3.A.

El quinto ensayo fue realizado para la optimización de los medios de precipitación. Se puede observar, en los Cuadros No. 17 y No. 18, que existe un aumento en la concentración de carbonato de calcio con el paso de los días, esto se debe a que sigue ocurriendo el proceso de cristalización y que se tienen otros sitios de nucleación donde se genera el CaCO_3 . Se puede observar que los controles tienen una menor cantidad de carbonato de calcio que los tratamientos, según lo esperado, pero presentan una cantidad de carbonato de calcio, esto se puede deber, ya sea por la actividad de la ureasa en los controles de cepas bacterianas o por la precipitación de minerales por reacción química en los controles de los medios de precipitación. En los tratamientos se puede observar un constante aumento de cantidad de carbonato de calcio al utilizar hidróxido de bario, esto se puede deber a que el hidróxido de bario aumenta la actividad de la ureasa, produciendo una mayor cantidad de CaCO_3 . No se observa un aumento considerable o significativo en los tratamientos con níquel o con citrato de calcio. Esto se puede deber a que *Lysinibacillus sphaericus* no tiene un transportador de níquel hacia el citoplasma lo que acumula el níquel en el medio causando toxicidad y un efecto bactericida, disminuyendo el número de células que pueden producir carbonato y que actúan como sitios de nucleación (Morales, 2020). El citrato pudo encontrarse en una concentración demasiado baja y de hecho diluir los sustratos para producción de carbonato de calcio (Morales, 2020). En los Cuadros No. 19 y 20, se observan los tratamientos que tienen una diferencia significativa. El tratamiento con

una mayor cantidad de carbonato por gramo es la combinación de la cepa P.5.3.A con el medio de precipitación LUC, suplementado con hidróxido de bario.

En el Cuadro No. 21 se puede observar el índice de optimización de la producción de calcita por los distintos tratamientos en los ensayos de difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido y titulación en laboratorio. De acuerdo con los ensayos realizados, la combinación de la cepa P.5.3.A con el medio de precipitación LUC es la combinación con mejor índice para producción de calcita, por lo que es la recomendación para el uso en bioconcreto a escala industrial.

En paralelo se realizaron los ensayos de reparación de grietas, difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido con un cubo que en lugar de encontrarse sumergido en medio de precipitación por 18 días y en agua por 12 días solo se humedeció regularmente para activar las esporas bacterianas. Este cubo tenía la combinación de P.5.3.A con LUC, debido a que esta combinación mostró los mejores resultados en los ensayos anteriores. Se puede observar en el Cuadro No. 20 que este cubo tiene un mejor porcentaje de reparación de grietas, un menor porcentaje de carbonato de calcio y un menor número de cristales de calcita en SEM que el tratamiento de P.5.3.A y LUC sumergido. Esto indica que el sumergir los tratamientos en medio de precipitación y agua ayuda a la producción de carbonato de calcio y a la activación de esporas, pero que, sí existe activación de esporas y producción de CaCO_3 en el bioconcreto, por lo que es un tratamiento viable en la utilización en construcciones a escala industrial, introduciendo las esporas desde la mezcla de concreto.

Para la aplicación industrial de bioconcreto se recomienda realizar la secuenciación del genoma completo de las cepas P.4.1.A y P.5.3.A para confirmar su identidad y poder depositarlas en un repositorio, con la posibilidad de mejorar la producción de carbonato de calcio mediante modificación genética de estas cepas. Se recomienda también realizar una prueba de concepto con el medio de precipitación LUC suplementado con hidróxido de bario en cubos de concreto para observar cómo se comporta el medio de precipitación suplementado en cubos de concreto. Finalmente se recomienda investigar una formulación que permita aplicar las esporas con medio de precipitación en construcciones establecidas. Dicha formulación debe mantener la humedad y el contacto con el medio de precipitación de las esporas, para simular los porcentajes de los ensayos de los tratamientos sumergidos.

1. El medio de choque térmico, floculación y centrifugación es un método eficiente de formación y recuperación de esporas para la producción de bioconcreto.
2. En cuanto a reparación de grietas, aunque no existe una diferencia significativa entre los medios de precipitación, la combinación con mayor porcentaje y la recomendada para producción de bioconcreto es la cepa P.5.3.A con el medio de precipitación LUC.
3. La combinación de la cepa P.5.3.A con LUC presenta la mayor resistencia a compresión dentro de los tratamientos realizados.
4. El tratamiento de cepa P.4.1.A con LUC presenta el mayor porcentaje de carbonato de calcio dentro de los tratamientos realizados.
5. La combinación de la cepa P.5.3.A con el medio de precipitación LUC tiene el mayor índice de optimización de precipitación de calcita dentro de los tratamientos realizados.
6. La suplementación de los medios de precipitación con hidróxido de bario optimiza la producción de carbonato de calcio en todos los tratamientos realizados.
7. El tratamiento con P.5.3.A y el medio de precipitación LUC presenta una reparación de grietas, porcentaje de carbonato de calcio y cristales de calcita menor sin estar sumergidos en medio de precipitación, pero presenta actividad, por lo que es un tratamiento viable en construcciones a escala industrial.
8. La combinación de la cepa P.5.3.A y el medio de precipitación LUC es el tratamiento recomendable para la fabricación de bioconcreto según los ensayos realizados.

Recomendaciones

1. Se recomienda realizar una secuenciación genómica de las cepas P.4.1.A y P.5.3.A para poder confirmar la especie de ambas cepas y poder depositarlas en un repositorio.
2. Se recomienda realizar los ensayos de precipitación de carbonato de calcio con la cepa P.5.2.A esporulando previo a 300 minutos después de inoculación inicial, para observar su comportamiento en fase exponencial.
3. Se recomienda realizar pruebas de concepto en cubos de concreto con el medio de precipitación LUC suplementado con Bario para observar cómo se comporta el bioconcreto con esta suplementación.
4. Se recomienda la purificación de las esporas mediante lavados en sacarosa y centrifugación.
5. Se recomienda la formulación de un medio de crecimiento para las cepas bacterianas a base de desechos industriales para economizar la producción de esporas.
6. Se recomienda la formulación de un producto que pueda aplicar el medio de precipitación LUC y la cepa P.5.3.A a construcciones formadas, de forma que mantenga la humedad y contacto del medio de precipitación con las esporas.

Referencias

- Achal, V., Mukherjee, A., Kumari, D., y Zhang, Q. (2015). Biomineralization for sustainable construction—a review of processes and applications. *Earth-science reviews*, 148, 1–17.
- Adolphe, J., Loubière, J., Paradas, J., y Soleilhavoup, F. (1990). Procédé de traitement biologique d’une surface artificielle. *European patent 90400G97. 0 (after French patent 8903517, 1989)*.
- Al-Thawadi, S. M. (2011). Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand. *J. Adv. Sci. Eng. Res*, 1(1), 98–114.
- Anbu, P., Kang, C.-H., Shin, Y.-J., y So, J.-S. (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *Springerplus*, 5(1), 1–26.
- Basta, M., y Annamaraju, P. (2020). Bacterial spores.
- Benavides, G., y Hermida, A. (2008). Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los páramos cruz verde y guasca (cundinamarca). *Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al Título de Ingeniero en Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Ciudad Bogotá, Colombia*.
- Castro-Alonso, M. J., Montañez-Hernandez, L. E., Sanchez-Muñoz, M. A., Macias Franco, M. R., Narayanasamy, R., y Balagurusamy, N. (2019). Microbially induced calcium carbonate precipitation (micp) and its potential in bioconcrete: Microbiological and molecular concepts. *Frontiers in Materials*, 6, 126.
- Chaparro-Acuña, S. P., Becerra-Jiménez, M. L., Martínez-Zambrano, J. J., y Rojas-Sarmiento, H. A. (2018). Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: mechanism and applications of the process. *Acta Agronómica*, 67(2), 277–288.
- Chen, T., Lv, M., Wu, Y., He, J., Huang, G., Wang, D., y Ma, H. (2019). A new growth curve model for giant freshwater prawn macrobrachium rosenbergii in a prawn-plant symbiotic system. *Ecological Modelling*, 411, 108801.
- Chen, Y., Feng, Y., Deveaux, J. G., Masoud, M. A., Chandra, F. S., Chen, H., ... Feng, L. (2019). Biomineralization forming process and bio-inspired nanomaterials for biomedical application: a review. *Minerals*, 9(2), 68.
- Chou, C.-W., Aydilek, A., Seagren, E., y Mangel, T. (2008). Bacterially-induced calcite precipitation via ureolysis. *American Society of Microbiology*.
- Dhami, N. K., Alsubhi, W. R., Watkin, E., y Mukherjee, A. (2017). Bacterial community dynamics and biocement formation during stimulation and augmentation: implications for soil consolidation. *Frontiers in microbiology*, 8, 1267.
- Dietrich, R. V. (2013). Calcite. *Encyclopædia Britannica*, 1.

- Edwards, A. N., y McBride, S. M. (2016). Isolating and purifying clostridium difficile spores. En *Clostridium difficile* (pp. 117–128). Springer.
- Evans, J. S. (2019). The biomineralization proteome: Protein complexity for a complex bioceramic assembly process. *Proteomics*, 19(16), 1900036.
- Guidi, V., Lehner, A., Lüthy, P., y Tonolla, M. (2013). Dynamics of bacillus thuringiensis var. israelensis and lysinibacillus sphaericus spores in urban catch basins after simultaneous application against mosquito larvae. *PloS one*, 8(2), e55658.
- Harshali, J., Mitali, S., Neha, A., y Pragati, B. (2016). Bio concrete and bacteria based self healing concrete. *Int. J. Res. Eng. Technol*, 5(5), 95–99.
- Hashmi, I., Bindschedler, S., y Junier, P. (2020). Firmicutes. En *Beneficial microbes in agro-ecology* (pp. 363–396). Elsevier.
- Heredia, A. (2019). Determinación de biomineralización a partir de bacterias de suelo y subsiguiente formulación de medio de cultivo a base de desechos industriales para la biorreparación de microgrietas en concreto. *Universidad del Valle de Guatemala*.
- Hernández-Hernández, A., Rodríguez-Navarro, A. B., Gómez-Morales, J., Jiménez-López, C., Nys, Y., y García-Ruiz, J. M. (2008). Influence of model globular proteins with different isoelectric points on the precipitation of calcium carbonate. *Crystal Growth and Design*, 8(5), 1495–1502.
- Kayath, A. C., Mbozo, V., Brice, A., Nicaise, M., Kaya-Ongoto, M., y Nguimbi, E. (2019, 01). The genus lysinibacillus: Versatile phenotype and promising future. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 8. doi: 10.21275/ART20194281
- Kozuka, S., y Tochikubo, K. (1991). Permeability of dormant spores of bacillus subtilis to malachite green and crystal violet. *Microbiology*, 137(3), 607–613.
- Kumar, J. B., Prabhakara, R., y Pushpa, H. (2013). Bio mineralisation of calcium carbonate by different bacterial strains and their application in concrete crack remediation. *International Journal of Advances in Engineering & Technology*, 6(1), 202.
- Li, M., Fu, Q.-L., Zhang, Q., Achal, V., y Kawasaki, S. (2015). Bio-grout based on microbially induced sand solidification by means of asparaginase activity. *Scientific reports*, 5, 16128.
- Luna, C. L., Lopes, C. E., y Massarani, G. (2005). Recovery of bacillus sphaericus spores by flocculation/sedimentation and flotation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 61–70.
- Lutfian, R. D. (2020). *Beachrock formation mechanism and its application to developing beach sand cementation method based on microbial induced carbonate precipitation (micp): Case study of krakal-sadranan, yogyakarta, indonesia* (Tesis Doctoral no publicada). .
- Maier, R. M., y Pepper, I. L. (2015). Bacterial growth. En *Environmental microbiology* (pp. 37–56). Elsevier.
- Miller, S. A., Horvath, A., y Monteiro, P. J. (2016). Readily implementable techniques can cut annual co2 emissions from the production of concrete by over 20%. *Environmental Research Letters*, 11(7), 074029.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual review of microbiology*, 3(1), 371–394.
- Morales, A. (2020). Identificación de la ruta metabólica para producción industrial de calcita por hidrólisis de urea en *Lysinibacillus sphaericus* mediante análisis computacional genético de *Sporosarcina*, *Bacillus* y *Lysinibacillus* spp. *Universidad del Valle de Guatemala*.
- Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2018). *Principios de bioquímica de lehninger-7*. Artmed Editora.
- Neville, A. M., y Brooks, J. J. (1987). *Concrete technology*. Longman Scientific & Technical England.
- OECD, A. (2005). A framework for biotechnology statistics. *Organisation for Economic Co Operation and Development, Paris*.
- Penagos, J. I. C. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (sem). *Elementos*, 3(3), 133–146.
- Seifan, M., Samani, A. K., y Berenjian, A. (2016). Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(6), 2591–2602.
- Stabnikov, V., Jian, C., Ivanov, V., y Li, Y. (2013). Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8), 1453–1460.

