

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería Química



**Efectividad de tres cepas de bacterias de género *Lysinibacillus*
aisladas en una cantera de caliza para la producción de
biocemento**

Trabajo de graduación presentado por Sofia María Cintrón Maegli para optar al grado
académico de Licenciada en Biotecnología industrial

Guatemala
2021

Efectividad de tres cepas de bacterias de género *Lysinibacillus* aisladas en una cantera de caliza para la producción de biocemento

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería Química

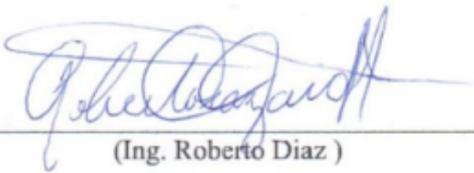


**Efectividad de tres cepas de bacterias de género *Lysinibacillus*
aisladas en una cantera de caliza para la producción de
biocemento**

Trabajo de graduación presentado por Sofia María Cintrón Maegli para optar al grado
académico de Licenciada en Biotecnología industrial

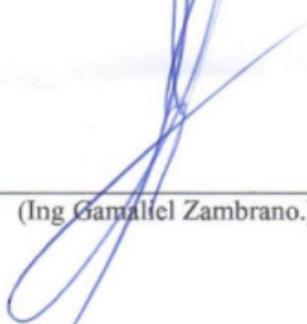
Guatemala
2021

Vo. Bo.:

(f) 
(Ing. Roberto Díaz)

Tribunal Examinador

(f) 
(Ing Roberto Díaz.)

(f) 
(Ing Gamaliel Zambrano.)

(f) 
(Ing. Luis Nuñez.)

Fecha de aprobación: Guatemala, (14 de Diciembre del 2021)

Prefacio

Con este proyecto se presenta la posibilidad de innovar en una industria establecida en Guatemala gracias al aporte y apoyo de la empresa Cementos Progreso S.A

El biocemento es un material que podría ser de sumo beneficio para Guatemala para la preservación de patrimonio arqueológico, la construcción de edificaciones más duraderas y la reducción en la huella de carbono de la empresa. Le damos un agradecimiento especial a todo el personal de CETEC (el personal del laboratorio físico y el laboratorio de microscopía), a Roberto Díaz y Luis Velásquez por su apoyo al proyecto.

También se extiende un agradecimiento formal al Centro de Estudios en Biotecnología de la Universidad del Valle de Guatemala por su apoyo al proyecto.

Índice

	Página
Prefacio.....	i
Lista de cuadros.....	iii
Lista de figuras.....	vii
Resumen	ix
Índice	x
1. Introducción	1
2. Justificación	3
3. Marco teórico	4
4. Objetivos.....	13
5. Metodología	14
6. Resultados.....	20
7. Discusión	37
8. Conclusiones	43
9. Recomendaciones	44
10. Bibliografía.....	45
11. Apéndice.....	49
11.1. Procedimiento detallado.....	49
11.2. Diagrama de flujo	54
11.3. Datos de placa del equipo	55
11.4. Datos originales.....	56
11.5. Ecuaciones y cálculo de muestra.....	69
11.6. Análisis de error y estadística	71
11.7. Datos calculados.....	73

Lista de cuadros

	Página
Cuadro 1: Condiciones para propagación de cepas P.4.1.A, P.5.2.A y 3.5.2.A.....	20
Cuadro 2: Tiempo de duplicación y tasa específica de crecimiento para las cepas estudiadas en dos escalas.....	21
Cuadro 3: Evaluación de rendimiento de esporas por gramo de pellet comparando dos métodos de esporulación.....	21
Cuadro 4: Recuperación de esporas con el método de floculación y filtrado al vacío.....	28
Cuadro 5: Recuperación de esporas con el método floculación y centrifugación.....	28
Cuadro 6: Porcentaje de reparación de grietas para las cepas con medios TSUC, LUC y controles	29
Cuadro 7: Resistencias a compresión promedio para cemento con todas las cepas con medios TSUC, LUC y controles	30
Cuadro 8: Porcentaje de calcita en las muestras de biocemento después de 30 días	34
Cuadro 9: Lecturas de Densidad Óptica (OD por sus siglas en inglés) para las curvas de crecimiento para la cepa P.4.1.A	56
Cuadro 10: Lecturas de Densidad Óptica (OD por sus siglas en inglés) para las curvas de crecimiento para la cepa P.5.2.A.....	56
Cuadro 11: Lecturas de Densidad Óptica (OD por sus siglas en inglés) para las curvas de crecimiento para la cepa P.5.3.A.....	57
Cuadro 12: Conteos iniciales para las curvas de crecimiento para la cepa P.4.1.A.....	58
Cuadro 13: Conteos iniciales para las curvas de crecimiento para la cepa P.5.2.A.....	59
Cuadro 14: Conteos iniciales para las curvas de crecimiento para la cepa P.5.3.A.....	60
Cuadro 15: Datos originales para recuperación de biomasa con el método propuesto	61
Cuadro 16: Datos originales para determinar número de células por gramo de biomasa	62
Cuadro 17: Monitoreo de reparación de grietas para todas las cepas con medio TSUC	62

Cuadro 18: Monitoreo de reparación de grietas para todas las cepas con medio LUC.....	64
Cuadro 19: Cuadro 15: Monitoreo de reparación de grietas para todas las cepas sin medio	65
Cuadro 20: Datos originales de resistencia a compresión para medios TSUC, LUC y control a diferentes edades de curado.....	66
Cuadro 21: Datos originales de cristalografía por difracción de rayos x para cuantificar calcita en las muestras de biocemento con medios TSUC, LUC y controles.....	67
Cuadro 22: Datos calculados para obtener las bacterias totales en solución para las curvas de crecimiento de la cepa P.4.1.A	73
Cuadro 23: Datos calculados para obtener las bacterias totales en solución para las curvas de crecimiento de la cepa P.5.2.A.....	74
Cuadro 24: Datos calculados para obtener las bacterias totales en solución para las curvas de crecimiento de la cepa P.5.3.A.....	75
Cuadro 25: Datos para convertir gramos de biomasa recuperada con el método a células	75
Cuadro 26: Datos calculados para determinar células por gramo de biomasa	76
Cuadro 27: Monitoreo de reparación de grietas con medio TSUC sin datos atípicos.....	76
Cuadro 28: Monitoreo de reparación de grietas LUC sin datos atípicos.....	77
Cuadro 29: Monitoreo de reparación de grietas sin medio sin datos atípicos	79
Cuadro 30: Resultados de análisis HSD de Turkey comparando medios para la resistencia a la reparación de microgrietas en cemento.....	80
Cuadro 31: Resistencias a compresión promedio con las cepas para los medios TSUC, LUC y control.....	81
Cuadro 32: Resultados de análisis ANOVA comparando medios para la resistencia a compresión a 28 días e las muestras de biocemento.....	82
Cuadro 33: Resultados de análisis ANOVA comparando cepas para la resistencia a compresión a 28 días de las muestras de biocemento	83
Cuadro 34: Porcentajes promedio de calcita para las cepas con medio TSUC, LUC y controles después de 30 días de tratamiento	84
Cuadro 35: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A medio TSUC Cubo 1.....	89

Cuadro 36: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A medio TSUC Cubo 2	90
Cuadro 37: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A medio TSUC Cubo 3.....	91
Cuadro 38: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A medio TSUC Cubo 1.....	92
Cuadro 39: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A medio TSUC Cubo 2	93
Cuadro 40: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A medio TSUC Cubo 3	94
Cuadro 41: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A medio TSUC Cubo 1.....	95
Cuadro 42: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A medio TSUC Cubo 2.....	96
Cuadro 43: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A medio TSUC Cubo 3.....	97
Cuadro 44: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A medio LUC Cubo 1.....	98
Cuadro 45: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A medio LUC Cubo 2.....	99
Cuadro 46: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A medio LUC Cubo 3	100
Cuadro 47: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A medio LUC Cubo 1.....	101
Cuadro 48: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A medio LUC Cubo 2	102
Cuadro 49: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A medio LUC Cubo 3	103
Cuadro 50: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A medio LUC Cubo 1.....	104
Cuadro 51: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A medio LUC Cubo 2.....	105
Cuadro 52: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A medio LUC Cubo 3.....	106
Cuadro 53: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A medio TSUC Cubo 1.....	107
Cuadro 54: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A medio TSUC Cubo 2	108
Cuadro 55: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A medio TSUC Cubo 3.....	109
Cuadro 56: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A medio LUC Cubo 1.....	110
Cuadro 57: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A medio LUC Cubo 2.....	111
Cuadro 58: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A medio LUC Cubo 3.....	112

Cuadro 59: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A sin medio Cubo 1.....	113
Cuadro 60: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A sin medio Cubo 2	114
Cuadro 61: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A sin medio Cubo 3.....	115
Cuadro 62: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A sin medio Cubo 1	116
Cuadro 63: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A sin medio Cubo 2	117
Cuadro 64: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A sin medio Cubo 3.....	118
Cuadro 65: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A sin medio Cubo 1.....	119
Cuadro 66: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A sin medio Cubo 2.....	120
Cuadro 67: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A sin medio Cubo 3.....	121
Cuadro 68: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A sin medio Cubo 1	122
Cuadro 69: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A sin medio Cubo 2.....	123
Cuadro 70: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A sin medio Cubo 3.....	124

Lista de figuras

	Página
Figura 1: Polimorfos de carbonato de calcio observados por medio de microscopía electrónica de barrido.....	4
Figura 2: Ruta propuesta de metabolismo de urea de cepa de <i>Lysinibacillus sp.</i> aislada en la cantera de la planta San Miguel, Sanarate, El Progreso, Guatemala.....	12
Figura 3: Curvas de crecimiento para las cepas seleccionadas en medio tripticasa de soya escala 1 L.....	20
Figura 4: Tinción 1 de esporas cepa P.4.1.A (objetivo de inmersión).....	22
Figura 5: Tinción 2 de esporas cepa P.4.1.A (objetivo de inmersión).....	23
Figura 6: Tinción 1 de esporas cepa P.5.2.A (objetivo de inmersión).....	24
Figura 7: Tinción 2 de esporas cepa P.5.2.A (objetivo de inmersión).....	25
Figura 8: Tinción 1 de esporas cepa P.5.3.A (objetivo de inmersión).....	26
Figura 9: Tinción 2 de esporas cepa P.5.3.A (objetivo de inmersión).....	27
Figura 10: Porcentaje de reparación de grietas para cepas P.4.1.A, P.5.2.A, P.5.3.A con medios TSUC, LUC y controles	29
Figura 11: Efecto de las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A con medios TSUC, LUC y Controles en la resistencia a compresión a 28 días para muestras de cemento	31
Figura 12: Efecto de las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A con medio LUC y Controles en la resistencia de compresión a 28 días para muestras de cemento.....	31
Figura 13: Efecto de las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A con medio TSUC y Controles en la resistencia de compresión a 28 días para muestras de cemento.....	32
Figura 14: Efecto de las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A sin medio en la resistencia a compresión a 28 días de muestras de cemento.....	32
Figura 15: Efecto de la cepa P.4.1.A con medios TSUC, LUC y control en la resistencia a compresión a 28 días de muestras de cemento	33

Figura 16: Efecto de la cepa P.5.2.A con medios TSUC, LUC y control en la resistencia a compresión a 28 días de muestras de cemento	33
Figura 17: Efecto de la cepa P.5.3.A con medios TSUC, LUC y control en la resistencia a compresión a 28 días de muestras de cemento	34
Figura 18: Porcentaje de calcita en las muestras de cemento con la cepa P.4.1.A con medios TSUC, LUC y controles.....	35
Figura 19: Porcentaje de calcita en las muestras de cemento con la cepa P.5.2.A con medios TSUC, LUC y controles.....	35
Figura 20: Porcentaje de calcita en las muestras de cemento para la cepa P.5.3.A con medios TSUC, LUC y controles.	36
Figura 21: Curva de crecimiento densidad óptica cepa P.4.1.A escala 1000 mL en triplicado	85
Figura 22: Curva de crecimiento densidad óptica cepa P.5.2.A escala 1000 mL en triplicado.....	85
Figura 23: Curva de crecimiento densidad óptica cepa P.5.3.A escala 1000 mL en triplicado.....	86
Figura 24: Curva de crecimiento densidad óptica cepa P.4.1.A escala 250 mL en triplicado	86
Figura 25: Curva de crecimiento densidad óptica cepa P.5.2.A escala 250 mL en triplicado.....	87
Figura 26: Curva de crecimiento densidad óptica cepa P.5.3.A escala 250 mL en triplicado.....	87
Figura 27:Curvas de crecimiento promedio para las cepas seleccionadas en medio tripticasa de soya escala 250mL.....	88
Figura 28: Resistencias a compresión a distintas edades para cepa P.4.1.A con medios TSUC, LUC y control	125
Figura 29: Resistencias a compresión a distintas edades para cepa P.5.2.A con medios TSUC, LUC y control.....	126
Figura 30: Resistencias a compresión a distintas edades para cepa P.5.3.A con medios TSUC, LUC y control	127
Figura 31: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento con medio TSUC y cepa P.4.1.A.....	128
Figura 32: Espectro EDS 1 de la Figura 31.....	128
Figura 33: Espectro EDS 2 de la Figura 31	129