- Tanner, R. S. (2007). Cultivation of bacteria and fungi. En *Manual of environmental microbiology, third edition* (pp. 69–78). American Society of Microbiology.
- Tobler, D. J., Minto, J. M., El Mountassir, G., Lunn, R. J., y Phoenix, V. R. (2018). Microscale analysis of fractured rock sealed with microbially induced CaCO_3 precipitation: influence on hydraulic and mechanical performance. *Water Resources Research*, 54(10), 8295–8308.
- Weiner, S., y Dove, P. M. (2003). An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 54(1), 1–29.

Cuadro 23: Lecturas de densidad óptica para las curvas de crecimiento para la cepa P.4.1.A

Cepa	Hora	Tiempo (min)	OD (1)	OD(2)	OD(3)
	10:00	0	0.13	0.10	0.13
	11:30	90	0.22	0.16	0.22
	13:00	180	0.27	0.50	0.30
	14:30	270	0.44	0.81	0.54
	16:00	360	0.65	0.99	0.66
	18:00	480	0.66	0.99	0.67
P.4.1.A	19:30	570	0.66	0.99	0.68

Cuadro 24: Lecturas de densidad óptica para las curvas de crecimiento para la cepa P.5.2.A

Cepa	Hora	Tiempo (min)	OD (1)	OD(2)	OD(3)
	10:00	0	0.15	0.17	0.15
	11:30	90	0.33	0.42	0.33
	13:00	180	0.56	0.56	0.61
	14:30	270	0.78	0.79	0.73
	16:00	360	0.81	0.82	0.76
	18:00	480	0.83	0.85	0.78
P.5.2.A	19:30	570	0.84	0.85	0.79

Cuadro 25: Lecturas de densidad óptica para las curvas de crecimiento para la cepa P.5.3.A

Cepa	Hora	Tiempo (min)	OD (1)	OD(2)	OD(3)
	10:00	0	0.08	0.11	0.11
	11:30	90	0.16	0.16	0.19
	13:00	180	0.26	0.26	0.35
	14:30	270	0.37	0.35	0.65
	16:00	360	0.54	0.43	0.72
	18:00	480	0.73	0.55	0.82
P.5.3.A	19:30	570	0.73	0.56	0.83

Cuadro 26: Conteos de las curvas de crecimiento para la cepa P.4.1.A

Hora	Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
10 am	0	9	9	9
		9	9	8
		10	9	9
		9	8	8
		8	9	8
11:30 am	90	9	9	9
		9	9	9
		10	9	8
		9	9	8
		9	9	9
1 pm	180	16	28	17
		16	31	17
		14	31	16
		15	30	17
		17	36	17
2:30pm	270	29	67	35
		32	59	34
		30	63	34
		35	61	38
		34	59	37
4pm	360	62	123	60
		63	122	62
		61	120	63
		63	121	64
		63	122	62
5:30pm	450	68	123	62
		66	121	61
		65	122	63
		70	123	60
		65	123	59
7:00pm	540	65	122	63
		65	123	60
		67	123	61
		69	121	60
		68	123	60

Cuadro 27: Conteos de las curvas de crecimiento para la cepa P.5.2.A

Hora	Tiempo (min)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
10 am	0	10	8	7
		10	8	8
		10	9	9
		10	8	8
		10	8	8
11:30 am	90	16	16	17
		16	21	17
		14	21	16
		15	22	17
		17	21	17
1 pm	180	36	40	35
		38	34	34
		36	38	35
		38	36	37
		37	34	37
2:30pm	270	61	68	60
		64	58	59
		62	64	60
		65	62	64
		63	59	63
4pm	360	67	75	66
		70	64	64
		68	71	66
		72	68	70
		70	64	69
5:30pm	450	68	75	66
		70	65	65
		68	71	66
		73	68	70
		69	65	76
7:00pm	540	68	75	66
		70	65	65
		68	71	66
		73	68	70
		69	65	76

Cuadro 28: Conteos de las curvas de crecimiento para la cepa P.5.3.A

Hora	Tiempo (min)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
10 am	5*0	10	8	7
		10	8	8
		10	9	9
		10	8	8
		10	8	8
11:30 am	5*90	16	16	17
		16	21	17
		14	21	16
		15	22	17
		17	21	17
1 pm	5*180	36	40	35
		38	34	34
		36	38	35
		38	36	37
		37	34	37
2:30pm	5*270	61	68	60
		64	58	59
		62	64	60
		65	62	64
		63	59	63
4pm	5*360	67	75	66
		70	64	64
		68	71	66
		72	68	70
		70	64	69
5:30pm	5*450	68	75	66
		70	65	65
		68	71	66
		73	68	70
		69	65	76
7:00pm	5*540	68	75	66
		70	65	65
		68	71	66
		73	68	70
		69	65	76

Cuadro 29: Datos originales para recuperación de biomasa con el método propuesto

Cepa	Ensayo	Peso (g)	Peso (g)	Biomasa recuperada (g)
P.4.1.A	1	13.190	13.423	0.233
	2	13.200	13.421	0.221
	3	13.230	13.432	0.202
P.5.2.A	1	13.030	13.398	0.368
	2	13.001	13.440	0.439
	3	13.100	13.480	0.380
P.5.3.A	1	13.210	13.438	0.228
	2	13.120	13.441	0.321
	3	13.190	13.421	0.231

Cuadro 30: Monitoreo de reparación de grietas para todas las cepas con medio TSUC

Cepa	Grieta	Largo de la grieta (%)			% recuperación de grietas	Promedio de recuperación de grietas (%)
		Día 1	Día 18	Día 30		
P.4.1.A	Cubo 1	A	7.3	2.8	0	100.0
		B	5.6	5	3	46.1
		C	5.2	4.9	3.7	29.4
	Cubo 2	A	5.9	2	0.8	87.1
		B	6.2	5.4	1.6	74.8
		C	5.5	5.2	5	10.3
	Cubo 3	A	6	0.7	0	100.0
		B	6.3	4.2	1.9	70.3
		C	6.2	3.7	2.4	61.3
P.5.2.A	Cubo 1	A	6	4.8	4.7	20.9
		B	4.3	2.9	2.6	38.9
		C	6	2.2	0	100.0
	Cubo 2	A	5	3.2	2.3	54.4
		B	5.7	5.3	4.6	20.3
		C	5	4.1	4	18.5
	Cubo 3	A	3.5	2.9	2.5	27.1
		B	5.4	4.3	3	43.2
		C	5.3	4.6	2.2	58.8
P.5.3.A	Cubo 1	A	6.6	4.5	1	85.0
		B	6.1	3.4	3.4	43.4
		C	6.8	0	0	100.0
	Cubo 2	A	5.3	4.1	0.9	83.2
		B	7.7	3.1	3	60.8
		C	6.2	1.9	1.6	73.5
	Cubo 3	A	6.2	2.2	0	100.0
		B	6.6	4.1	0	100.0
		C	6.3	5.8	4.6	26.6
N/A	Cubo 1	A	5.9	0.2	0.2	96.7
		B	6	5.9	5.8	3.8
		C	4.5	4.5	4.5	0.0
		D	6.5	6.2	6.1	6.3
		E	6.9	6.9	6.9	0.0
		F	7	7	7	0.0
	Cubo 3	A	6.9	5	4.4	3.7
		B	6.4	6.3	6.2	2.5
		C	6.4	6.2	6.2	3.6
		D	5.5	0.2	0.2	97.1

Cuadro 31: Monitoreo de reparación de grietas para todas las cepas con medio LUC

Cepa	Grieta	Largo de la grieta (mm)			% recuperación de grietas	Promedio de recuperación de grietas (%)	
		Día 1	Día 18	Día 30			
P.4.1.A	Cubo 1	A	6.234	535	0	100.00	
		B	7.25	0	0	100.00	
	Cubo 2	A	5.989	1.849	716	88.04	
		B	6.859	4.986	3.249	52.63	
		C	6.538	4.575	2.345	64.13	
		D	5.860	4.986	2.028	65.39	
		E	7.125	4.789	2.017	71.9	
	Cubo 3	A	6.753	1.728	14	99.9	
		B	5.366	4.594	2.514	53.5	
		C	7.188	578	315	95.2	
		D	7.957	534	0	100.0	
		E	5.621	4.955	4.903	12.7	
	P.5.2.A	Cubo 1	A	7.102	7.005	6.815	04.04
			B	6.887	5.858	5.049	24.9
			C	7.219	4.595	4.066	43.8
D			6.386	4.169	3.946	3.1	
Cubo 2		A	7.361	6.726	5.145	30.10	
		B	5.611	4.153	3.971	29.3	
		C	6.206	6.198	6.189	0.27	
Cubo 3		A	6.020	2.893	1.763	70.71	
		B	7.896	6.149	6.019	23.7	
		C	6.662	4.157	3.846	42.27	
P. 5.3.A		Cubo 1	A	5.712	2.024	1.986	65.23
			B	5.563	775	392	92.95
			C	6.335	596	19	99.0
		Cubo 2	A	5.347	3.956	2.395	55.21
			B	6.725	4.695	4.398	34.0
	C		5.246	5.091	0	100.0	
	Cubo 3	A	6.612	3.169	1.720	73.9	
		B	5.062	864	39	99.3	
		C	5.734	4.068	1.364	76.1	
	N/A	Cubo 1	A	6.126	6.095	6.092	0.6
			B	6.033	2.94	19.8	96.2
			C	5.886	3.949	34.6	94.2
		Cubo 2	A	5.939	5.864	5.864	1.6
			B	7.085	2.864	1.975	72.2
			C	7.377	7.377	7.377	0.0
Cubo 3		A	5.046	5.046	5.046	0.0	
		B	4.581	4.573	4.569	0.26	
		C	5.833	5.831	5.830	0.05	

Cuadro 32: Monitoreo de reparación de grietas para todas las cepas sin medio

Cepa	Cubo	Grieta	Largo de la grieta (mm)			% recuperación de grietas	Promedio de recuperación de grietas (%)
			Día 1	Día 18	Día 30		
P.4.1.A	Cubo 1	A	6.6	6.5	5.7	13.6	27.4
		B	7.1	7.0	6.5	8.4	
		C	7.2	6.9	5.8	19.8	
	Cubo 2	A	5.5	5.3	5.0	8.4	
		B	5.8	5.8	5.8	0.1	
		C	7.3	0.5	0.5	92.6	
	Cubo 3	A	5.3	4.8	4.8	9.3	
		B	6.9	0.9	0.5	92.2	
		C	7.7	7.5	7.5	2.0	
P.5.2.A	Cubo 1	A	6.3	6.3	6.3	0.0	26.5
		B	5.9	5.8	3.0	49.8	
		C	6.5	6.5	5.6	13.8	
	Cubo 2	A	5.8	5.6	5.5	4.6	
		B	6.0	6.0	6.0	0.0	
		C	5.5	5.1	5.1	8.4	
	Cubo 3	A	5.7	5.5	5.5	3.7	
		B	6.7	0.4	0.4	94.7	
		C	6.0	2.2	2.2	63.8	
P.5.3.A	Cubo 1	A	6.6	5.5	5.4	17.0	27.4
		B	6.6	6.4	6.3	4.2	
		C	6.0	2.7	2.5	59.4	
	Cubo 2	A	5.5	5.5	5.4	2.7	
		B	4.4	4.2	4.2	4.3	
		C	6.2	5.8	2.8	54.6	
	Cubo 3	A	6.1	5.8	3.8	38.0	
		B	6.1	6.1	3.1	49.3	
		C	6.1	6.1	5.1	17.0	
N/A	Cubo 1	A	5.9	5.9	5.9	0.0	0.0
		B	6.3	6.3	6.3	0.0	
		C	5.2	5.2	5.2	0.0	
		D	4.4	4.4	4.4	0.0	
		E	4.7	4.7	4.7	0.0	
		F	6.7	6.7	6.7	0.0	
	Cubo 3	A	5.9	5.9	5.9	0.0	
		B	4.3	4.3	4.3	0.0	
		C	5.9	5.9	5.9	0.0	
		D	5.2	5.2	5.2	0.0	

Cuadro 33: Datos originales de resistencia a compresión para medios TSUC, LUC y control a diferentes edades de curado.