Figura 34: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento con medio TSUC cepa P.5.2.A.....	129
Figura 35: Espectro EDS 1 de la Figura 34.....	130
Figura 36: Espectro EDS 2 de la Figura 34.....	130
Figura 37: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento con medio TSUC cepa P.5.3.A.....	131
Figura 38: Espectro EDS 1 de la Figura 37.....	131
Figura 39: Espectro EDS 2 de la Figura 34	132
Figura 40: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento con medio LUC cepa P.4.1.A	132
Figura 41: Espectro EDS 1 de la Figura 40.....	133
Figura 42: Espectro EDS 2 de la Figura 40.....	133
Figura 43: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento con medio LUC cepa P.5.2.A.....	134
Figura 44: Espectro EDS 1 de la Figura 43.....	134
Figura 45: Espectro EDS 2 de la Figura 43	135
Figura 46: Imagen SEM para grieta representativa medio LUC cepa P.5.3.A	135
Figura 47: Espectro EDS 1 de la Figura 46.....	136
Figura 48: Espectro EDS 2 de la Figura 46.....	136

Resumen

El cemento y el concreto son materiales con ventajas estructurales que los hacen atractivos para ser utilizados en proyectos de construcción como edificios, carreteras y puentes. Sin embargo, presentan la desventaja de tener un tiempo de vida finito, después del cual son propensos a agrietarse. Existen microorganismos que tienen la capacidad de precipitar calcita, lo cual da como resultado la formación de biocemento y es un proceso que se ha utilizado recientemente para mejorar la resistencia y durabilidad de los materiales de construcción. El objetivo de este trabajo es comprobar la efectividad de tres cepas aisladas en una cantera de caliza en Sanarate, El Progreso, Guatemala con la capacidad de precipitar calcita para producir biocemento. Se presentan los resultados de la metodología recomendada para la propagación, esporulación y recuperación de esporas de las cepas y se concluye que la cepa con mejor proliferación es la P.5.3.A. El biocemento producido al añadir cepas de *Lysinibacillus* con tripticasa de soya, urea y cloruro de calcio se observó que la cepa P.4.1.A presentó una resistencia a compresión de 7551 ± 1.25 psig, lo cual es significativamente mayor que el control de 7039 ± 1.25 psig según el análisis ANOVA. En un período de treinta días sumergidas con medio de urea y cloruro de calcio la cepa P.5.3.A logró rellenar hasta el 74.71% de las grietas observadas en el estudio. El medio sin tripticasa de soya presenta además ventajas económicas en cuanto a costo de producción. Se recomienda hacer un análisis de consumo de sustrato para esta cepa para proceder al diseño de un medio de propagación industrial. Se juzgó la efectividad de las cepas por los resultados de las pruebas para rellenar microgrietas en el cemento, aumentar la resistencia a compresión de la muestra y aumentar el porcentaje de calcita en la muestra de cemento. Según los resultados de las pruebas se concluye que el medio LUC descrito en la sección de metodología en conjunto con las cepas P.4.1.A y P.5.3.A es útil para producir biocemento.

1. Introducción

El cemento y el concreto son materiales con ventajas estructurales que los hace atractivos para ser utilizados en proyectos de construcción como edificios, carreteras y puentes. Sin embargo, presentan la desventaja de tener un tiempo de vida finito, después del cual son propensos a agrietarse. Estas grietas comprometen la estabilidad de las estructuras, ya que además de reducir la resistencia del material, pueden permitir el paso de agua hacia las vigas de hierro que la refuerzan, provocando su corrosión y aumentando el riesgo de colapso (Nilson, 2001). Por estas razones, el mantenimiento y la reparación de grietas en las estructuras del concreto son de suma importancia. Las operaciones de mantenimiento utilizan recursos, energía, producen residuos como gases de efecto invernadero y no resuelven el problema de forma permanente (Achal, Mukherjee, Zhang, 2016). Por esta problemática, se han realizado investigaciones para utilizar microorganismos con actividad de biomineralización para reparar las grietas de concreto, ya que se han mostrado efectivos para rellenar fisuras. La precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente (MICP por sus siglas en inglés) resulta en la formación de biocemento, el cual es utilizado para mejorar la dureza y duración de estos materiales de construcción (Li, *et al*, 2018). La MICP resulta en la acumulación de calcita cuando las bacterias entran en contacto con agua que penetra por las grietas. Esto aumenta la impermeabilidad del concreto, alargando la vida útil de la estructura y restableciendo la dureza del material (Stabnikov, *et al.*, 2013).

Con este proyecto, quiso comprobar la acción de bacterias aisladas del suelo de la cantera en la planta de San Miguel, El Progreso Guatemala para reparar grietas en cemento. Se han identificado tres bacterias del género *Lysinibacillus* sp. que poseen la enzima ureasa y los genes involucrados para la precipitación de calcita (Morales Valenzuela, 2020). Para determinar la posible utilidad económica de dichas bacterias se desarrolló un experimento de *proof of concept* basado en la metodología de Milojevic, *et al*, 2018 al añadir esporas de las bacterias a un mortero de cemento y agrietarlas para observar si estas logran rellenar las fisuras. Para lograr esto, tomaron ciertas acciones. Para empezar, se obtuvieron datos del crecimiento de dichas bacterias a escala de 250 mL, y de 1000mL para producir un volumen de propagación para generar suficiente biomasa de bacterias y así empezar a producir muestras experimentales de biocemento. Por esto, se planteó establecer un protocolo para la propagación de las bacterias en medio de tripticasa de soya en un sistema de fermentación de 1000mL. Para la generación de esporas, se comprobó el rendimiento del procedimiento de esporulación y floculación de esporas descritos por Luna, *et al*, 2005.

En el presente trabajo se presentan los resultados y cálculos de la propagación de las bacterias así como la concentración celular en cada etapa de la curva de crecimiento, tiempo de duplicación y velocidad específica de crecimiento para todas las cepas en dos escalas. También se incluye la metodología de esporulación y recuperación de esporas, así como la confirmación cualitativa de la efectividad del método y los rendimientos de recuperación de biomasa. Adicionalmente se presenta la conversión de gramos de biomasa a células para su manejo simple al hacer un mortero de biocemento. Se proponen dos medios de precipitación para añadir como sustrato para las bacterias en la mezcla de cemento. Se definieron tres parámetros para determinar si la cepa en cuestión con el medio de precipitación fue efectiva para producir biocemento. Se concluye si la cepa es efectiva o no en base a tres parámetros: su capacidad para rellenar microgrietas (de menos de 0.3mm de ancho) en un período de 30 días, su efecto sobre la resistencia a compresión de la muestra de cemento generada y si al finalizar un período de 30 días las muestras tienen un mayor porcentaje de calcita que el control. Se presenta el porcentaje de reparación de grietas en un período de 30 días, el efecto en la resistencia a compresión y la cantidad de calcita en el tiempo para cada una de las cepas con ambos medios, así como el análisis estadístico correspondiente para determinar qué cepa tuvo el mejor desempeño en cada prueba. Se discute por qué fueron descartadas otras metodologías para propagación, así como la incertidumbre para las mediciones de rendimientos del método. Se desarrollan las ventajas y desventajas para cada uno de los medios de precipitación, en base en los resultados para las pruebas de reparación de grietas, resistencias y difracción de rayos x. Según lo observado y los resultados finales obtenidos se plantean una serie recomendaciones para proceder con la investigación enfocada al desarrollo de un producto funcional.

2. Justificación

El cemento es uno de los materiales de construcción más ampliamente utilizados a nivel mundial (Nilson, 2001). Después de cierto tiempo de uso se le debe dar mantenimiento para reparar grietas y microgrietas que comprometen la estabilidad de su estructura. La reparación del cemento es un proceso que requiere de la inversión de recursos naturales, tiempo y dinero. La mayoría de las carreteras en Guatemala están hechas de cemento, pero el costo por kilómetro de carretera en Guatemala es sumamente caro por la extracción de los materiales de construcción y la topografía del país (Medinilla, 2019).

Para reducir el costo de esta operación, se puede explorar la opción de utilizar materiales de construcción innovadores como el biocemento. El biocemento puede funcionar bien para rellenar hoyos en las carreteras, ya que como tiene una menor viscosidad puede penetrar mejor en grietas en la carretera que el cemento convencional. Este material puede utilizarse como base para la construcción de carreteras, o puede aplicarse directamente como un estabilizador o en un camino sin pavimentar como control de polvo (Chu, *et al*, 2015). Este material presenta la ventaja que prolonga la vida del cemento al autorrepararse, con lo cual se podrían destinar los recursos normalmente destinados a su mantenimiento para otros proyectos. Hay muchísimas aplicaciones posibles para el biocemento, como estabilizar pendientes y represas, reducir la solubilidad de la tierra, prevenir la erosión, restauración de monumentos históricos y mejoramiento de suelos arenosos para construcción, lo cual lo hace un material de interés económico para investigar. El biocemento también puede ser un elemento de suma utilidad para la reparación de artefactos arqueológicos, en un país con tanto campo arqueológico como Guatemala (Alhour, 2013).

El desarrollo de un material innovador como el biocemento es de sumo interés para la industria cementera de Guatemala, ya que podría reducir las emisiones de carbono de la empresa y eventualmente puede llegar a ser un proyecto que traerá ganancias económicas. Además de esto la empresa se compromete a apoyar el desarrollo de la investigación y la vocación científica en Guatemala.

3. Marco teórico

3.1 Concreto y cemento

Un material cementante es aquel que tiene las propiedades de adhesión y cohesión necesarias para unir agregados inertes y conformar una masa sólida de resistencia y durabilidad adecuadas. Esta categoría tecnológicamente importante de materiales incluye no solo al cemento, sino también limos, asfaltos y alquitranes como los que se usan para la construcción de carreteras (Nilson, 2001).

El concreto es un material semejante a la piedra que se obtiene mediante una mezcla proporcionada de cemento, arena, grava, otros agregados y agua. El cuerpo del material consiste en un agregado fino y grueso. El cemento y el agua interactúan químicamente para unir las partículas de agregado y conformar una masa sólida. El agua se agrega para iniciar la reacción química y para darle a la mezcla la trabajabilidad adecuada para rodear el acero de refuerzo que se requiere para construcciones que necesitan de mucha fuerza estructural (Nilson, 2001).

3.2 Biomineralización de carbonato de calcio

La biomineralización es la capacidad que tienen los organismos vivos de producir minerales. La producción metabólica de carbonato de calcio (CaCO_3) es uno de los sistemas más abundantes y por lo tanto más estudiados. El carbonato de calcio tiene tres polimorfos cristalinos anhidros, los cuales ordenados por estabilidad termodinámica son: calcita, aragonita y vaterita (Figura 1). La calcita y la aragonita se encuentran en biominerales como cáscaras de huevos, conchas de moluscos y crustáceos. La vaterita es formada y estabilizada solo por algunos organismos y es imposible identificarla en muestras de origen geológico (Rojas Cáceres, 2008).

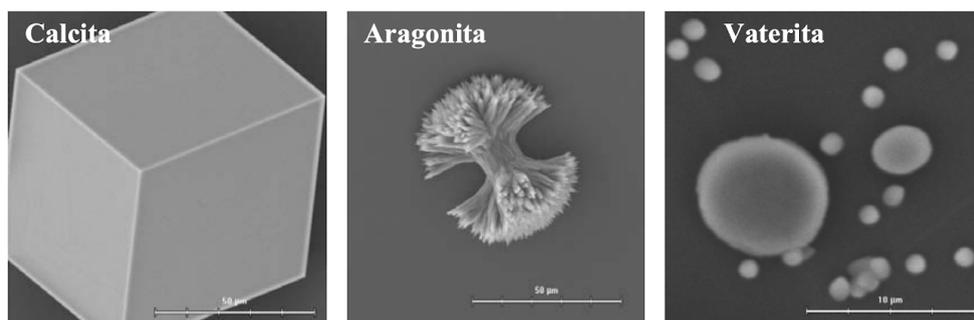


Figura 1: Polimorfos de carbonato de calcio observados por medio de microscopía electrónica de barrido

(Rojas Cáceres, 2008).

La calcita es el polimorfo más estable de carbonato de calcio por su forma cuboidea rectangular. Es uno de los minerales más abundantes de la tierra, constituyendo el 4% del peso de la corteza terrestre. Tiene una dureza de 3/10 en la escala Mohs. La calcita ha sido ampliamente utilizada en la industria de construcción en la forma de piedra caliza y mármol. Actualmente, se utiliza la calcita para la producción de cemento y hormigón (Alhour, 2013). El polimorfo de CaCO_3 obtenido por bioprecipitación depende del microorganismo utilizado, su concentración y actividad ureasa. También depende de factores externos como pH, temperatura, la concentración de carbono inorgánico disuelto, concentraciones de urea y calcio y la presencia de sitios de nucleación para el desarrollo de cristales. La fuente de calcio utilizada también puede afectar el polimorfo de carbonato de calcio obtenido. Pueden influir parámetros como la temperatura y salinidad de la suspensión en la que se encuentran los microorganismos. Diversos procesos metabólicos influyen directamente los factores claves, mientras que las características fisicoquímicas de las células bacterianas pueden hacer que estas actúen como sitios de nucleación de cristales (Anbu, *et al.*, 2016; Paramo, *et al.*, 2015).

La precipitación de carbonato de calcio inducida microbiológicamente (MICP, por sus siglas en inglés) da como resultado la formación de biocemento (BC) y es un proceso que se ha utilizado recientemente para mejorar la resistencia y durabilidad de los materiales de construcción, incluidos los suelos que tradicionalmente no se usan para este fin (Li, *et al.*, 2018).

3.3 Biocemento

La precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente (MICP) es el método más común de biocementación. La tasa de precipitación de CaCO_3 de los microorganismos está correlacionada con el crecimiento celular y es significativamente más rápida que la precipitación química de este mineral (Mengmeng, *et al.*, 2019 ;Alhour, 2013).

El proceso de precipitación de calcita ha sido estudiado desde distintas rutas metabólicas en la búsqueda de mejoramiento de este proceso con finalidades industriales. Se ha encontrado que rutas metabólicas tales como hidrólisis de urea, amonificación de aminoácidos, desnitrificación, reducción anaeróbica de sulfitos y fotosíntesis se encuentran implicadas en el proceso de formación de carbonato de calcio (Wang, *et al.*, 2014). Los tres grupos principales de organismos que exhiben MICP son organismos fotosintéticos como cianobacteria y algas que remueven CO_2 del ambiente, bacterias que reducen el sulfato y bacterias involucradas en el ciclo del nitrógeno. En ambientes acuáticos la forma

más común de MICP es la causada por microorganismos fotosintéticos, pero la calcita también puede precipitarse por organismos heterótrofos (Alhour,2013).

La hidrólisis de la urea por la enzima ureasa es una de las pocas reacciones biológicas que generan iones de carbonato sin una producción de protones asociada. Cuando esta hidrólisis sucede en un ambiente rico en calcio, se precipita el carbonato de calcio (calcita) para formar un material sólido cristalino (Whiffin, 2004). Por la naturaleza restringida dentro de la mezcla de cemento, uno de los mayores retos para la producción de biocemento es encontrar un microorganismo que pueda tolerar condiciones altamente alcalinas, pueda sobrevivir el proceso de mezclado y pueda permanecer viable incluso con acceso limitado a nutrientes y espacio para reparar grietas (Alhour, 2013).

3.4 Propagación y esporulación bacteriana

En los procesos fermentativos industriales es muy importante estudiar el comportamiento de propagación del microorganismo ya que de él depende el rendimiento del producto de interés, entre otras variables. Además, es de suma importancia ya que representa la pérdida o ganancia económica de los procesos. En un proceso de cultivo, el microorganismo necesita de una serie de nutrientes para su crecimiento óptimo. La variabilidad de los nutrientes es considerable, todo dependerá del tipo de cultivo y del microorganismo que se utilice. Sin embargo, se pueden mencionar tres aspectos muy importantes que son indispensables para el crecimiento microbiano: macronutrientes, micronutrientes y requerimientos energéticos (Sepúlveda, 2014).

Los macronutrientes, que son compuestos que son agregados en cantidades de gramos o litros que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg. Los micronutrientes o elementos traza representados por sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co, que se agregan en cantidades de miligramos por litro. La formulación tiene que ver con los aspectos cuantitativos de los medios, es decir, deben establecer la concentración de cada componente a utilizar. Una primera aproximación con respecto a las cantidades a utilizar de las diversas fuentes la da el conocimiento de la composición de la biomasa del microorganismo al ser empleado. Una composición elemental y típica de biomasa es (en peso seco): carbono 46-48; nitrógeno, 7-12; fósforo 1-3; azufre, 0.5-1 y magnesio, 0.5-1. Es decir, que si queremos formular un medio para producir una determinada cantidad de biomasa debemos promover las distintas fuentes que aseguren como mínimo las cantidades de elementos que deben ser suministrados. Además, la composición de un medio mínimo también tiene en cuenta los requerimientos de las fuentes de energía. El crecimiento de un cultivo bacteriano es una sucesión de fases, caracterizadas por las variaciones de la tasa de crecimiento Monod, (1949), aunque en ocasiones algunas de estas fases pueden estar ausentes o poco notables (Sepúlveda, 2014).

1. Fase de retraso, nula tasa de crecimiento.
2. Fase de aceleración, aumenta la tasa de crecimiento.
3. Fase exponencial, tasa de crecimiento constante.
4. Fase de retraso, se reduce la tasa de crecimiento
5. Fase estacionaria, nula tasa de crecimiento.
6. Fase de declive, tasa de crecimiento negativo.

El crecimiento celular se determina midiendo el número de células o la masa celular. La determinación de la concentración celular, se calcula de diversas maneras, dependiendo de las características físicas de los microorganismos, principalmente su tamaño. El número de células se puede medir en organismos unicelulares (bacterias y levaduras) utilizando un microscopio o método directo. El recuento directo se puede hacer de dos formas, en muestras secas sobre un portaobjetos, o en muestras líquidas. Con muestras líquidas se emplean las cámaras de recuento celular (cámara de Neubauer, cámara de Hausser, cámara de Howard, cámara de Sedgewick-Rafter), que, en esencia, son portaobjetos modificados, cuya superficie de vidrio está marcada con una rejilla con pequeños cuadrados de área conocida. Cada cuadrado de la parrilla puede contener un pequeño volumen conocido. En el microscopio se puede contar el número de células por cada unidad de área de la parrilla. La conversión de ese valor a número de células por mililitro de suspensión original se hace fácilmente multiplicando por un factor de conversión que depende del volumen de tipo de cámara (Sepúlveda, 2014).

La temperatura es uno de los factores que más influye en el crecimiento de microorganismos. A temperaturas muy frías o muy calientes los microorganismos no crecerán. Se pueden distinguir cuatro grupos relacionados con su temperatura de crecimiento: 1) psicrófilos (-5-30°C), con óptimas de 10 y 20°C; mesófilos (10-45°C), con óptimas de 20 y 40°C; termófilos (25-80°C), óptimas 50 y 60°C y; hipertermófilos (80-120°C), óptimas 100 y 115°C (Sepúlveda, 2014).

La medida de concentración de iones hidrógeno (pH), tiene también un marcado efecto sobre la velocidad de crecimiento y en el rendimiento de algún producto. El pH para una especie presenta generalmente un máximo denominado pH óptimo. En bacterias el pH óptimo varía entre 6.0 y 8.0; en levaduras entre 4.0 y 6.0 y en mohos entre 3.0 y 7.0 (Sepúlveda, 2014).

Algunas bacterias gram positivas pueden formar una estructura especial inactiva de resistencia, denominada endospora o spora. Se desarrollan dentro de células bacterianas vegetativas (por eso la denominación de endospora) de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, entre otros. Estas estructuras son resistentes a situaciones vitales estresantes como el calor, la desecación, la radiación ultravioleta, los ácidos y los desinfectantes químicos. Debido a su resistencia y al hecho de que varias

especies de bacterias formadoras de esporas son agentes patógenos peligrosos, las esporas tienen gran importancia en microbiología alimentaria, industrial y médica. En el ambiente, las endosporas permiten la supervivencia de las bacterias cuando la humedad o los nutrientes son escasos. Se pueden observar con el microscopio óptico y electrónico (Reyes Carrascal, 2015).

Está bien establecido que las propiedades de las esporas bacterianas se ven afectadas por las condiciones durante la esporulación; sin embargo, en la mayoría de los estudios, las esporas se producen de forma rutinaria a partir de agar fortificado o medios líquidos ricos, lo que da como resultado condiciones de esporulación heterogéneas para células individuales. Las condiciones de esporulación homogéneas y la regulación precisa de los parámetros de crecimiento y esporulación son de gran importancia para obtener lotes de esporas reproducibles y homogéneas (de Vries, *et al*, 2004).

3.5 Floculación y sedimentación

Los procesos combinados de floculación y sedimentación constituyen una de las principales alternativas de recuperación de células en suspensión. Es un fenómeno de gran interés biotecnológico, ya que posibilita el uso de sedimentos a escala industrial. Por otro lado, las células bacterianas poseen una tendencia natural a adherirse a las burbujas de aire durante los procesos fermentativos sumergidos y aireados que sugiere la posibilidad de utilizar la flotación para la recuperación de biomasa. Es un procedimiento de separación bien establecido en tecnología mineral y también se utiliza para la recuperación de diversos tipos de materiales biológicos (Luna, *et al*, 2005).

Una vez que se han lisado las células o se han dispersado las biopartículas, a menudo es útil acelerar la etapa de filtración o sedimentación subsiguiente por floculación, es decir, aumentando reversiblemente el tamaño de las partículas que se van a separar. La floculación se produce como resultado de la adición de una sustancia química adecuada llamada "floculante" o de la selección de células que floculan naturalmente para la fermentación. Los floculantes pueden actuar formando "puentes" moleculares entre partículas, en cuyo caso los floculantes suelen ser polímeros u oligómeros. También pueden actuar reduciendo las fuerzas repulsivas entre las células, normalmente reduciendo la fuerza del campo electrostático. El cloruro cálcico o cloruro de calcio es un compuesto químico mineral se utiliza como floculante y también como suspensivo para impedir la separación de sólidos (Harrison, Todd &, Rudge, 2003).

La sedimentación es el movimiento de partículas o macromoléculas en un campo inercial (que tiene resistencia al fluido de las partículas). Los campos inerciales más comunes son la aceleración por gravedad o la aceleración por centrifugación. Las aplicaciones de esta operación en la tecnología

de separación van desde el asentamiento debido a la gravedad de toneladas de desechos sólidos y bacterias en plantas de tratamiento de aguas residuales hasta la centrifugación de unos pocos microlitros de sangre para determinar el volumen de células sanguíneas empaquetadas en el laboratorio clínico (Harrison, Todd & Rudge, 2003).

3.6 Determinación de resistencia a la compresión

La norma nacional COGUANOR, se basa en la norma ASTM C109/109M-16a *Standard Test Method for Compressive Strength of Hydraulic Cement Mortars (Using 2-in. or [50-mm] Cube Specimens)*. Este método de ensayo cubre la determinación de la resistencia a la compresión de morteros de cemento hidráulico, utilizando especímenes cúbicos de 2 pulg o [50 mm]. El mortero usado consiste en 1 parte de cemento y 2.75 partes de arena dosificados en masa. Los cementos portland o portland con aire incorporado son mezclados con relaciones especificadas de agua-cemento. El contenido de agua para otros cementos es el suficiente para obtener una fluencia de 110 ± 5 en 25 golpes de la mesa de ensayo de flujo. Los cubos de ensayo 50 mm (2 pulg) se compactan por apisonamiento en dos capas. Los cubos se curan un día en los moldes y luego se desmoldan y se sumergen en agua de cal hasta ser ensayados. Este método de ensayo provee un medio para la determinación de la resistencia a la compresión del mortero de cemento hidráulico y otros morteros, los resultados se pueden usar para determinar el cumplimiento con las especificaciones (COGUANOR, 2019).

3.7 *Lysinbacillus spp.*

El género *Lysinbacillus* consiste en bacterias gram positivas, formadas por células móviles en forma de bastones que pueden producir endosporas bajo condiciones de estrés. Por lo general las bacterias pertenecientes a este género presentan resultados positivos para las pruebas de oxidasa y catalasa. Por lo general presentan resultados negativos para la producción de indol, sulfuro de hidrógeno y reducción de nitratos. Este género ha sido investigado por sus capacidades como biopesticida, propiedades para la biorremediación, capacidad antimicrobiana y baja patogenicidad en humanos. La especie más estudiada de este género es *L. sphaericus* (Miwa, *et al*, 2009)

3.8 Cristalografía por difracción de rayos x

Los minerales se definen como sólidos homogéneos naturales con una composición química definida, pero no generalmente fija, y una disposición atómica ordenada. Las claves de esta definición son la composición química y la estructura cristalina y la gran mayoría de sus características dependen de estas. La difracción de rayos X con el método de polvo, DRXP, es una técnica que proporciona una

información detallada sobre la estructura cristalina de cualquier sólido cristalino, incluidos los minerales, por lo que probablemente es la herramienta más importante en la identificación de minerales en suelos y rocas. La interacción de los rayos X con los átomos de un mineral produce un diagrama de difracción, el cual es característico de dicho mineral (Benavente, *et al*, 2012).