			Resistencia a compresión (N/mm ²)				
Días de curado			1	3	7	28	
Medio	Cepa	Ensayo					
TSUC	P.4.1.A	1	25.95	39.64	35.53	52.32	
		2	25.30	39.25	45.01	52.82	
		3	25.32	39.18	42.67	51.04	
	P.5.2.A	1	27.99	38.69	48.20	45.94	
		2	28.69	40.28	48.01	51.63	
		3	28.31	36.98	47.11	51.98	
	P.5.3.A	1	27.72	39.57	44.82	46.41	
		2	27.90	39.77	44.31	51.77	
		3	27.81	39.93	46.99	51.78	
	Control	1	25.91	36.69	45.82	48.83	
		2	26.65	39.23	45.74	48.69	
		3	27.07	37.90	45.22	48.06	
	LUC	P.4.1.A	1	24.15	40.74	48.82	58.23
			2	24.23	40.68	46.48	56.94
			3	24.33	41.55	48.38	56.49
P.5.2.A		1	25.29	40.63	46.25	54.60	
		2	25.28	40.14	45.94	55.12	
		3	25.36	39.50	45.31	55.39	
P.5.3.A		1	27.74	43.81	49.51	59.52	
		2	28.41	47.83	49.23	60.05	
		3	28.25	46.70	48.89	59.53	
Control		1	28.32	44.01	48.15	56.53	
		2	28.38	42.71	51.06	58.84	
		3	26.60	43.13	50.67	57.18	
BLANCO		P.4.1.A	1	24.20	39.0	45.68	48.90
			2	27.01	40.2	47.44	51.65
			3	27.02	39.0	47.32	50.27
	P.5.2.A	1	26.18	40.03	41.96	50.22	
		2	26.54	41.00	44.60	49.55	
		3	26.33	39.00	43.41	49.48	
	P.5.3.A	1	22.81	38.04	40.0	50.22	
		2	22.90	38.61	40.21	49.55	
		3	23.3	37.17	40.67	49.48	
	Control	1	24.13	37.39	43.26	49.55	
		2	24.93	38.05	43.07	52.51	
		3	24.41	38.09	43.11	46.33	

Cuadro 34: Datos originales de cristalografía de rayos x para cuantificar calcita en las muestras de biocemento con medios TSUC, LUC y controles

Medio	Cepa	Ensayo	Calcita	
TSUC	P.4.1.A	1	1.13	
		2	1.31	
		3	1.41	
	P.5.2.A	1	1.69	
		2	1.37	
		3	1.45	
	P.5.3.A	1	2,05	
		2	1.76	
		3	1.4	
	N-A	1	0.94	
		2	0.72	
		3	1.41	
	LUC	P.4.1.A	1	4.32
			2	4.52
			3	2.22
P.5.2.A		1	2	
		2	4.17	
		3	1.96	
P.5.3.A		1	1.61	
		2	1.53	
		3	1.8	
N-A		1	0.37	
		2	0.55	
		3	0.61	
Blanco		P.4.1.A	1	0.38
			2	0.93
			3	1.19
	P.5.2.A	1	0.35	
		2	0.79	
		3	0.62	
	P.5.3.A	1	0.43	
		2	1.54	
		3	0.5	
	N-A	1	1.24	
		2	1.2	
		3	1.18	

Figura 17: Grieta A del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC

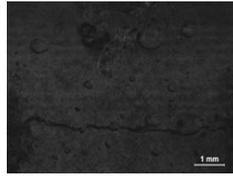


Figura 22: Grieta B del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30

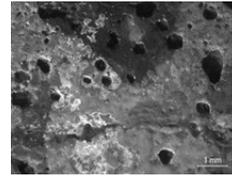


Figura 18: Grieta A del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18

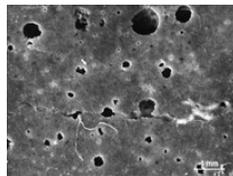


Figura 23: Grieta C del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC

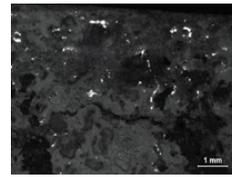


Figura 19: Grieta A del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30

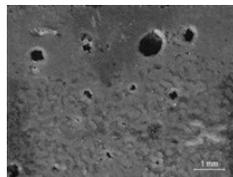


Figura 24: Grieta C del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18

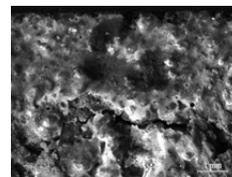


Figura 20: Grieta B del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC

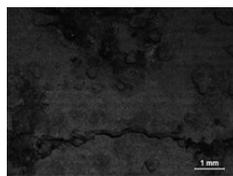


Figura 25: Grieta C del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30

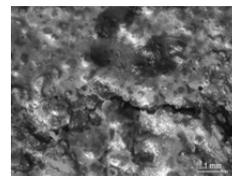


Figura 21: Grieta B del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18

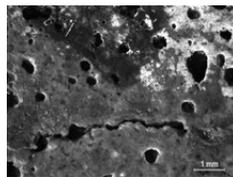


Figura 26: Grieta A del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC

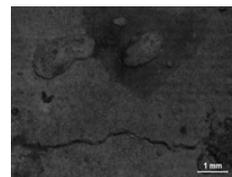


Figura 27: Grieta A del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18

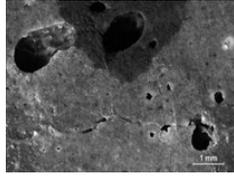


Figura 32: Grieta C del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC

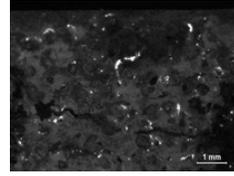


Figura 28: Grieta A del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30

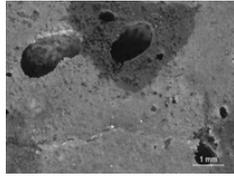


Figura 33: Grieta C del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18

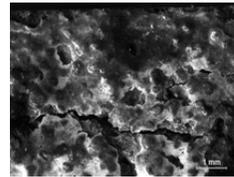


Figura 29: Grieta B del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC

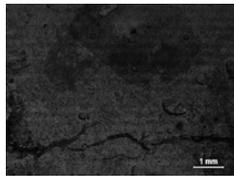


Figura 34: Grieta C del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30

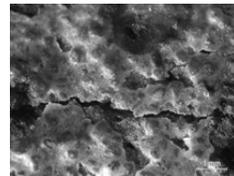


Figura 30: Grieta B del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18

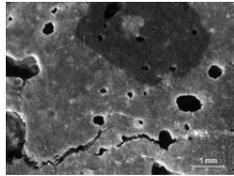


Figura 35: Grieta A del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC

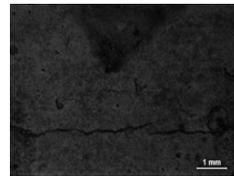


Figura 31: Grieta B del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30

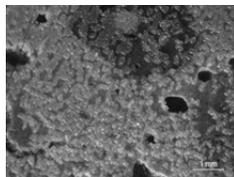


Figura 36: Grieta A del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18

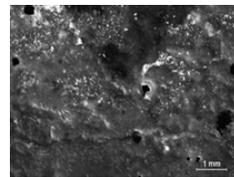


Figura 37: Grieta A del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30

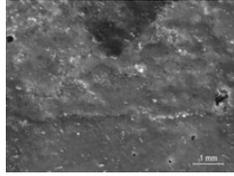


Figura 42: Grieta C del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18

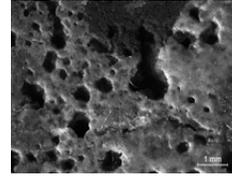


Figura 38: Grieta B del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC

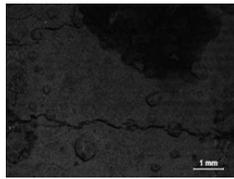


Figura 43: Grieta C del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30

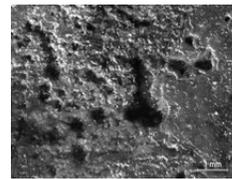


Figura 39: Grieta B del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 18

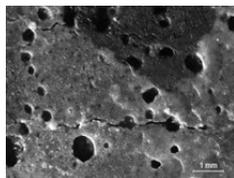


Figura 44: Grieta A del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC

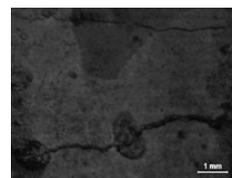


Figura 40: Grieta B del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC el día 30

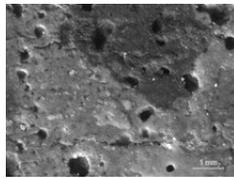


Figura 45: Grieta A del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 18

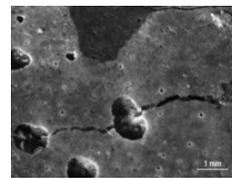


Figura 41: Grieta C del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación TSUC

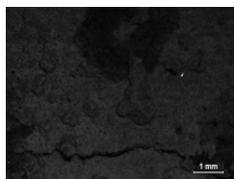


Figura 46: Grieta A del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 30

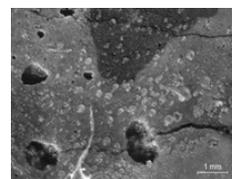


Figura 47: Grieta B del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC

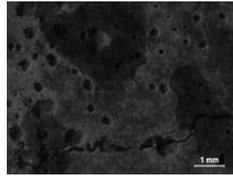


Figura 52: Grieta C del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 30

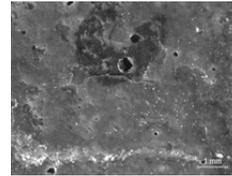


Figura 48: Grieta B del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 18

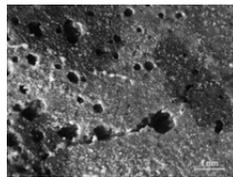


Figura 53: Grieta A del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC

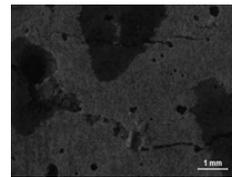


Figura 49: Grieta B del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 30

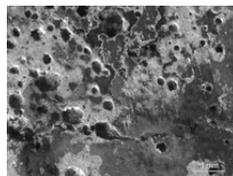


Figura 54: Grieta A del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 18

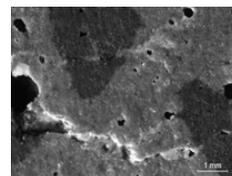


Figura 50: Grieta C del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC

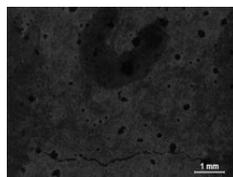


Figura 55: Grieta A del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 30

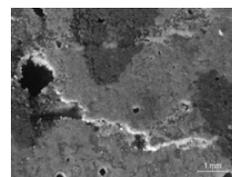


Figura 51: Grieta C del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 18

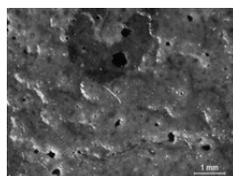


Figura 56: Grieta B del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC

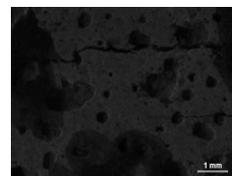


Figura 57: Grieta B del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 18

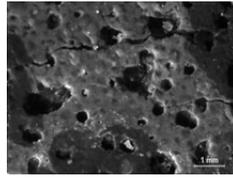


Figura 62: Grieta A del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC

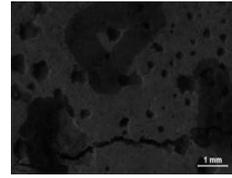


Figura 58: Grieta B del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 30

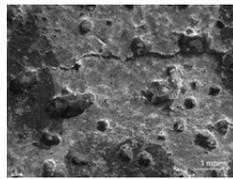


Figura 63: Grieta A del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 18

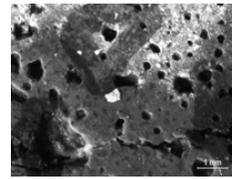


Figura 59: Grieta C del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC

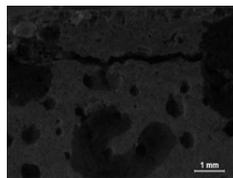


Figura 64: Grieta A del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 30

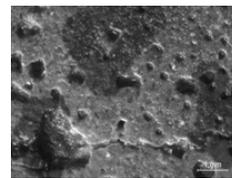


Figura 60: Grieta C del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 18

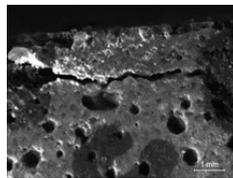


Figura 65: Grieta B del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC

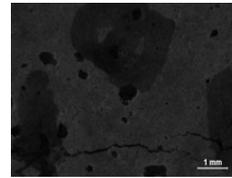


Figura 61: Grieta C del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 30

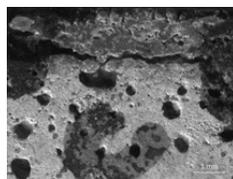


Figura 66: Grieta B del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 18

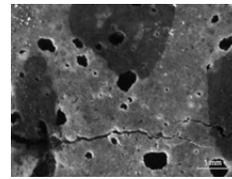


Figura 67: Grieta B del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 30

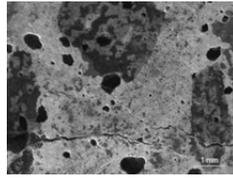


Figura 72: Grieta A del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 18

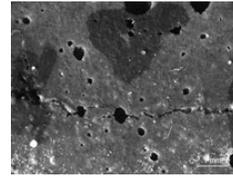


Figura 68: Grieta C del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC

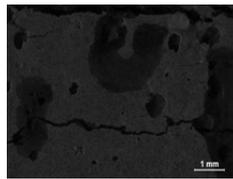


Figura 73: Grieta A del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 30

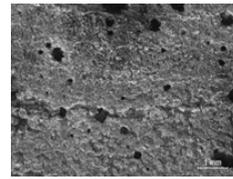


Figura 69: Grieta C del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 18

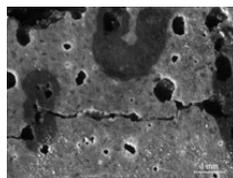


Figura 74: Grieta B del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC

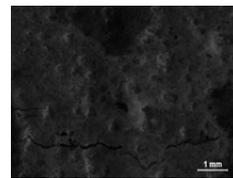


Figura 70: Grieta C del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación TSUC el día 30