Cuando se analiza una muestra problema polimineral, la posición de los picos de cada mineral en la mezcla no varía, pero sí su intensidad (cuantificada como la altura o el área del pico). La intensidad de un pico de difracción en la mezcla depende de varios factores, aunque destaca la concentración del mineral en la mezcla (cuanta mayor sea su concentración, mayor será la intensidad del pico); y su poder reflectante (para una misma concentración, cuanto mayor es su poder reflectante menor es su intensidad). En general, esta característica hace que el diagrama de difracción de polvo se considere como la huella dactilar de la fase cristalina que lo ha producido, pudiendo ser usado para su identificación. aceptado que la difracción de rayos X puede plantear problemas de resolución y, por lo tanto, generar incertidumbre cuando un mineral tiene una concentración menor del 3-5%, por lo que su abundancia en la mezcla problema no puede ser cuantificada de forma certera (Benavente, *et al*, 2012).

3.9 Microscopía electrónica

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento capaz de ofrecer un variado rango de informaciones procedentes de la superficie de una muestra. Su funcionamiento se basa en barrer un haz de electrones sobre un área del tamaño deseado, mientras en un monitor se visualiza la información seleccionada. Una de las funciones principales para este equipo es el detector de rayos X (EDS) que recibe los rayos X procedentes de cada uno de los puntos de la superficie sobre los que pasa el haz de electrones. La energía de cada rayo X es característica para cada elemento, por lo que se puede obtener información analítica cualitativa y cuantitativa del área analizada (Bugliani, *et al*, 2012)

3.10 Antecedentes

Muchos ingenieros se han inspirado en la naturaleza en su búsqueda para diseños eficientes. Los científicos que estudian materiales han propuesto técnicas biológicas para el mejoramiento de las propiedades de materiales ingenieriles (De Belie, 2012). Durante los últimos 20 años, se han realizado esfuerzos para mejorar las propiedades de materiales cementantes utilizando MICP, ya que se ha demostrado que la adición de microorganismos puede reducir la permeabilidad y incrementar la fuerza compresiva del sistema al sellar microgrietas que se producen en la estructura. También se han

realizado estudios para determinar el potencial de estos microorganismos de sobrevivir en un ambiente hostil como lo es el cemento. Dentro de las condiciones que se deben tomar en cuenta para los microorganismos, hay un pH elevado, temperaturas elevadas durante la hidratación y la escasez de nutrientes en el medio. (Williams, *et al*, 2019). Esta problemática se ha intentado resolver por medio de la adición de esporas al mortero utilizado, ya que las esporas pueden resistir las altas temperaturas, humedad y otras condiciones hostiles del medio ambiente (Miljevic, *et al*, 2018). También se han realizado investigaciones agregando *Sporosarcina pasteurii* con licor de urea y maíz a un mortero de cemento y arena, donde se lograron reparar grietas de hasta 0.2 mm y disminuir la permeabilidad del material (Amiri, *et al*, 2017). También se ha utilizado la acción precipitante de *S.pasteurii* para mejorar las propiedades de agregados reciclados en un mortero de cemento. Se encontró que hubo dos factores principalmente influyentes, la fuente de calcio y la hidratación del cemento posterior a su agrietamiento (Zeng, *et al*, 2019).

Además del mejoramiento de propiedades estructurales, los minerales resultantes de MICP han sido utilizados para remover contaminantes radioactivos, iones de calcio de fuentes de agua, protección y para restauración de monumentos (Alhour, 2013).

Se ha comprobado que las bacterias de género *Lysinibacillus* aisladas aisladas del suelo de la cementera de Cementos Progreso ubicada en Sanarate, El Progreso tienen actividad ureasa y precipita carbonato de calcio, por lo que se cree que será efectiva para la producción de biocemento (Morales Valenzuela, 2020, Heredia Velasquez, 2019).

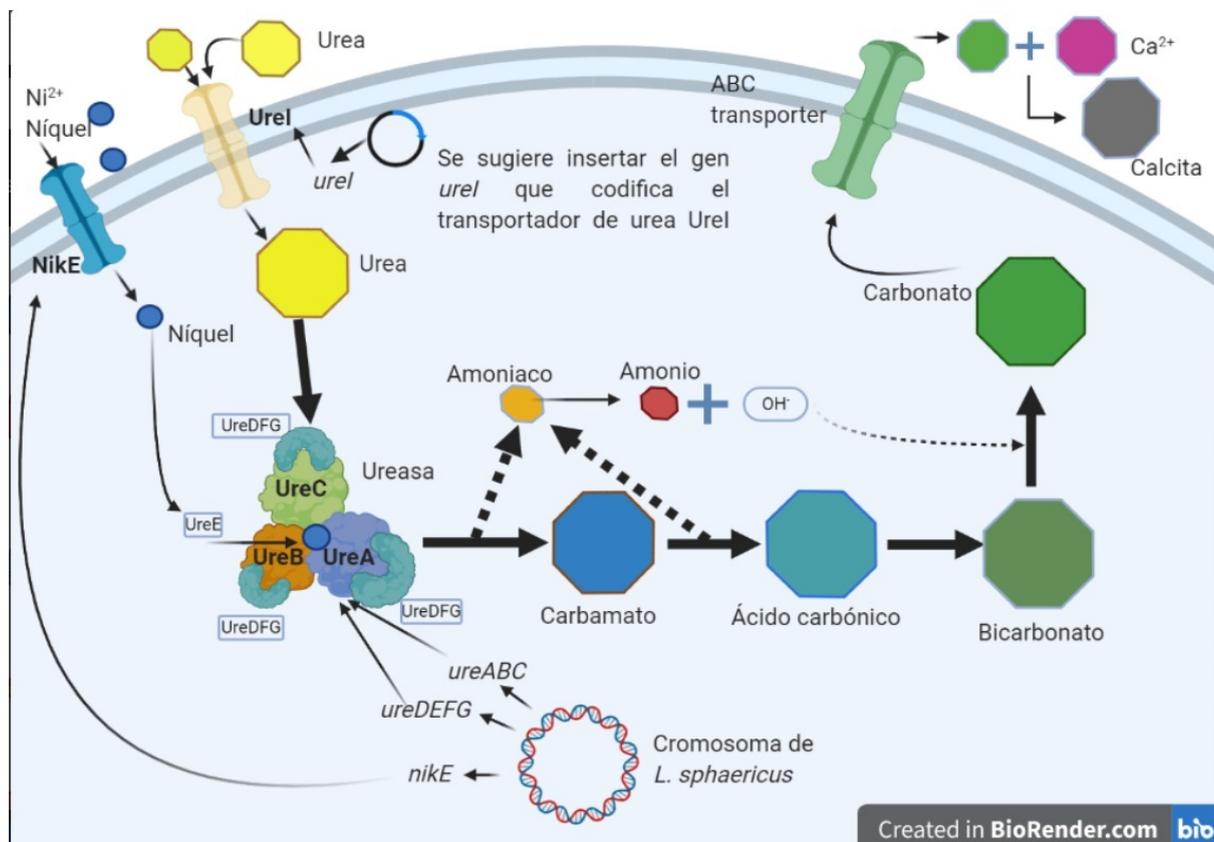


Figura 2: Ruta propuesta de metabolismo de urea de cepa de *Lysinibacillus sp.* aislada en la cantera de la planta San Miguel, Sanarate, El Progreso, Guatemala (Morales Valenzuela, 2020).

El gen *ureI* identificado en las cepas conforma un transportador de urea y el gen *nikT* conforma un transportador de níquel, por lo que se cree que al agregar níquel al medio la capacidad biocementante de las cepas aumentará. Otra forma indirecta de aumentar la actividad de ureasa es la presencia de Ba^{2+} y citrato (2-20 mM) (Morales Valenzuela, 2020).

4. Objetivos

4.1 General

- Determinar la efectividad de tres bacterias del género *Lysinibacillus* aisladas en la cantera de la planta San Miguel, Sanarate, El Progreso, Guatemala para producir biocemento.

4.2 Específicos

1. Establecer un método para la propagación a 1L del sistema de crecimiento de las bacterias seleccionadas de forma que se genere suficiente biomasa para producir muestras de cemento.
2. Evaluar métodos de inducción de esporulación de las bacterias seleccionadas para su posterior adición a la mezcla de cemento.
3. Monitorear cualitativamente y cuantitativamente el porcentaje de reparación de grietas en las muestras producidas de biocemento por medio de estereoscopía.

5. Metodología

5.1 Sujetos de estudio y reactivación de bacterias

5.1.1. Los sujetos de estudio son 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. Para el estudio se seleccionaron las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A por ser las mayores productoras de carbonato de calcio según Heredia Velasquez, 2019. Se reactivaron las cepas conservadas en glicerol al sembrar una asada en placas de TSA y dejando en incubación a 37°C durante 24 horas.

5.2 Preparación de medios de cultivo

5.2.1 Medio comercial: Para preparar 1L

5.2.1.1 Pesar 25g de caldo tripticasa de soya marca *Innovating Science* y disolver en 1 L de agua destilada

5.2.1.2 Agregar hidróxido de sodio para ajustar el pH a 8

5.3 Curvas de crecimiento

5.3.1 Generar un inóculo del 10% del volumen final del sistema a trabajar y dejar en un shaker a 190 rpm y 37 °C durante 24 horas

5.3.2 Inocular el sistema con 10% del volumen final a trabajar

5.3.3 Apartar 1mL para conteo

5.3.4 Apartar 1mL para medir absorbancia con OD600 con espectrofotómetro NanoDrop 2000c

5.3.5 Dejar sistema en agitación de 190 rpm y 37 °C hasta la siguiente medición

5.3.6 Repetir pasos del inciso c al e cada 90 minutos y repetir hasta que el OD no cambie entre mediciones.

5.4 Esporulación inducida (metodología modificada de Milijevic, et al, 2018 y Luna, et al, 2005)

5.4.1 Método 1

5.4.1.1 Propagar la cepa según el apartado 5.3

5.4.1.2 Después de 6 horas de propagación, introducir el sistema en un baño térmico a 80°C durante 10 minutos

5.4.1.3 Agregar 3.5g/L de cloruro de calcio dihidratado

5.4.1.4 Agitar el sistema a 90 rpm durante 5 minutos y a 40 rpm durante 10 minutos

5.4.1.5 Dejar en reposo 30 minutos

5.4.1.6 Descartar el sobrenadante

5.4.1.7 Filtrar al vacío

5.4.1.8 Secar biomasa en un horno.

5.4.2 Método 2

5.4.2.1 Propagar la cepa según el apartado 5.3

5.4.2.2 Después de 8 horas de propagación, introducir el sistema en un baño térmico a 80°C durante 10 minutos

5.4.2.3 Agregar 3.5g/L de cloruro de calcio dihidratado

5.4.2.4 Agitar el sistema a 90 rpm durante 5 minutos y a 40 rpm durante 10 minutos

5.4.2.5 Dejar en reposo 30 minutos

5.4.2.6 Descartar el sobrenadante

5.4.2.7 Filtrar al vacío

5.4.2.8 Secar biomasa en un horno.

5.5 Recuperación de esporas

5.5.1 Método 1

5.5.1.1 Propagar la cepa según el apartado 5.3

5.5.1.2 Después de 6 horas de propagación, introducir el sistema en un baño térmico a 80°C durante 10 minutos

5.5.1.3 Agregar 3.5g/L de cloruro de calcio dihidratado

5.5.1.4 Agitar el sistema a 90 rpm durante 5 minutos y a 40 rpm durante 10 minutos

5.5.1.5 Dejar en reposo 30 minutos

5.5.1.6 Descartar el sobrenadante

5.5.1.7 Filtrar al vacío

5.5.1.8 Secar biomasa en un horno.

5.5.2 Método 2

5.5.2.1 Propagar la cepa según el apartado 5.3

5.5.2.2 Después de 6 horas de propagación, introducir el sistema en un baño térmico a 80°C durante 10 minutos

5.5.2.3 Agregar 3.5g/L de cloruro de calcio dihidratado

5.5.2.4 Agitar el sistema a 90 rpm durante 5 minutos y a 40 rpm durante 10 minutos

5.5.2.5 Dejar en reposo 30 minutos

5.5.2.6 Descartar el sobrenadante

5.5.2.7 Centrifugar solución rica en esporas en centrífuga eppendorf modelo 5430 R durante 15 minutos a 3000 rpm. Descartar sobrenadante

5.5.2.8 Secar pellet en un horno.

5.6 Cuantificación de esporas por gramo de pellet

5.6.1 Obtener OD del sistema previo al shock térmico para hacer la equivalencia a células viables con las curvas de crecimiento

5.6.2 Inducir esporulación, floccular y secar flóculos según el apartado 5.4 del procedimiento

5.6.3 Pesar 0.01g de flóculo de esporas secas

5.6.4 Hacer diluciones seriadas hasta 1×10^{-7}

5.6.5 Tomar 10µL de dilución y contar en cámara de Neubauer

5.6.6 Realizar en triplicado

5.7 Tinción de esporas

- 5.7.1 Ensamblar un sistema de soporte, pinzas, malla y mechero
- 5.7.2 Realizar frotis de esporas recuperadas
- 5.7.3 Cortar una sección de papel filtro suficiente para cubrir el frotis
- 5.7.4 Colocar portaobjetos sobre la malla con el papel filtro cubriendo el frotis y encender el mechero
- 5.7.5 Colocar el papel filtro sobre el frotis y agregar verde de malaquita constantemente de forma que no se seque durante 5 minutos
- 5.7.6 Apagar el mechero y retirar el portaobjetos cuidadosamente con una pinza. Descartar papel filtro
- 5.7.7 Lavar frotis con agua destilada
- 5.7.8 Cubrir frotis con safranina durante 1 minuto
- 5.7.9 Lavar con agua destilada
- 5.7.10 Observar en microscopio con el objetivo de inmersión

5.8 Definición de medios de precipitación

5.8.1 Medio 1: Trypticase de soya, urea, cloruro de calcio (TSUC)

5.8.1.1 Mezclar la cantidad de cemento para el volumen requerido con 25g/L de medio tripticase de soya liofilizado, de 2% urea (p/v), 2% cloruro de calcio (p/v) y $1 * 10^8$ de esporas por centímetro cúbico

5.8.2 Medio 2: *Lysinibacillus*, urea, cloruro de calcio (LUC)

5.8.2.1 Mezclar la cantidad de cemento para el volumen requerido con 2% urea (p/v), 2% cloruro de calcio (p/v) y $1 * 10^8$ de esporas por centímetro cúbico.

5.9 Prueba de reparación de grietas medio (metodología modificada de Jonkers & Schlangen, 2008)

5.9.1 Generar cubos de morteros normados según una variación de la norma NTG 41003 (ASTMC 109) para evaluar 3 cubos de cemento Ari Plus (OPC de Cementos Progreso), agregando medio TSUC con la esporas de la cepa correspondiente y una proporción de 1:2.75 de volumen de arena.

5.9.2 Después de cuatro días de curado en seco, Agrietar cubos de cemento por medio de prensa hidráulica marca ToniTechnick modelo ToniPACTII

5.9.3 Seleccionar 3 grietas por cubo para monitorear e identificarlas claramente.

5.9.4 Fotografiar las grietas seleccionadas utilizando un microscopio estereoscópico

5.9.5 Sumergir cubos en agua con medio de precipitación según tratamiento agregado durante 18 días y fotografiar grietas nuevamente

5.9.6 Sumergir cubos en agua sin medio durante 15 días más y fotografiar con estereoscopio.

5.9.7 Repetir procedimiento con todas las cepas seleccionadas

5.9.8 Repetir procedimiento para todas las cepas seleccionadas con medio LUC y sin medio (como control)

5.10 Pruebas de resistencia a compresión

5.10.1 Generar 12 cubos normados según la norma COGUANOR versión 2019 escala 1:50 con cemento Ari Plus de Cementos Progreso, agregando medio TSUC con la esporas de la cepa correspondiente y una proporción de 1:2.75 de volumen de arena.

5.10.2 Medir la resistencia a compresión de los cubos según la norma COGUANOR versión 2019 escala 1:50 en las edades de 1,3,7 y 28 días por medio de una prensa hidráulica. Realizar mediciones para todas las cepas del estudio y en triplicado para cada edad.

5.10.3 Repetir procedimiento para todas las cepas seleccionadas con medio LUC y para todas las cepas seleccionadas sin medio (como control)

5.11 Análisis en SEM

5.11.1 A partir de las pruebas de reparación de grietas, seleccionar una grieta representativa para cada cepa y preparar muestra para analizar en microscopio electrónico ubicado en CETEC de marca Jeol, modelo JSM-IT500

5.11.2 Obtener la imagen de los cristales de carbonato de calcio y el espectro de fluorescencia para distintos puntos observados por medio de espectroscopía de fluorescencia de Aztec por Oxford Instruments

5.12 Mineralogía

5.12.1 Cuantificar el carbonato de calcio en estructura de calcita por medio de cristalografía por difracción de rayos x con el difractómetro Empyrean de marca Malvern Panalytical

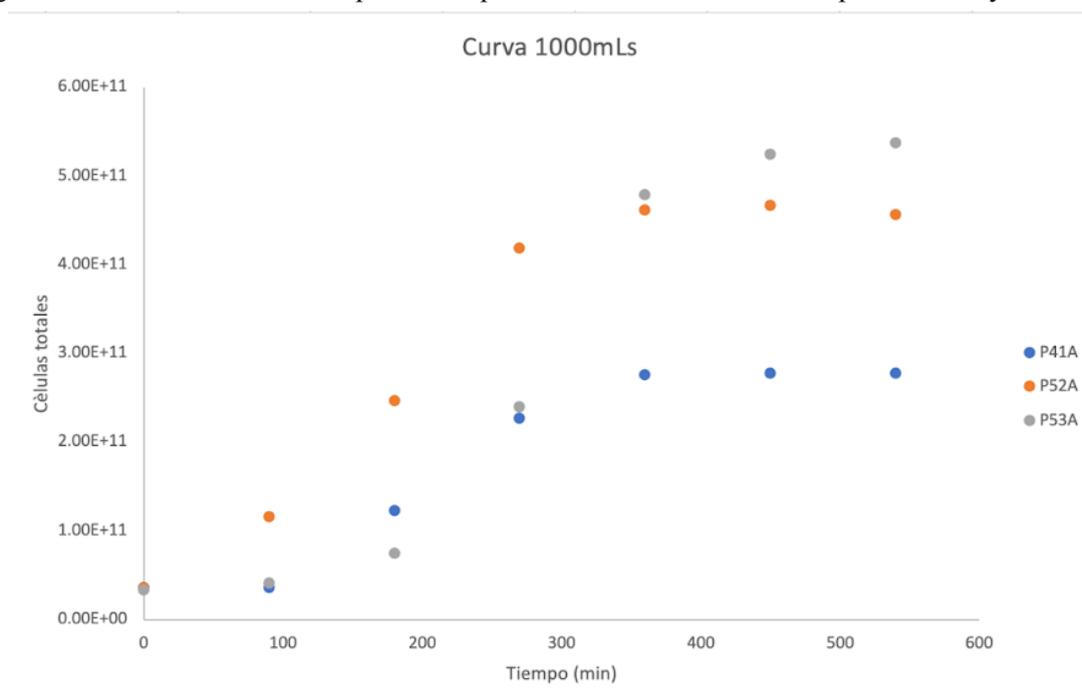
6. Resultados

El método establecido para propagar las bacterias P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A (ver sección 5.3 del apartado de metodología) a escala de 1000ml consiste en agregar un inóculo del 10% (v/v) de un cultivo *overnight* de la cepa seleccionada a un erlenmeyer con medio tripticasa de soya. El pH debe ser ajustado a 8 para propiciar el crecimiento de las cepas de *Lysinibacillus*, ya que son alcalófilas. El tamaño del inóculo se determinó para incentivar el crecimiento bacteriano por medio de *quorum sensing*. Como las bacterias del género *Lysinibacillus* son mesófilas, para lograr un crecimiento acelerado se debe fijar una temperatura de 37 °C. Además, por ser bacterias aerobias facultativas el método emplea una agitación de 190 rpm para oxigenar el medio. Con estas condiciones es necesario fermentar durante 8 horas para alcanzar una concentración celular de 5.13×10^{11} células por litro de P.5.3.A, 4.95×10^{11} células por litro de P.5.2.A. y 2.98×10^{11} células por litro de P.4.1.A. (ver Figura 3).

Cuadro 1: Condiciones para propagación de cepas P.4.1.A, P.5.2.A y 3.5.2.A

Medio	Temperatura	Agitación	Tamaño de inóculo	pH	Tiempo de propagación
Tripticasa de soya	37°C	190 rpm	10% (v/v)	8	7 horas

Figura 3: Curvas de crecimiento para las cepas seleccionadas en medio tripticasa de soya escala 1L



*Células totales en el sistema en diferentes tiempos con el método propuesto de propagación. (Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología).

Cuadro 2: Tiempo de duplicación y tasa específica de crecimiento para las cepas estudiadas en dos escalas

Escala	Cepa	Tasa máxima de crecimiento(μ_{max}) ($\pm 0.013 \text{min}^{-1}$)	Tiempo de duplicación ($\pm 5 \text{min}$)
250 mL	P.4.1.A	0.016	43
	P.5.2.A	0.021	33
	P.5.3.A	0.015	46
1000 mL	P.4.1.A	0.017	41
	P.5.2.A	0.019	36
	P.5.3.A	0.022	32

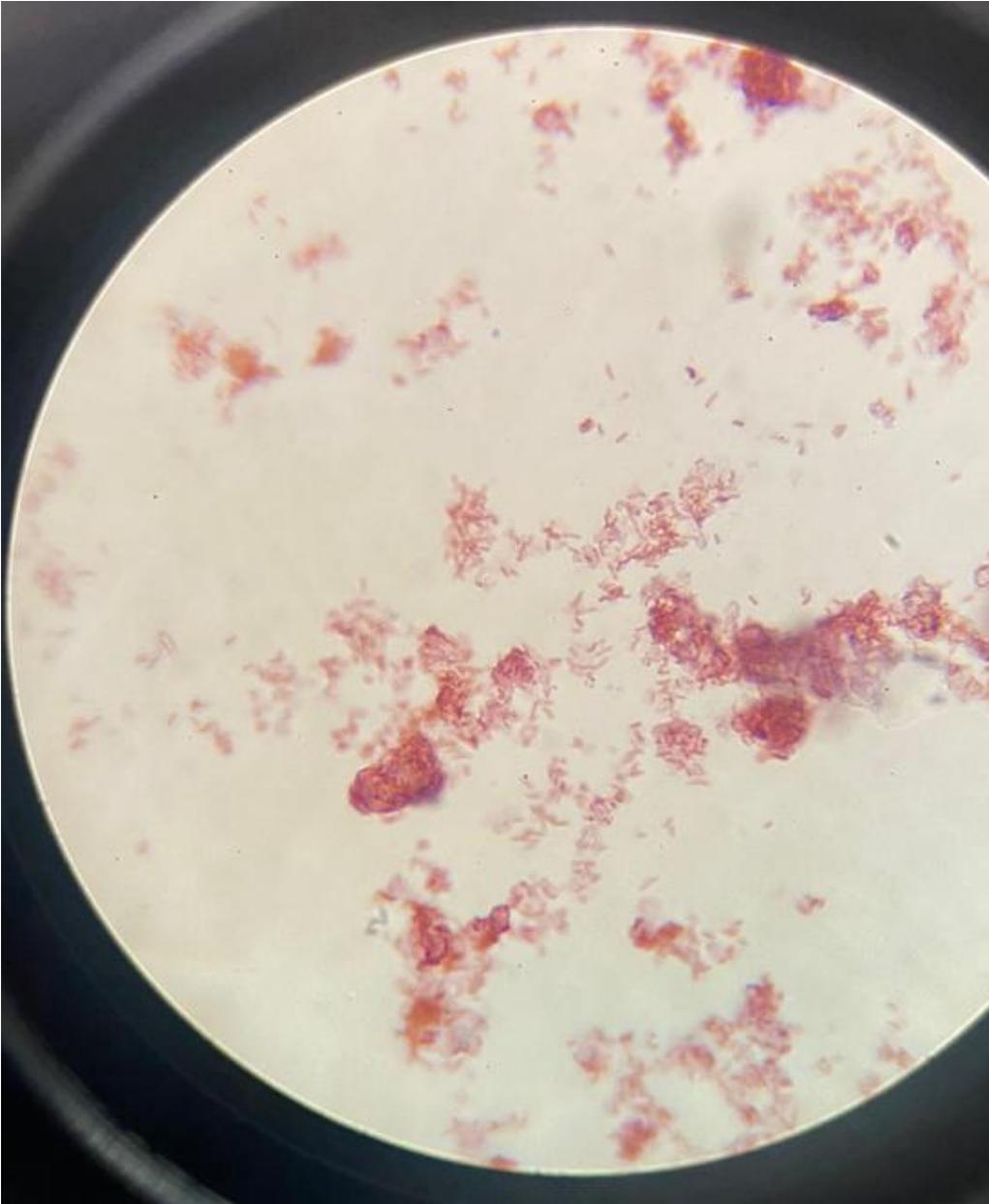
* Datos calculados a partir de la Figura 3, utilizando el programa de curvas de crecimiento microbiano en el lenguaje de programación R. Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología.