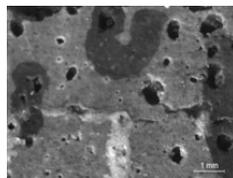


Figura 75: Grieta B del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 18

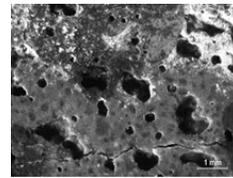


Figura 71: Grieta A del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC

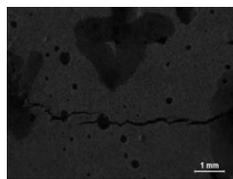


Figura 76: Grieta B del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 30

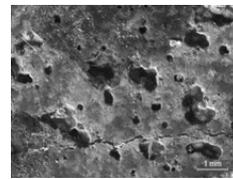


Figura 77: Grieta C del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC

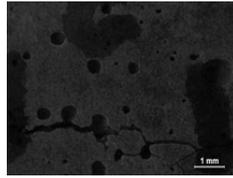


Figura 82: Grieta A del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 30

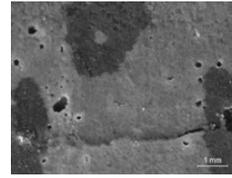


Figura 78: Grieta C del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 18

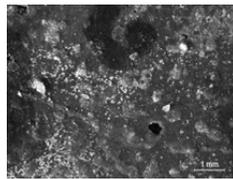


Figura 83: Grieta B del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC

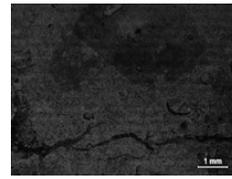


Figura 79: Grieta C del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 30

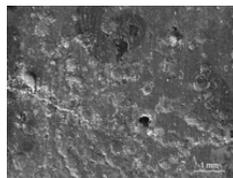


Figura 84: Grieta B del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 18

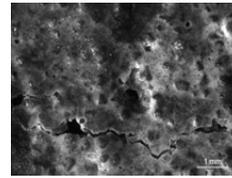


Figura 80: Grieta A del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC

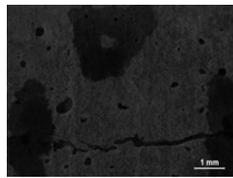


Figura 85: Grieta B del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 30

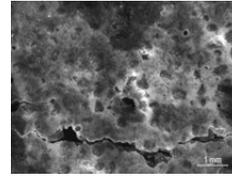


Figura 81: Grieta A del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 18

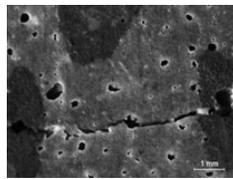


Figura 86: Grieta C del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC

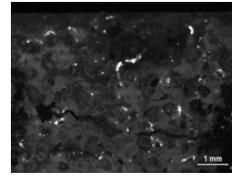


Figura 87: Grieta C del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 18

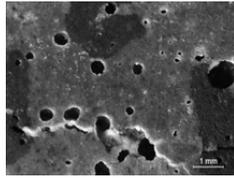


Figura 92: Grieta B del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC

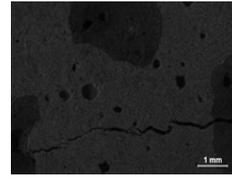


Figura 88: Grieta C del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 30

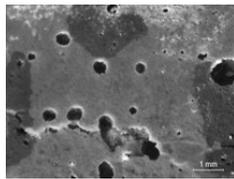


Figura 93: Grieta B del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 18

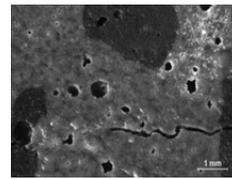


Figura 89: Grieta A del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC

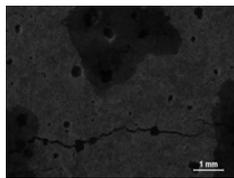


Figura 94: Grieta B del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 30

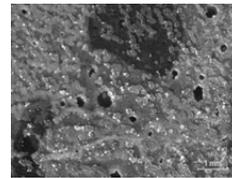


Figura 90: Grieta A del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 18

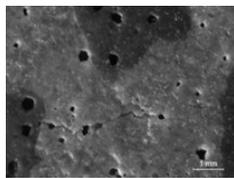


Figura 95: Grieta C del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC

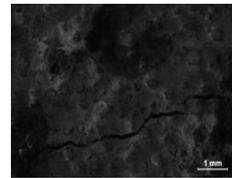


Figura 91: Grieta A del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 30

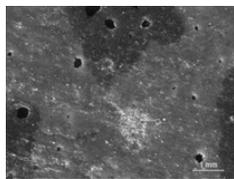


Figura 96: Grieta C del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 18

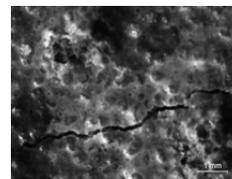


Figura 97: Grieta C del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación TSUC el día 30

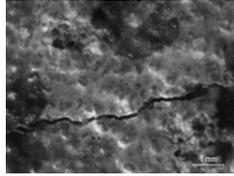


Figura 102: Grieta B del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 18

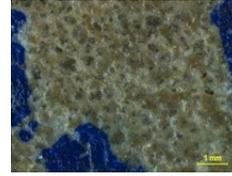


Figura 98: Grieta A del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC

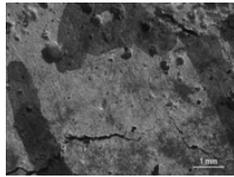


Figura 103: Grieta B del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 30

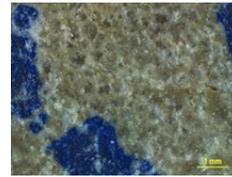


Figura 99: Grieta A del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 18

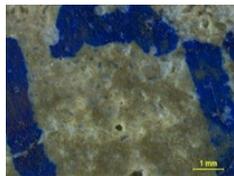


Figura 104: Grieta C del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC

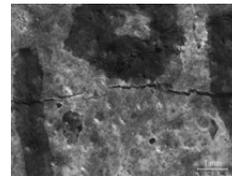


Figura 100: Grieta A del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 30

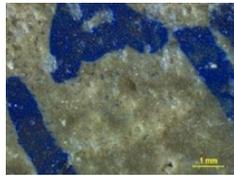


Figura 105: Grieta C del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 18

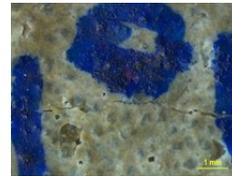


Figura 101: Grieta B del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC

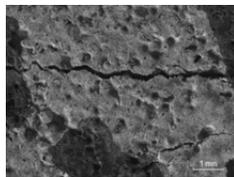


Figura 106: Grieta C del cubo 1 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 30

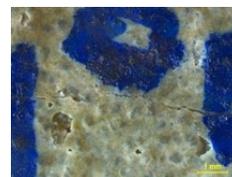


Figura 107: Grieta A del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC

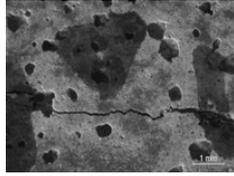


Figura 112: Grieta B del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 30

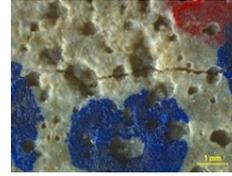


Figura 108: Grieta A del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 18

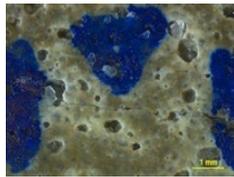


Figura 113: Grieta C del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC

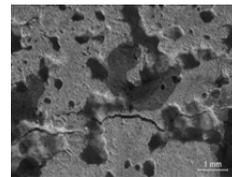


Figura 109: Grieta A del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 30

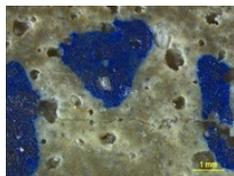


Figura 114: Grieta C del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 18

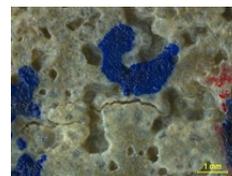


Figura 110: Grieta B del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC

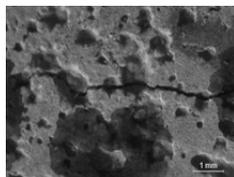


Figura 115: Grieta C del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 30

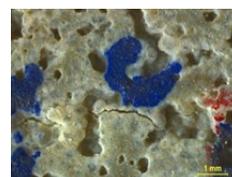


Figura 111: Grieta B del cubo 2 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 18

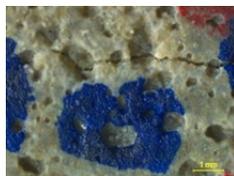


Figura 116: Grieta A del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC

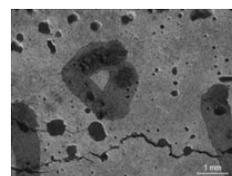


Figura 117: Grieta A del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 18

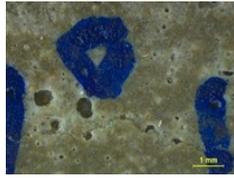


Figura 122: Grieta C del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC

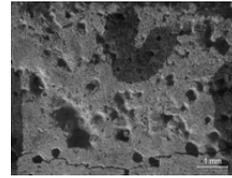


Figura 118: Grieta A del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 30

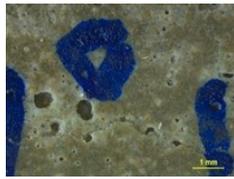


Figura 123: Grieta C del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 18

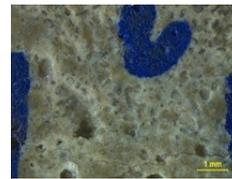


Figura 119: Grieta B del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC

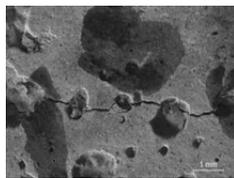


Figura 124: Grieta C del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 30

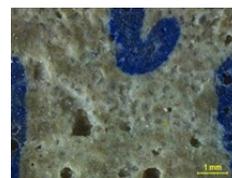


Figura 120: Grieta B del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 18

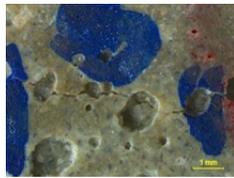


Figura 125: Grieta A del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC

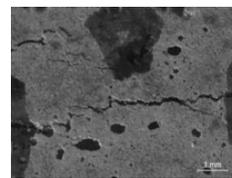


Figura 121: Grieta B del cubo 3 de cepa P.4.1.A con medio de precipitación LUC el día 30

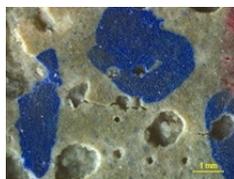


Figura 126: Grieta A del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 18

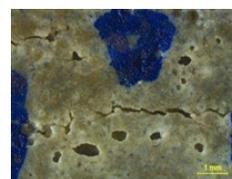


Figura 127: Grieta A del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 30

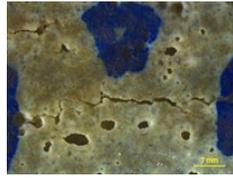


Figura 132: Grieta C del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 18

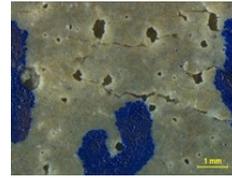


Figura 128: Grieta B del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC

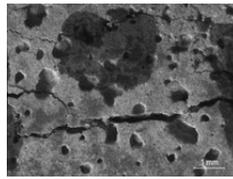


Figura 133: Grieta C del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 30

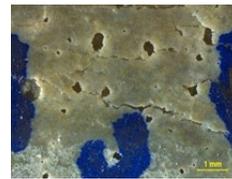


Figura 129: Grieta B del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 18

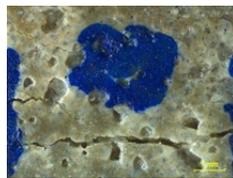


Figura 134: Grieta A del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC

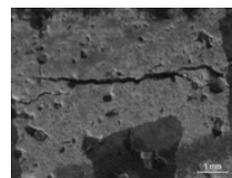


Figura 130: Grieta B del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 30

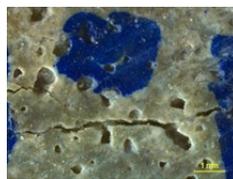


Figura 135: Grieta A del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 18



Figura 131: Grieta C del cubo 1 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC

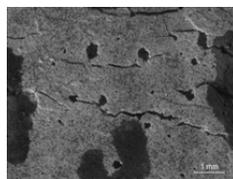


Figura 136: Grieta A del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 30



Figura 137: Grieta B del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC

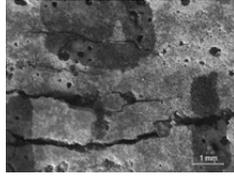


Figura 142: Grieta C del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 30

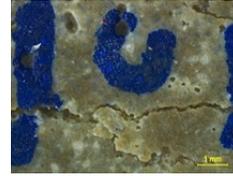


Figura 138: Grieta B del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 18

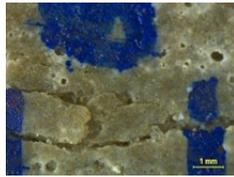


Figura 143: Grieta A del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC

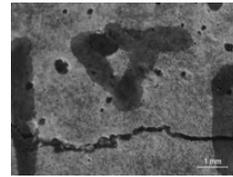


Figura 139: Grieta B del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 30

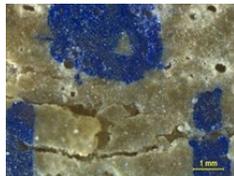


Figura 144: Grieta A del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 18



Figura 140: Grieta C del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC

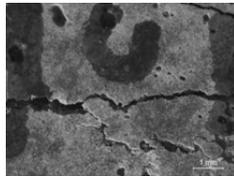


Figura 145: Grieta A del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 30



Figura 141: Grieta C del cubo 2 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 18

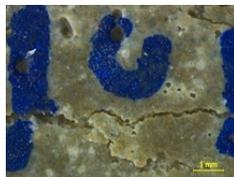


Figura 146: Grieta B del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC

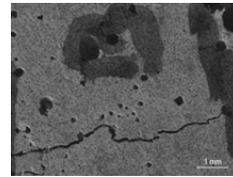


Figura 147: Grieta B del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 18

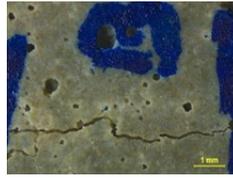


Figura 152: Grieta A del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC

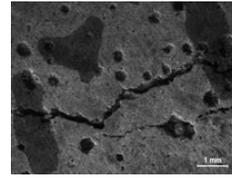


Figura 148: Grieta B del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 30

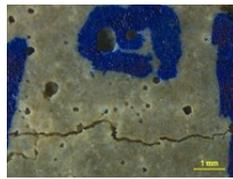


Figura 153: Grieta A del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 18

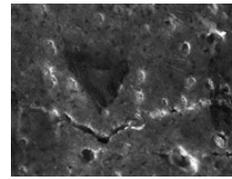


Figura 149: Grieta C del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC

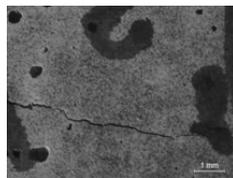


Figura 154: Grieta A del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 30

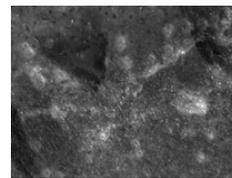


Figura 150: Grieta C del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 18

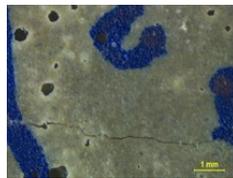


Figura 155: Grieta B del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC

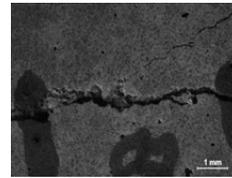


Figura 151: Grieta C del cubo 3 de cepa P.5.2.A con medio de precipitación LUC el día 30

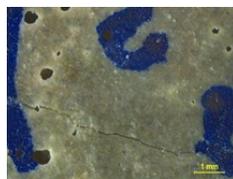


Figura 156: Grieta B del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 18

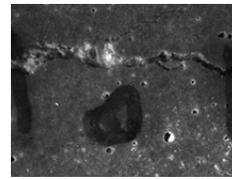


Figura 157: Grieta B del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 30

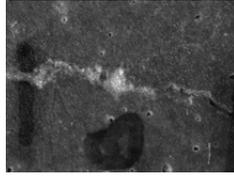


Figura 162: Grieta A del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 18

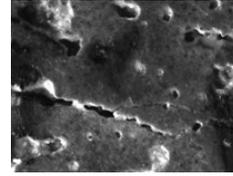


Figura 158: Grieta C del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC

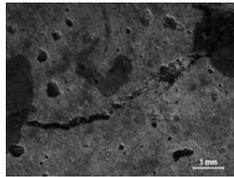


Figura 163: Grieta A del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 30

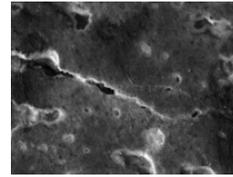


Figura 159: Grieta C del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 18

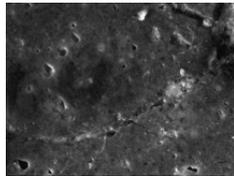


Figura 164: Grieta B del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC

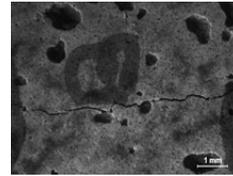


Figura 160: Grieta C del cubo 1 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 30

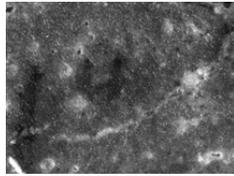


Figura 165: Grieta B del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 18

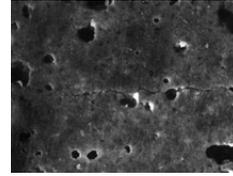


Figura 161: Grieta A del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC

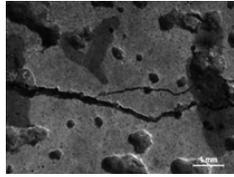


Figura 166: Grieta B del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 30

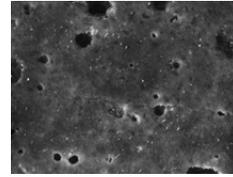


Figura 167: Grieta C del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC

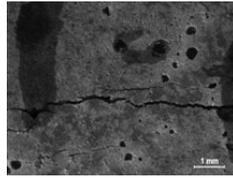


Figura 172: Grieta A del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 30

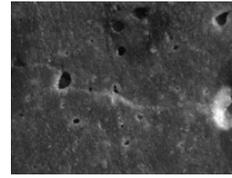


Figura 168: Grieta C del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 18

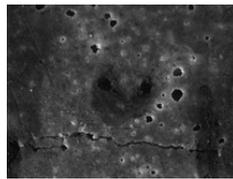


Figura 173: Grieta B del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC

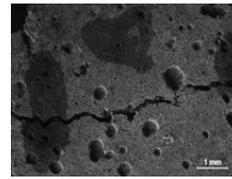


Figura 169: Grieta C del cubo 2 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 30

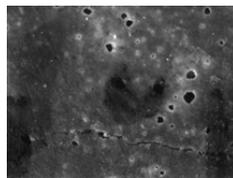


Figura 174: Grieta B del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 18

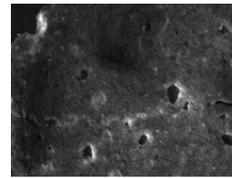


Figura 170: Grieta A del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC

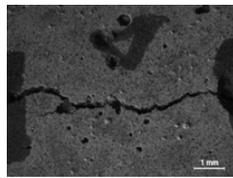


Figura 175: Grieta B del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 30

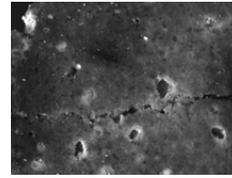


Figura 171: Grieta A del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 18

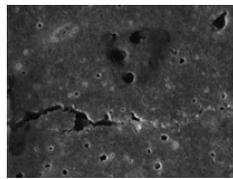


Figura 176: Grieta C del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC

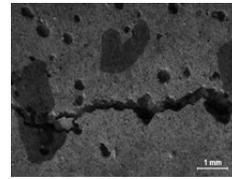


Figura 177: Grieta C del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 18

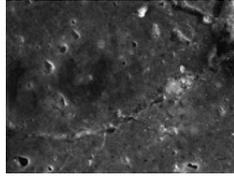


Figura 182: Grieta B del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación TSUC



Figura 178: Grieta C del cubo 3 de cepa P.5.3.A con medio de precipitación LUC el día 30

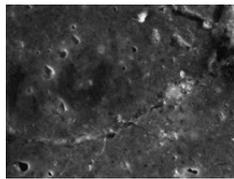


Figura 183: Grieta B del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 18

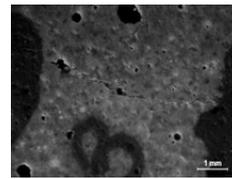


Figura 179: Grieta A del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación TSUC

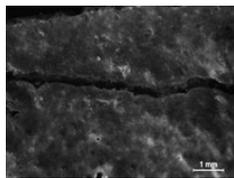


Figura 184: Grieta B del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 30

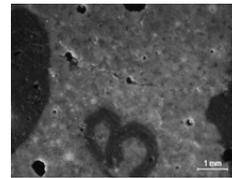


Figura 180: Grieta A del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 18

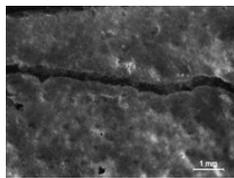


Figura 185: Grieta C del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación TSUC

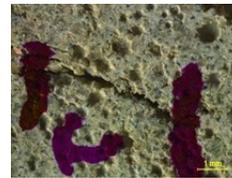


Figura 181: Grieta A del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 30

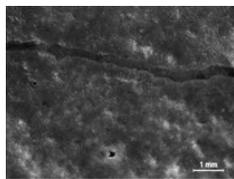


Figura 186: Grieta C del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 18

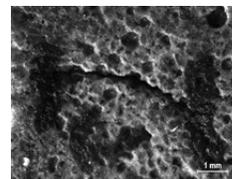


Figura 187: Grieta C del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 30

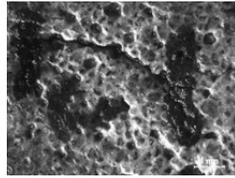


Figura 192: Grieta B del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 18

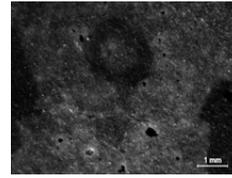


Figura 188: Grieta A del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación TSUC

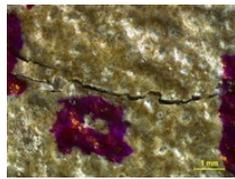


Figura 193: Grieta B del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 30

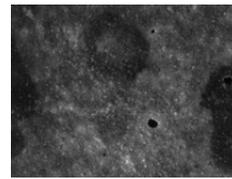


Figura 189: Grieta A del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 18

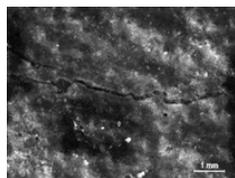


Figura 194: Grieta C del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación TSUC

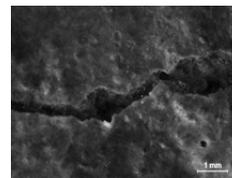


Figura 190: Grieta A del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 30

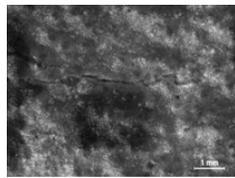


Figura 195: Grieta C del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 18

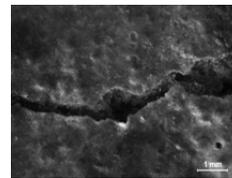


Figura 191: Grieta B del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación TSUC