Cuadro 3: Evaluación de rendimiento de esporas por gramo de pellet comparando dos métodos de esporulación

Cepa	Método 1	Método 2
	Esporas por gramo de pellet	Esporas por gramo de pellet
P.4.1.A	3.75E+11(\pm)1.88E+10	1.25E+11(\pm)1.88E+10
P52A	1.30E+11(\pm)6.53E+09	9.20E+10(\pm)6.53E+09
P53A	2.58E+11(\pm)1.29E+10	1.03E+11(\pm)1.29E+10

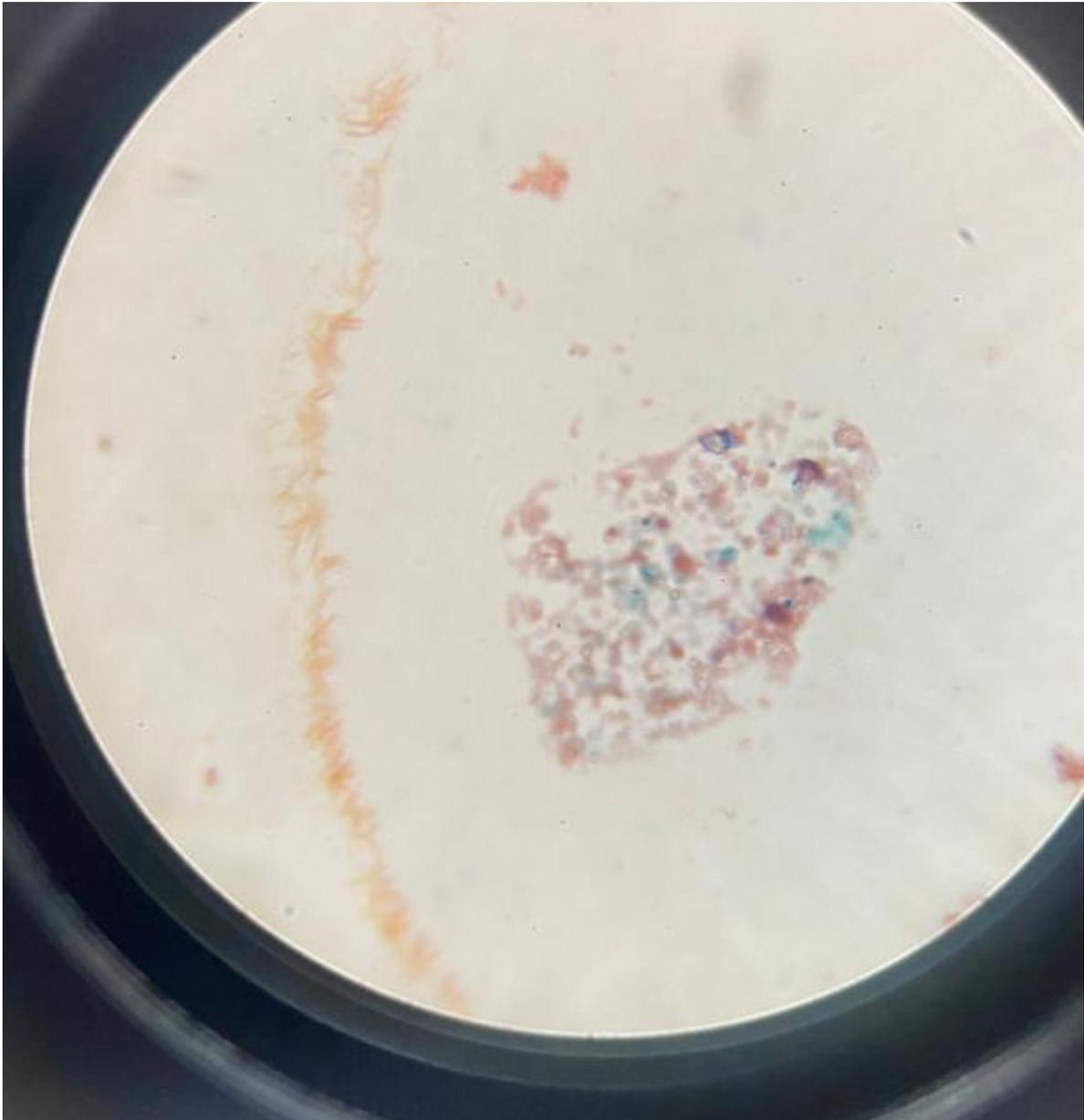
*Notación: Método 1, esporulación inducida durante fase exponencial de crecimiento (ver apartado 5.4.A de la sección de metodología); Método 2, esporulación inducida durante la fase estacionaria de crecimiento (ver apartado 5.4.B de la sección de metodología); Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología.

Figura 4:Tinción 1 de esporas cepa P.4.1.A (objetivo de inmersión)



*Confirmación cualitativa de la formación de esporas con el Método 1 del apartado 5.4 de metodología. La tinción se realizó según el apartado 5.7 de la metodología. (Notación de código de cepa en apartado 5.1 de metodología).

Figura 5:Tinción 2 de esporas cepa P.4.1.A (objetivo de inmersión)



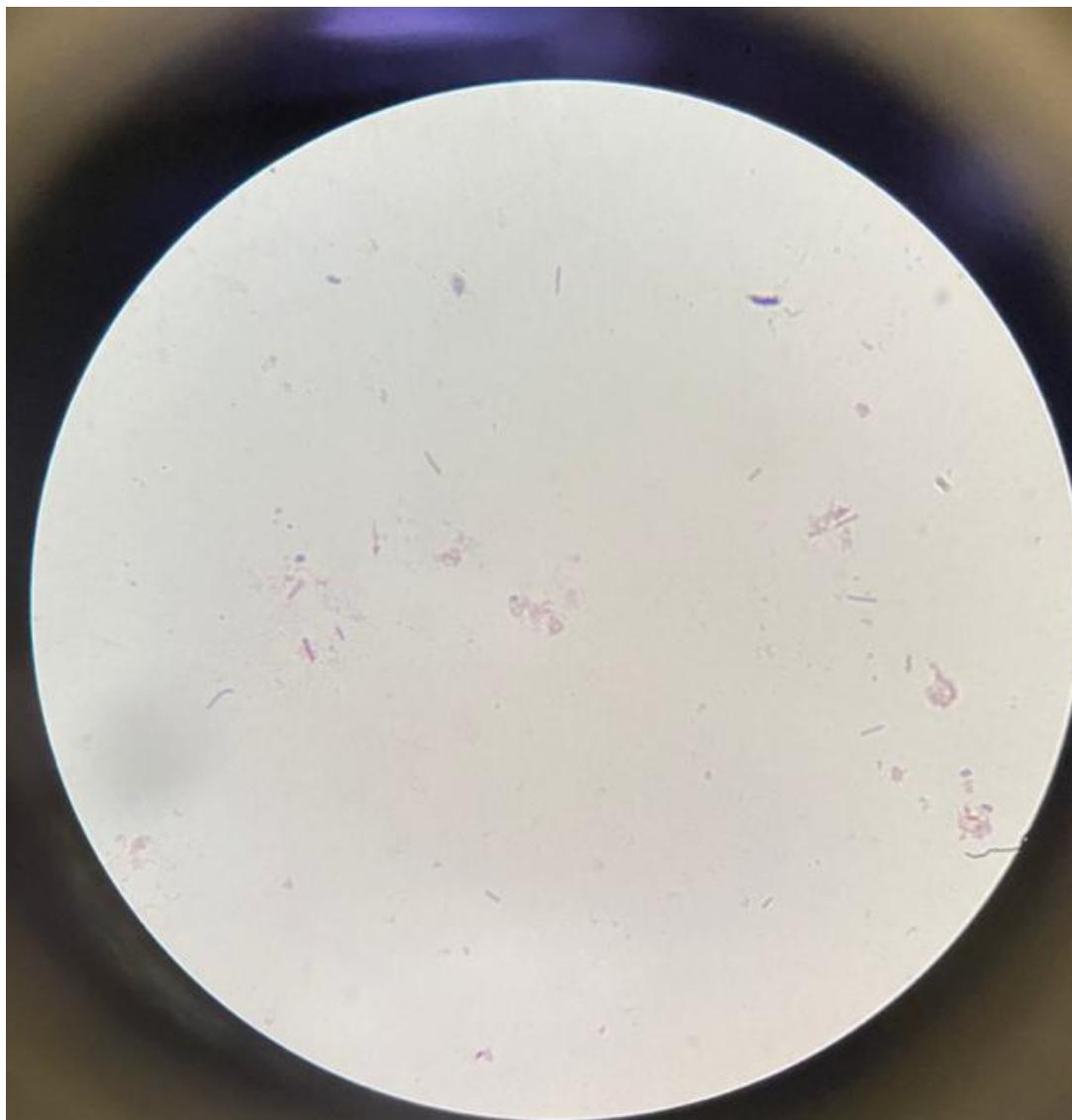
*Confirmación cualitativa de la formación de esporas con el Método 2 del apartado 5.4.B. de metodología. La tinción de esporas se realizó según el apartado 5.7 de la metodología.(Notación de código de cepa en apartado 5.1 de metodología).

Figura 6: Tinción 1 de esporas cepa P.5.2.A (objetivo de inmersión)



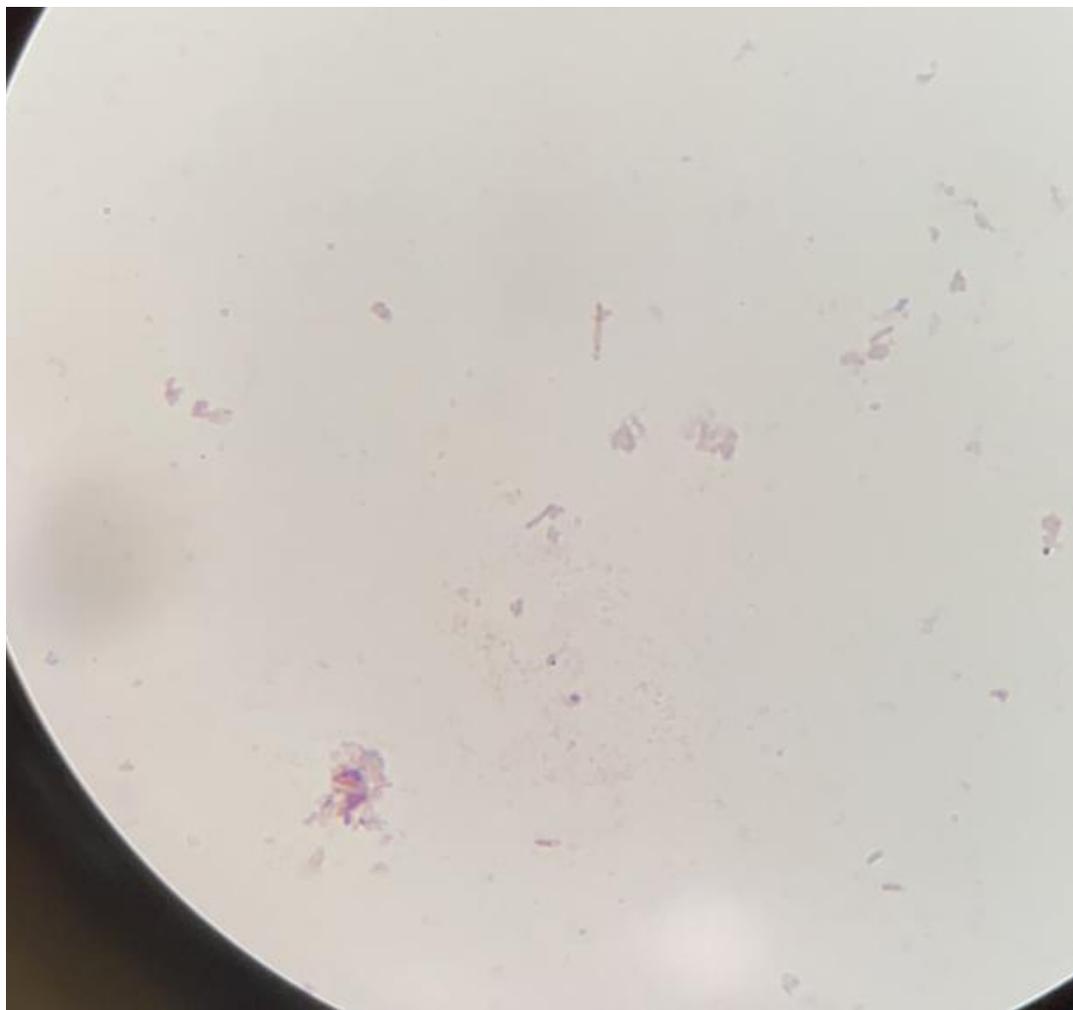
*Confirmación cualitativa de la formación de esporas con el Método 1 del apartado 5.4.A de metodología. La tinción se realizó según el apartado 5.7 de la metodología. Notación de código de cepa en apartado 5.1 de metodología.

Figura 7: Tinción 2 de esporas cepa P.5.2.A (objetivo de inmersión)



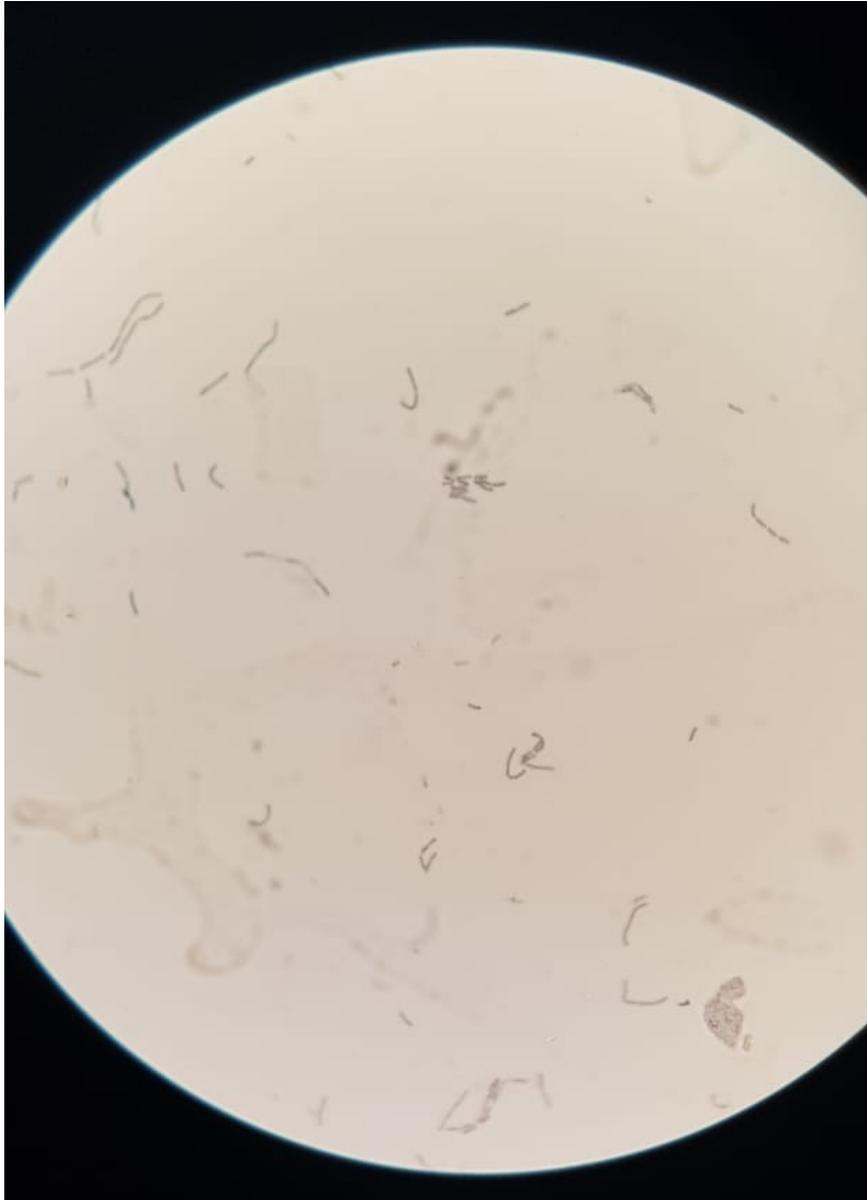
*Confirmación cualitativa de la formación de esporas con el Método 2 del apartado 5.4.B de metodología. La tinción se realizó según el apartado 5.7 de la metodología. Notación de código de cepa en apartado 5.1 de metodología.

Figura 8: Tinción 1 de esporas cepa P.5.3.A (objetivo de inmersión)



*Confirmación cualitativa de la formación de esporas con el Método 1 del apartado 5.4.A de metodología. La tinción se realizó según el apartado 5.7 de la metodología. (Notación de código de cepa en apartado 5.1 de metodología).

Figura 9: Tinción 2 de esporas cepa P.5.3.A (objetivo de inmersión)



*Confirmación cualitativa de la formación de esporas con el Método 2 del apartado 5.4.B de metodología. La tinción se realizó según el apartado 5.7 de la metodología. (Notación de código de cepa en apartado 5.1 de metodología).

Cuadro 4: Recuperación de esporas con el método de floculación y filtrado al vacío

Escala		250mL		1000mL	
Cepa	Esporas por gramo de pellet	Pellet recuperado (+-0.0012g)	Esporas recuperadas	Pellet recuperado (+-0.0012 g)	Esporas recuperadas
P.4.1.A	3.75E+11(±) 1.88E+10	0.107	4.01E+10 (±) 1.88E+10	0.432	1.62E+11 (±) 1.88E+10
P52A	1.30E+11(±) 6.53E+09	0.097	1.26E+10 (±) 6.50E+10	0.293	3.81E+10 (±) 6.50E+10
P53A	2.58E+11(±) 1.29E+10	0.187	4.82E+10 (±) 1.29E+10	0.302	7.79E+10(±) 1.29E+10

*Rendimientos del Método 1 de recuperación de esporas según apartado 5.5.A de la sección de metodología. (Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología).

Cuadro 5: Recuperación de esporas con el método de floculación y centrifugación

Escala		250mL		1000mL	
Cepa	Esporas por gramo de pellet	Pellet recuperado (+-0.0012g)	Esporas recuperadas	Pellet recuperado (+-0.0012 g)	Esporas recuperadas
P41A	3.75E+11(±) 1.88E+10	0.219	8.20E+10 (±) 1.88E+10	0.752	2.82E+11 (±) 1.88E+10
P52A	1.30E+11(±) 6.53E+09	0.396	5.15E+10 (±) 6.50E+10	0.991	1.29E+11 (±) 6.50E+10
P53A	2.58E+11(±) 1.29E+10	0.260	6.70E+10 (±) 1.29E+10	1.265	3.26E+11(±) 1.29E+10

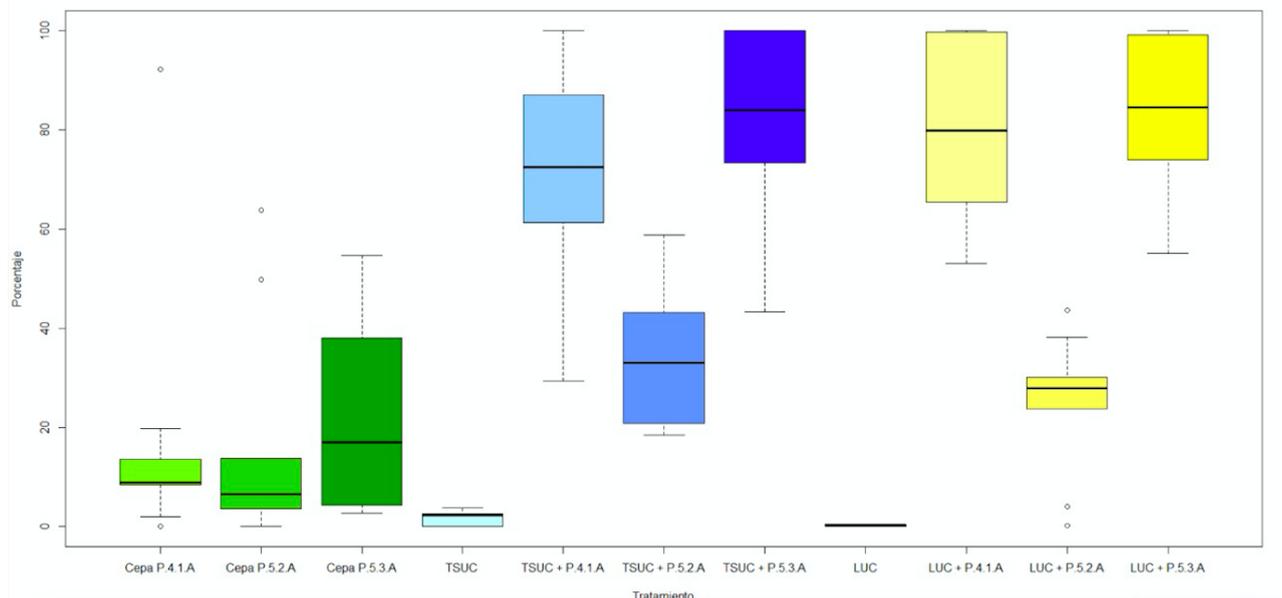
*Rendimientos del Método 2 de recuperación de esporas según apartado 5.5.B de la sección de metodología. (Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología).

Cuadro 6: Porcentaje de reparación de grietas para las cepas con medios TSUC, LUC y controles

Medio	Cepa	Reparación de grietas después de 30 días ($\pm 5\%$)
TSUC	P.4.1.A	64.33%
	P.5.2.A	42.45%
	P.5.3.A	74.71%
	N/A	1.66%
LUC	P.4.1.A	75.27%
	P.5.2.A	30.90%
	P.5.3.A	77.46%
	N/A	0.36%
Blanco	P.4.1.A	27.38%
	P.5.2.A	26.52%
	P.5.3.A	27.39%
	N/A	0.00%

*Resultados cuantitativos de reparación de grietas obtenidos según el apartado 5.9 de la sección de metodología (Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología. Notación de código de medios en apartado 5.8 de la metodología)

Figura 10: Porcentaje de reparación de grietas para todas las cepas con medios TSUC, LUC y controles



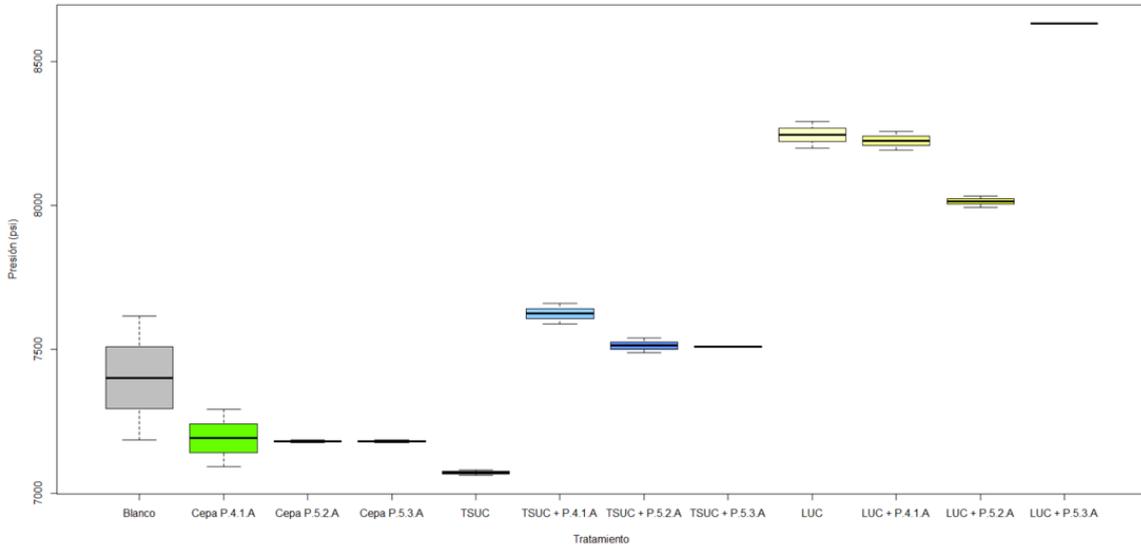
*Resultados cuantitativos de reparación de grietas obtenidos según el apartado 5.9 de la sección de metodología (Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología. Notación de código de medios en apartado 5.8 de la metodología)

Cuadro 7: Resistencias a compresión promedio para cemento con todas las cepas con medios TSUC LUC y controles

Cepa	Día	Medio (± 1.25 psig)		
		TSUC	LUC	Blanco
P.4.1.A	1	3678	3515	3685
	3	5708	5945	5714
	7	6358	6946	6790
	28	7551	8299	7290
P.5.2.Z	1	4109	3671	3822
	3	5606	5815	5803
	7	6979	6850	6284
	28	7228	8034	7400
P.5.3.A	1	4033	4098	3337
	3	5766	6688	5503
	7	6581	7137	5897
	28	7250	8659	7302
NA	1	3850	4027	3552
	3	5508	6256	5489
	7	6613	6943	6258
	28	7039	8342	7169