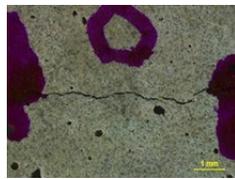


Figura 196: Grieta C del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 30

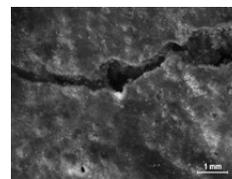


Figura 197: Grieta A del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación TSUC

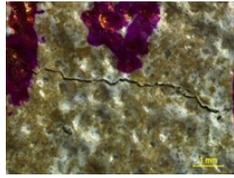


Figura 202: Grieta B del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 30

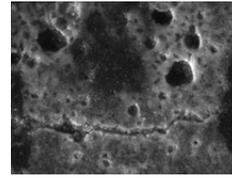


Figura 198: Grieta A del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 18

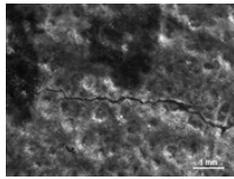


Figura 203: Grieta C del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación TSUC

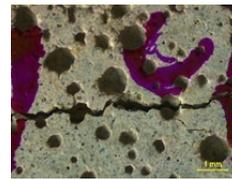


Figura 199: Grieta A del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 30

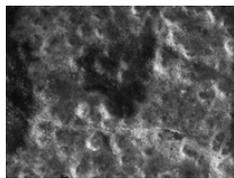


Figura 204: Grieta C del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 18

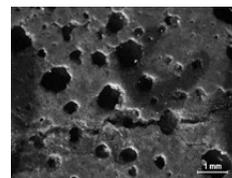


Figura 200: Grieta B del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación TSUC

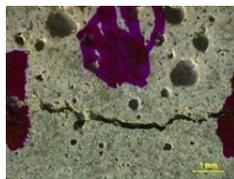


Figura 205: Grieta C del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 30

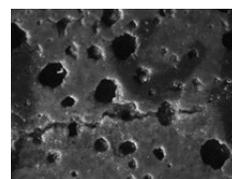


Figura 201: Grieta B del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación TSUC el día 18

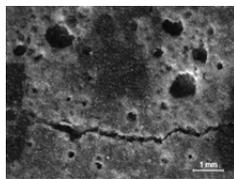


Figura 206: Grieta A del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación LUC

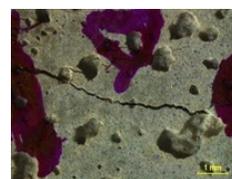


Figura 207: Grieta A del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 18

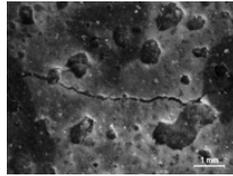


Figura 212: Grieta C del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación LUC

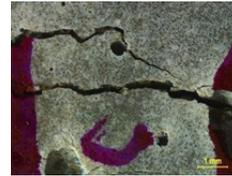


Figura 208: Grieta A del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 30

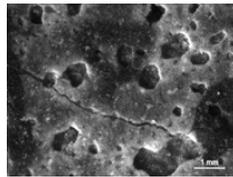


Figura 213: Grieta C del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 18

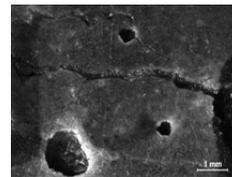


Figura 209: Grieta B del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación LUC

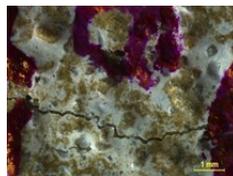


Figura 214: Grieta C del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 30

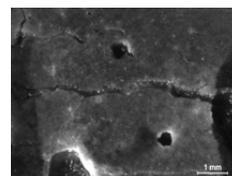


Figura 210: Grieta B del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 18

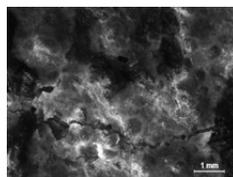


Figura 215: Grieta A del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación LUC



Figura 211: Grieta B del cubo 1 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 30

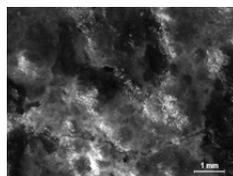


Figura 216: Grieta A del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 18

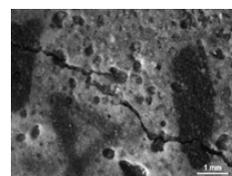


Figura 217: Grieta A del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 30

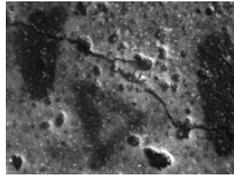


Figura 222: Grieta C del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 18

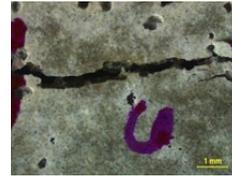


Figura 218: Grieta B del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación LUC

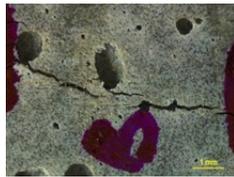


Figura 223: Grieta C del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 30

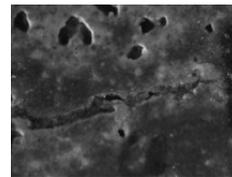


Figura 219: Grieta B del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 18

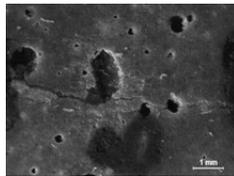


Figura 224: Grieta A del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación LUC



Figura 220: Grieta B del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 30

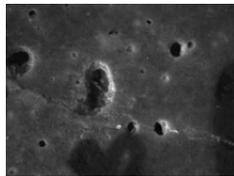


Figura 225: Grieta A del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 18

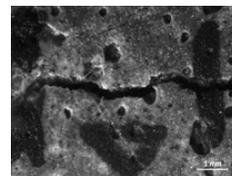


Figura 221: Grieta C del cubo 2 sin cepa con medio de precipitación LUC



Figura 226: Grieta A del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 30

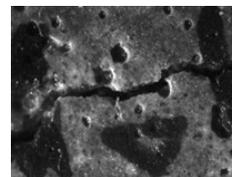


Figura 227: Grieta B del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación LUC



Figura 232: Grieta C del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 30

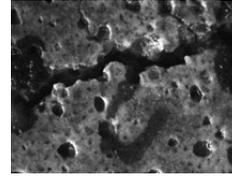


Figura 228: Grieta B del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 18

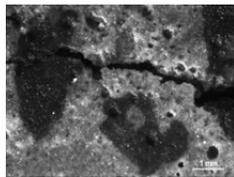


Figura 233: Grieta A del cubo 1 cepa P.4.1.A sin medio de precipitación



Figura 229: Grieta B del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 30

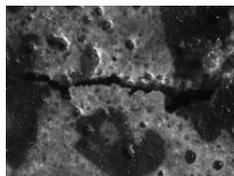


Figura 234: Grieta A del cubo 1 cepa P.4.1.A sin medio de precipitación el día 18

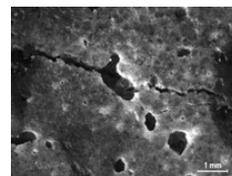


Figura 230: Grieta C del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación LUC

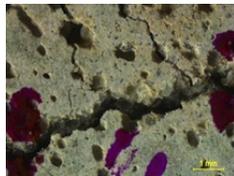


Figura 235: Grieta A del cubo 1 cepa P.4.1.A sin medio de precipitación el día 30

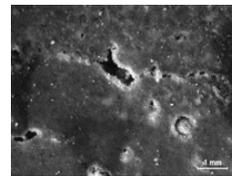


Figura 231: Grieta C del cubo 3 sin cepa con medio de precipitación LUC el día 18

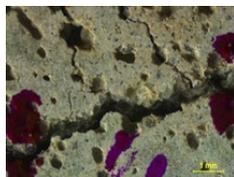


Figura 236: Grieta B del cubo 1 cepa P.4.1.A sin medio de precipitación



Figura 237: Grieta B del cubo 1 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 18

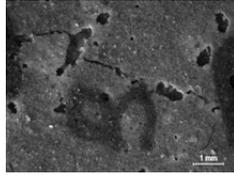


Figura 242: Grieta A del cubo 2 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 18

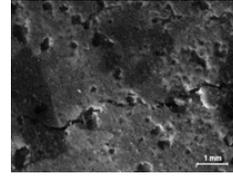


Figura 238: Grieta B del cubo 1 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 30

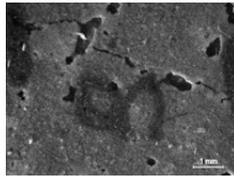


Figura 243: Grieta A del cubo 2 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 30

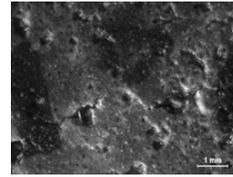


Figura 239: Grieta C del cubo 1 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación

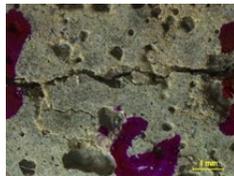


Figura 244: Grieta B del cubo 2 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación



Figura 240: Grieta C del cubo 1 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 18

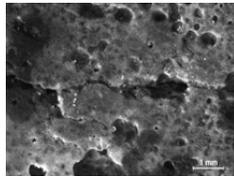


Figura 245: Grieta B del cubo 2 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 18

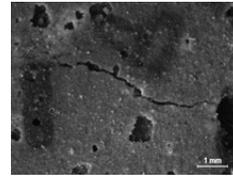


Figura 241: Grieta A del cubo 2 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación

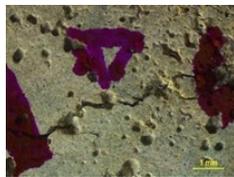


Figura 246: Grieta B del cubo 2 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 30

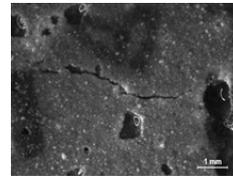


Figura 247: Grieta C del cubo 2 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación

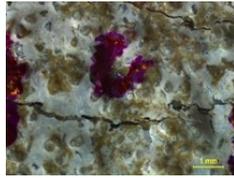


Figura 252: Grieta A del cubo 3 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 30

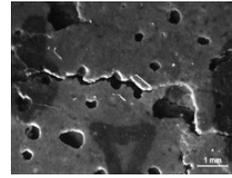


Figura 248: Grieta C del cubo 2 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 18

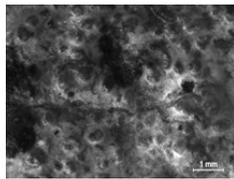


Figura 253: Grieta B del cubo 3 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación



Figura 249: Grieta C del cubo 2 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 30

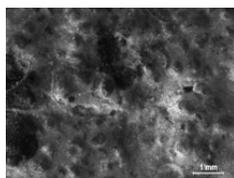


Figura 254: Grieta B del cubo 3 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 18

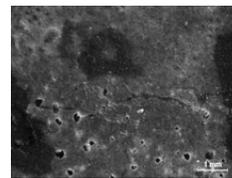


Figura 250: Grieta A del cubo 3 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación



Figura 255: Grieta B del cubo 3 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 30

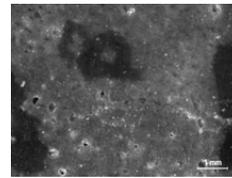


Figura 251: Grieta A del cubo 3 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 18

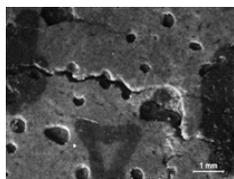


Figura 256: Grieta C del cubo 3 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación

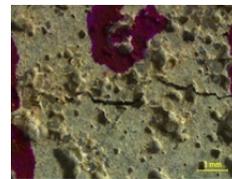


Figura 257: Grieta C del cubo 3 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 18

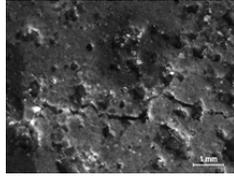


Figura 262: Grieta B del cubo 1 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación



Figura 258: Grieta C del cubo 3 cepa P.4.1.A
sin medio de precipitación el día 30

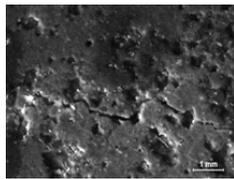


Figura 263: Grieta B del cubo 1 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación el día 18

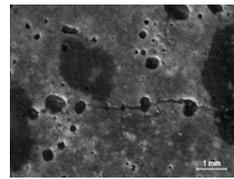


Figura 259: Grieta A del cubo 1 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación



Figura 264: Grieta B del cubo 1 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación el día 30

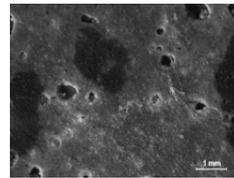


Figura 260: Grieta A del cubo 1 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación el día 18

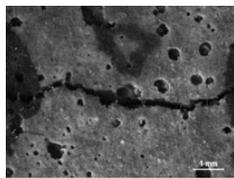


Figura 265: Grieta C del cubo 1 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación

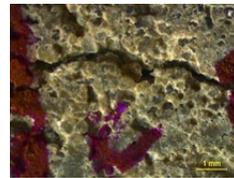


Figura 261: Grieta A del cubo 1 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación el día 30

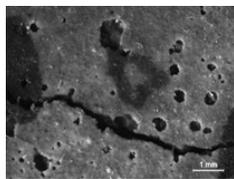


Figura 266: Grieta C del cubo 1 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación el día 18

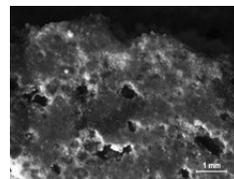


Figura 267: Grieta C del cubo 1 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación el día 30

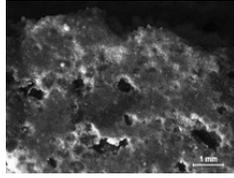


Figura 272: Grieta B del cubo 2 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación el día 18

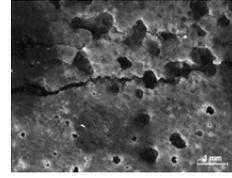


Figura 268: Grieta A del cubo 2 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación

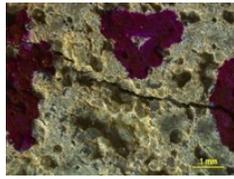


Figura 273: Grieta B del cubo 2 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación el día 30

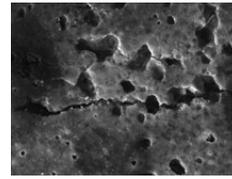


Figura 269: Grieta A del cubo 2 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación el día 18

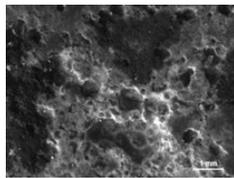


Figura 274: Grieta C del cubo 2 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación



Figura 270: Grieta A del cubo 2 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación el día 30

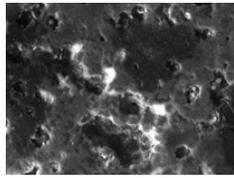


Figura 275: Grieta C del cubo 2 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación el día 18



Figura 271: Grieta B del cubo 2 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación

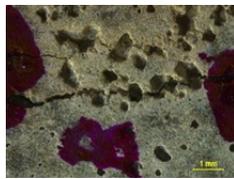


Figura 276: Grieta C del cubo 2 cepa P.5.2.A
sin medio de precipitación el día 30

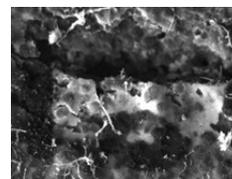


Figura 277: Grieta A del cubo 3 cepa P.5.2.A sin medio de precipitación



Figura 282: Grieta B del cubo 3 cepa P.5.2.A sin medio de precipitación el día 30

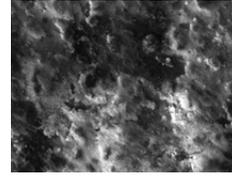


Figura 278: Grieta A del cubo 3 cepa P.5.2.A sin medio de precipitación el día 18

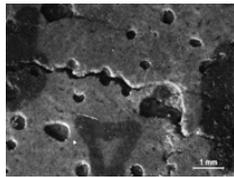


Figura 283: Grieta C del cubo 3 cepa P.5.2.A sin medio de precipitación



Figura 279: Grieta A del cubo 3 cepa P.5.2.A sin medio de precipitación el día 30

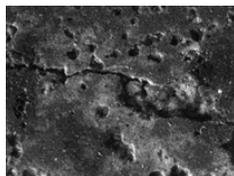


Figura 284: Grieta C del cubo 3 cepa P.5.2.A sin medio de precipitación el día 18

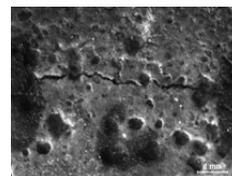


Figura 280: Grieta B del cubo 3 cepa P.5.2.A sin medio de precipitación

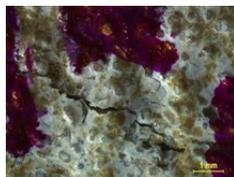


Figura 285: Grieta C del cubo 3 cepa P.5.2.A sin medio de precipitación el día 30

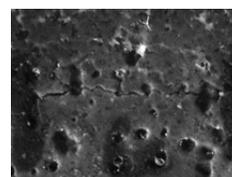


Figura 281: Grieta B del cubo 3 cepa P.5.2.A sin medio de precipitación el día 18

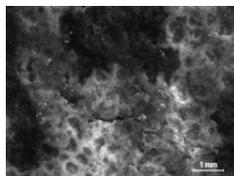


Figura 286: Grieta A del cubo 1 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación



Figura 287: Grieta A del cubo 1 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 18

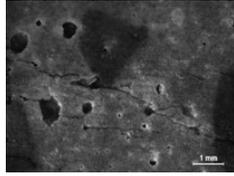


Figura 292: Grieta C del cubo 1 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación

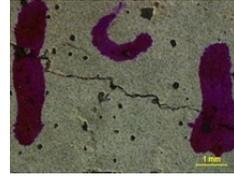


Figura 288: Grieta A del cubo 1 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 30

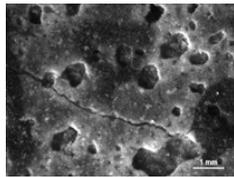


Figura 293: Grieta C del cubo 1 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 18

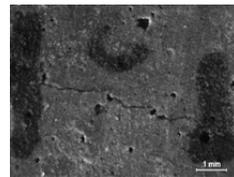


Figura 289: Grieta B del cubo 1 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación



Figura 294: Grieta C del cubo 1 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 30

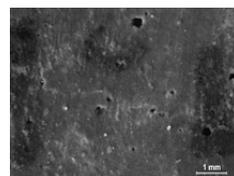


Figura 290: Grieta B del cubo 1 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 18

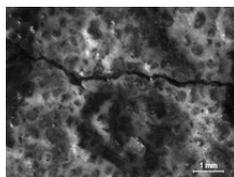


Figura 295: Grieta A del cubo 2 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación

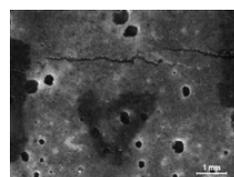


Figura 291: Grieta B del cubo 1 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 30

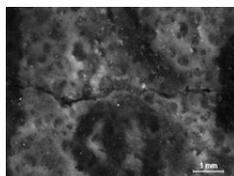


Figura 296: Grieta A del cubo 2 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 18

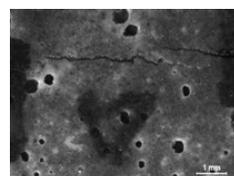


Figura 297: Grieta A del cubo 2 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 30

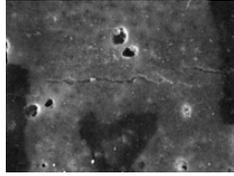


Figura 302: Grieta C del cubo 2 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 18

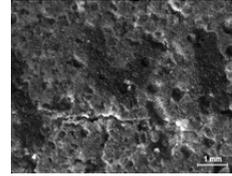


Figura 298: Grieta B del cubo 2 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación



Figura 303: Grieta C del cubo 2 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 30

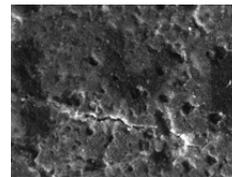


Figura 299: Grieta B del cubo 2 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 18

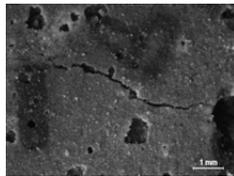


Figura 304: Grieta A del cubo 3 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación



Figura 300: Grieta B del cubo 2 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 30

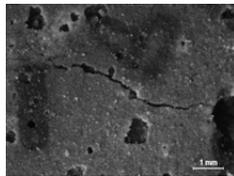


Figura 305: Grieta A del cubo 3 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 18

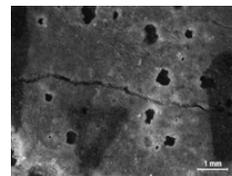


Figura 301: Grieta C del cubo 2 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación



Figura 306: Grieta A del cubo 3 cepa P.5.3.A
sin medio de precipitación el día 30

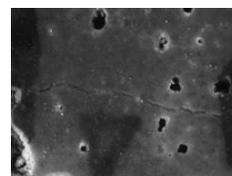


Figura 307: Grieta B del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación



Figura 312: Grieta C del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación el día 30

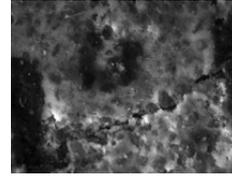


Figura 308: Grieta B del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación el día 18

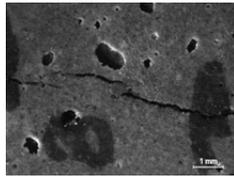


Figura 313: Grieta A del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación

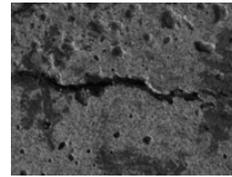


Figura 309: Grieta B del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación el día 30

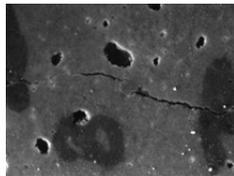


Figura 314: Grieta A del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18

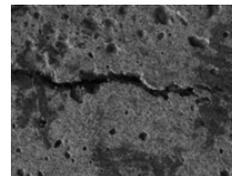


Figura 310: Grieta C del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación

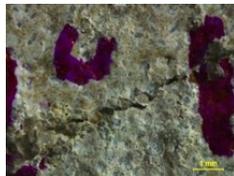


Figura 315: Grieta A del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30

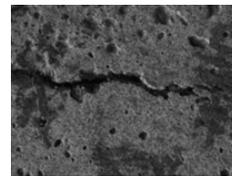


Figura 311: Grieta C del cubo 3 cepa P.5.3.A sin medio de precipitación el día 18

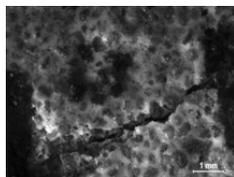


Figura 316: Grieta B del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación

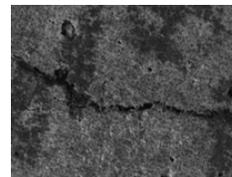


Figura 317: Grieta B del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18

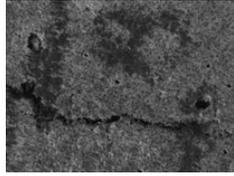


Figura 322: Grieta A del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18

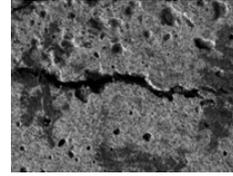


Figura 318: Grieta B del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30

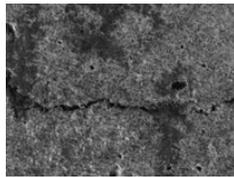


Figura 323: Grieta A del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30

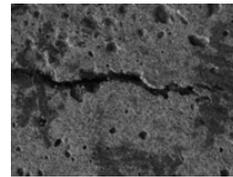


Figura 319: Grieta C del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación

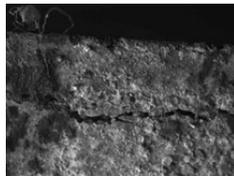


Figura 324: Grieta B del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación

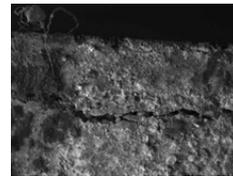


Figura 320: Grieta C del cubo 1 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18

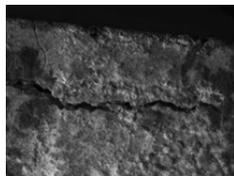


Figura 325: Grieta B del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18

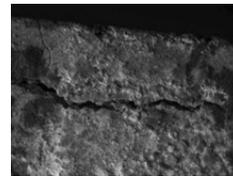


Figura 321: Grieta A del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación

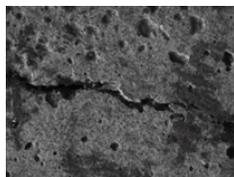


Figura 326: Grieta B del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30

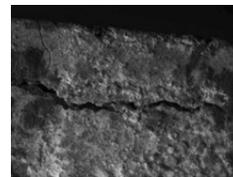


Figura 327: Grieta C del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación

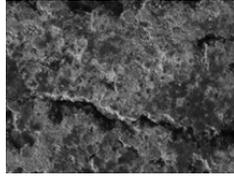


Figura 332: Grieta A del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30

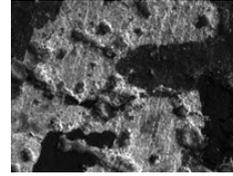


Figura 328: Grieta C del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18

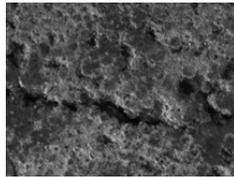


Figura 333: Grieta B del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación

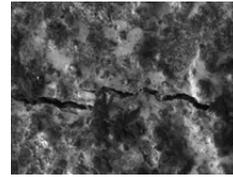


Figura 329: Grieta C del cubo 2 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30

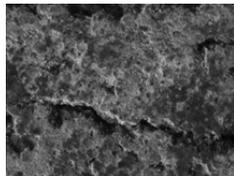


Figura 334: Grieta B del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18

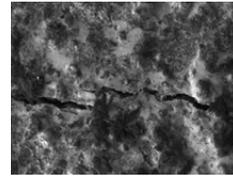


Figura 330: Grieta A del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación

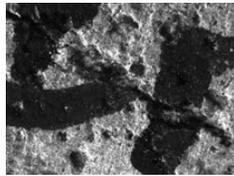


Figura 335: Grieta B del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30

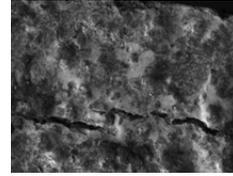


Figura 331: Grieta A del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18

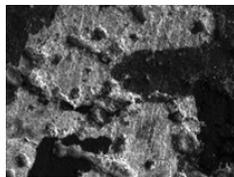


Figura 336: Grieta B del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación

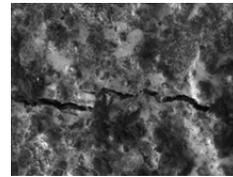


Figura 337: Grieta B del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18

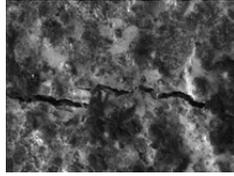


Figura 338: Grieta B del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30

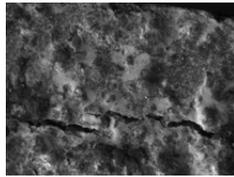


Figura 339: Grieta C del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación

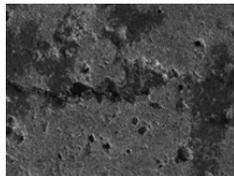


Figura 340: Grieta C del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 18

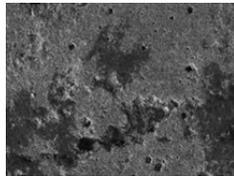


Figura 341: Grieta C del cubo 3 control sin cepa ni medio de precipitación el día 30

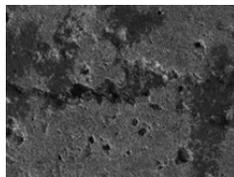


Figura 342: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio TSUC cepa P.4.1.A y espectros de fluorescencia representativos

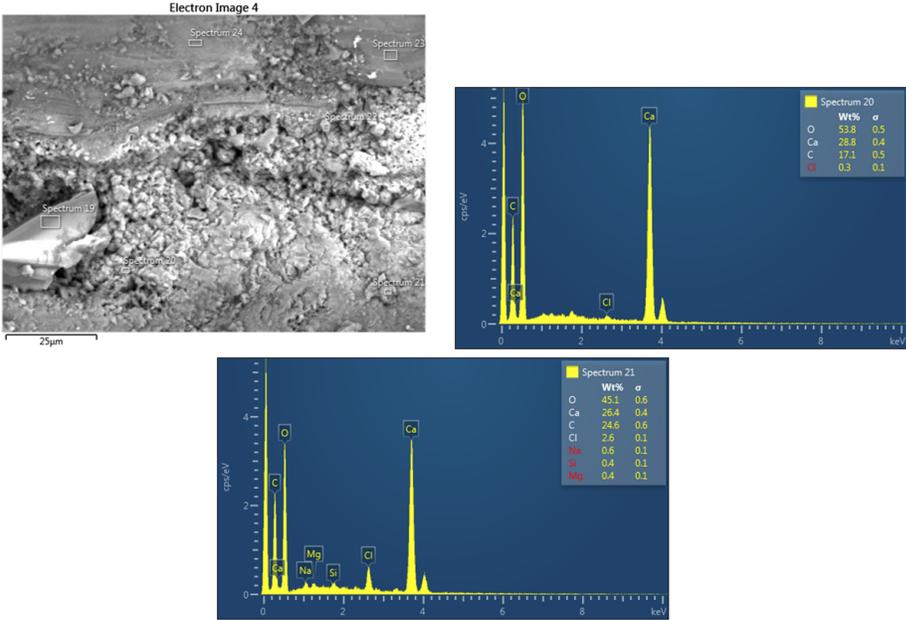


Figura 343: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio TSUC cepa P.5.2.A y espectros de fluorescencia representativos

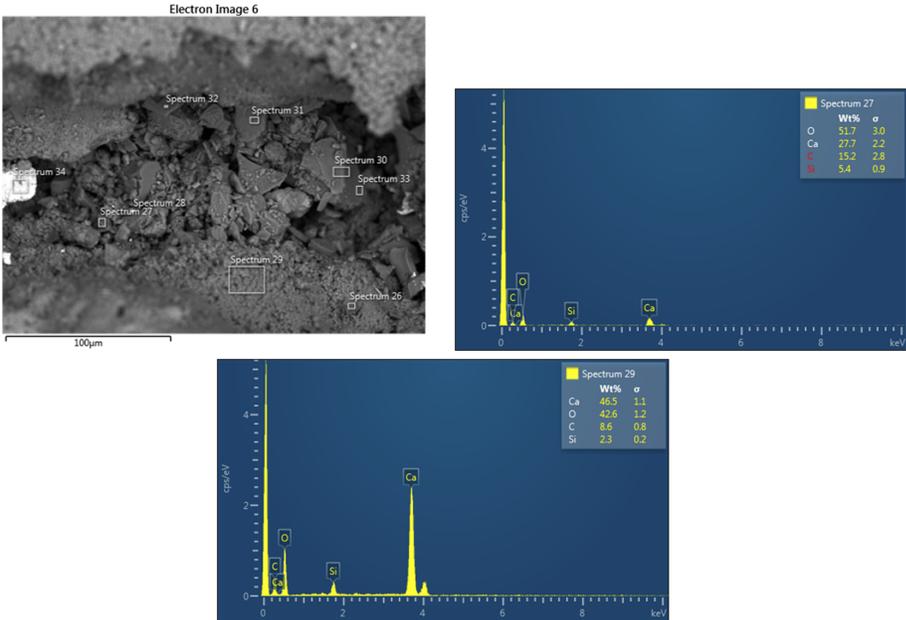


Figura 344: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio TSUC cepa P.5.3.A y espectros de fluorescencia representativos

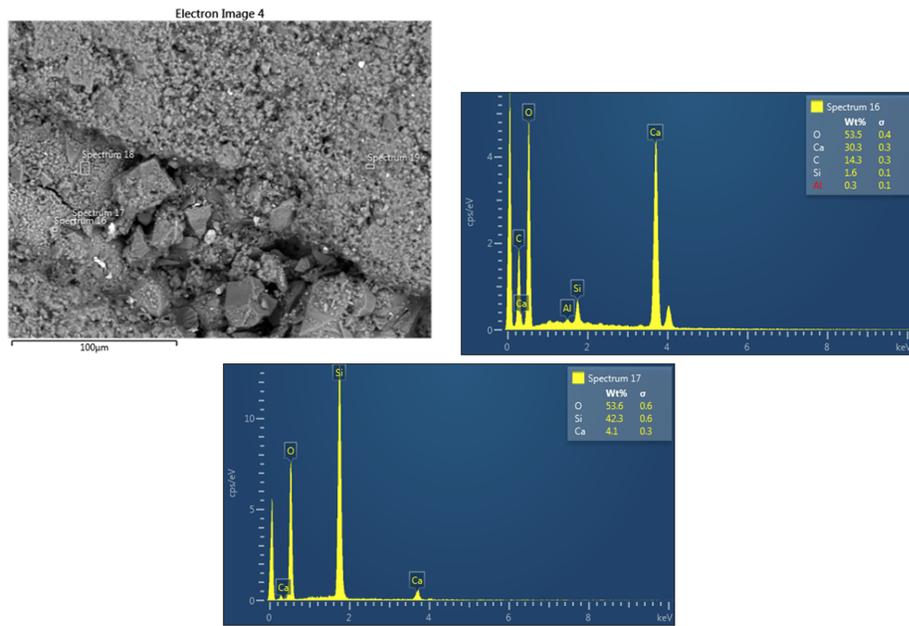


Figura 345: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio LUC cepa P.4.1.A y espectros de fluorescencia representativos

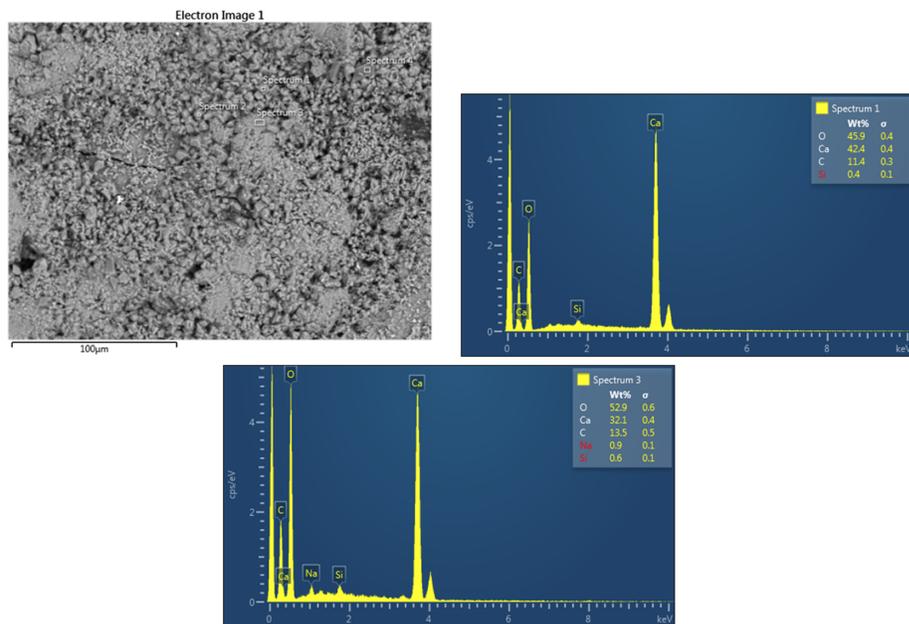


Figura 346: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio LUC cepa P.5.2.A y espectros de fluorescencia representativos

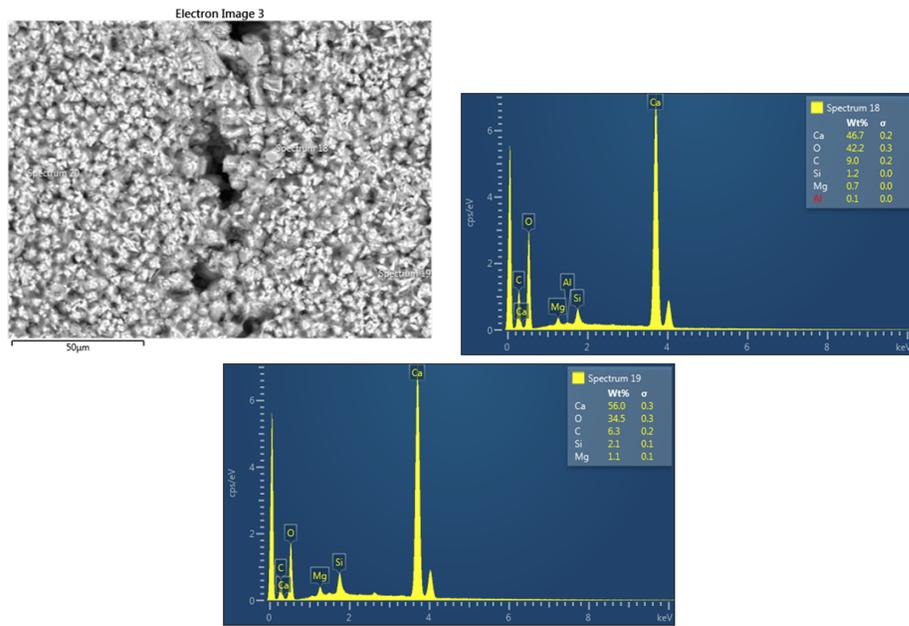


Figura 347: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio LUC cepa P.5.3.A y espectros de fluorescencia representativos