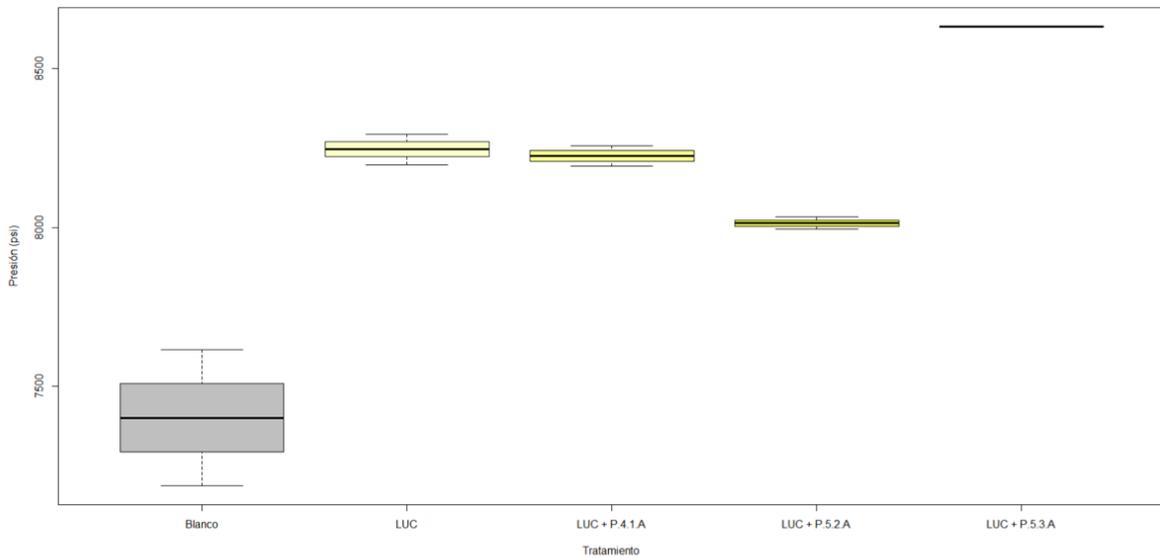
*Resultados obtenidos según el apartado 5.10 de la sección de metodología (Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología. Notación de código para medios en apartado 5.8 de la metodología)

Figura 11: Efecto de las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A con medios TSUC, LUC y controles en la resistencia a compresión a 28 días de muestras de cemento



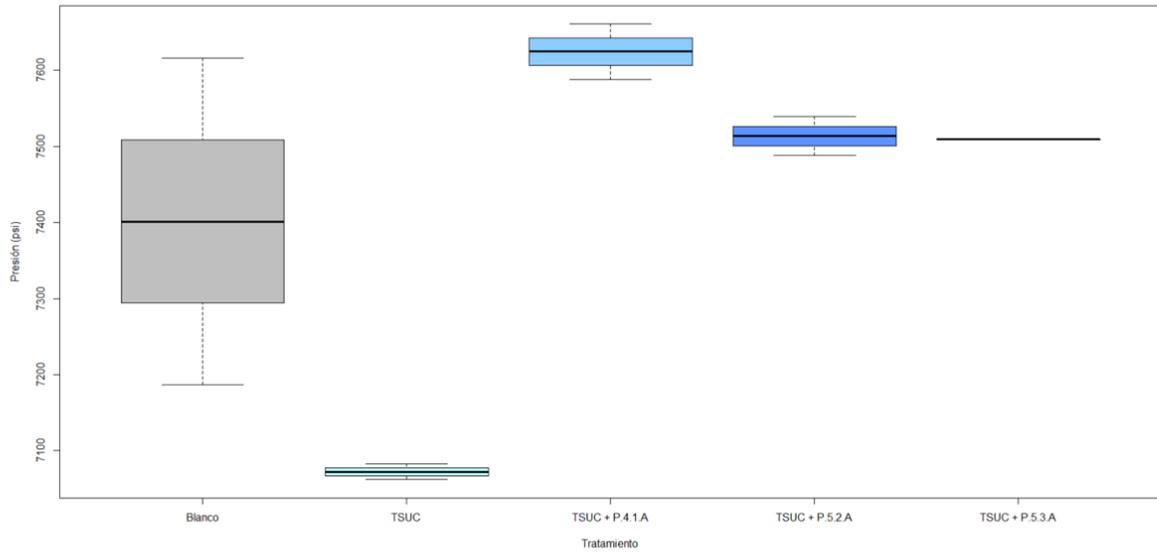
*(Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología. Notación de código para medios en apartado 5.8 de la metodología)

Figura 12: Efecto de las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A con medio LUC y controles en la resistencia a compresión a 28 días de muestras de cemento



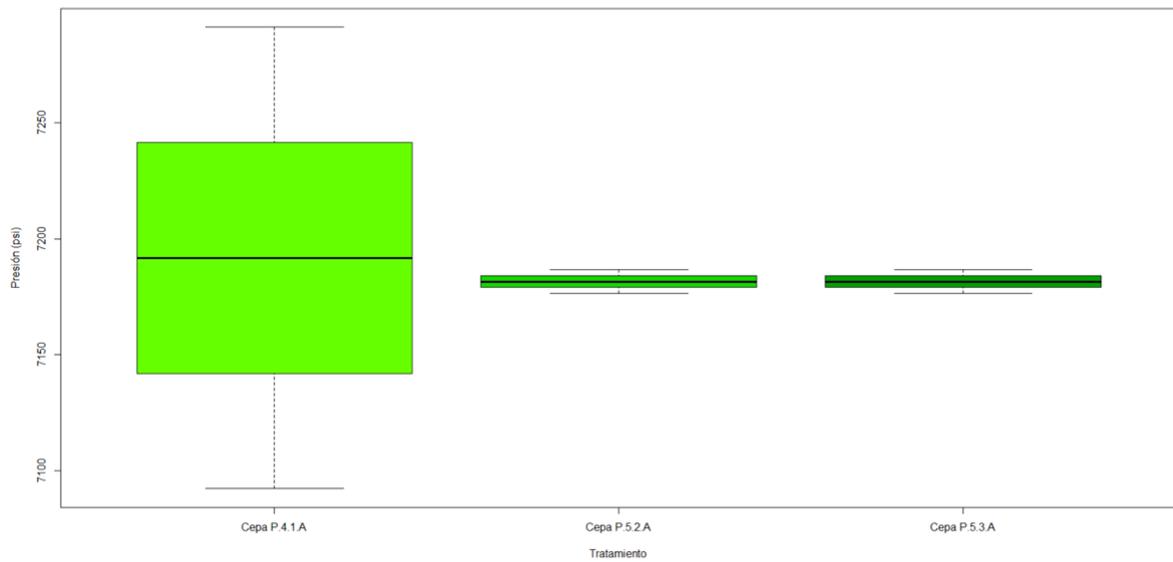
*(Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología. Notación de código para medios en apartado 5.8 de la metodología)

Figura 13: Efecto de las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A con medio TSUC y controles en la resistencia a compresión a 28 días de muestras de cemento



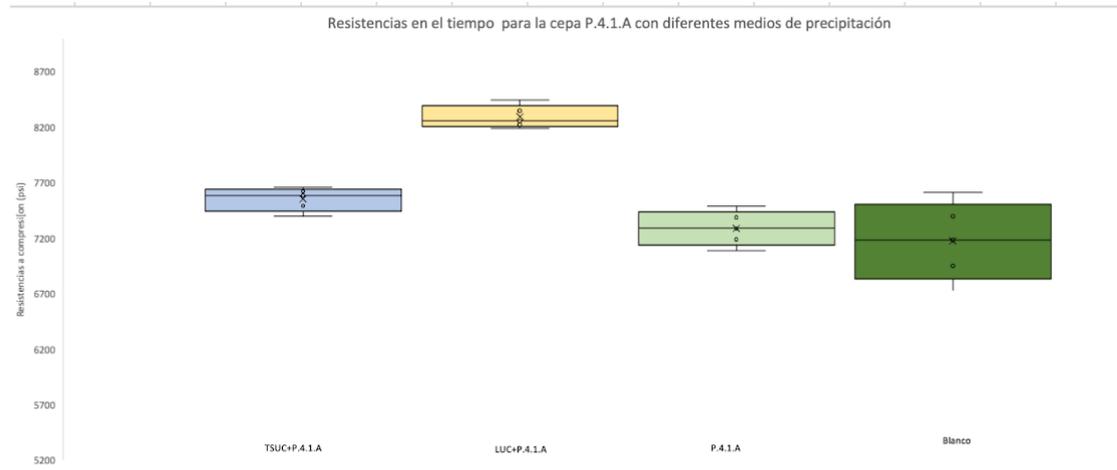
*(Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología. Notación de código para medios en apartado 5.8 de lametodología)

Figura 14: Efecto de las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A sin medio en la resistencia a compresión a 28 días de muestras de cemento



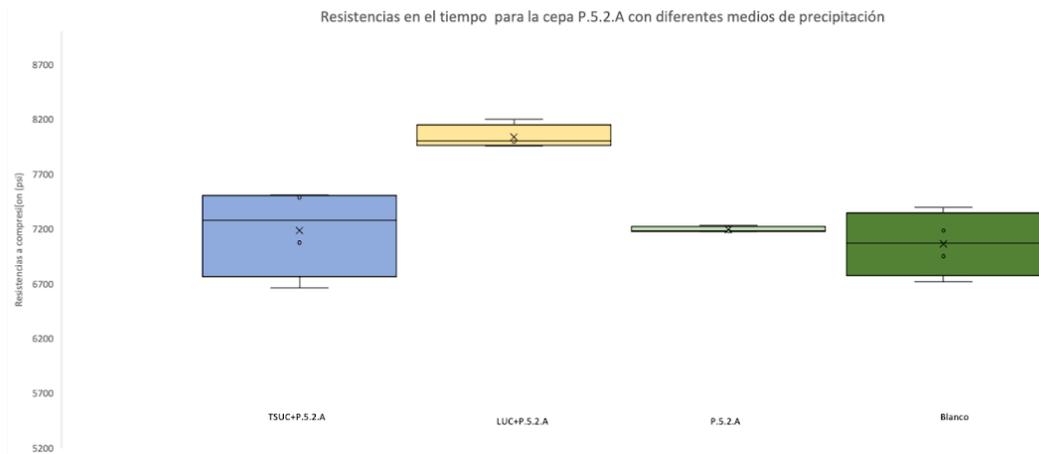
*(Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología.)

Figura 15: Efecto de la cepa P.4.1.A con medios TSUC, LUC y control en la resistencia a compresión a 28 días de muestras de cemento



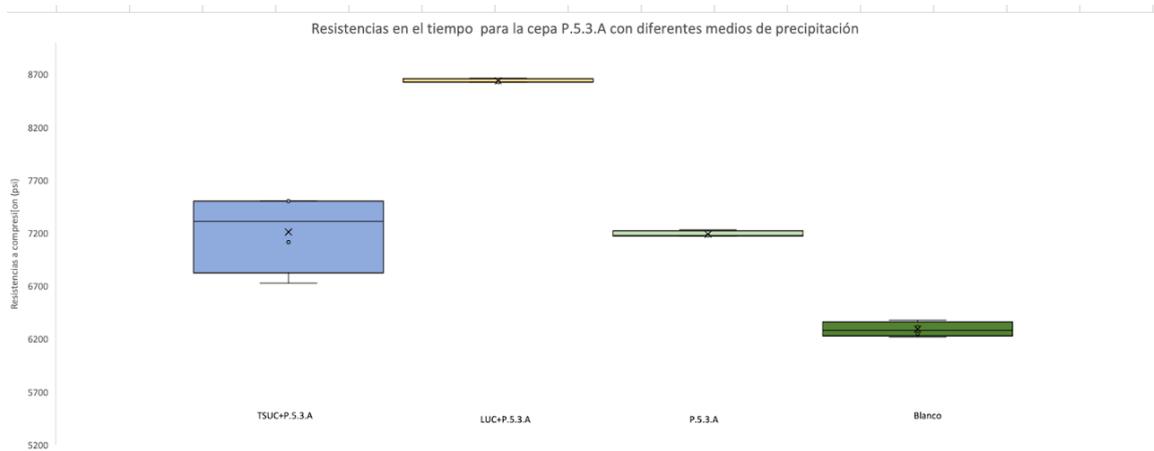
*(Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología. Notación de código para medios en apartado 5.8 de la metodología)

Figura 16: Efecto de la cepa P.5.2.A con medios TSUC, LUC y control en la resistencia a compresión a 28 días de muestras de cemento



*(Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología. Notación de código para medios en apartado 5.8 de la metodología)

Figura 17: Efecto de la cepa P.5.3.A con medios TSUC, LUC y control en la resistencia a compresión a 28 días de muestras de cemento



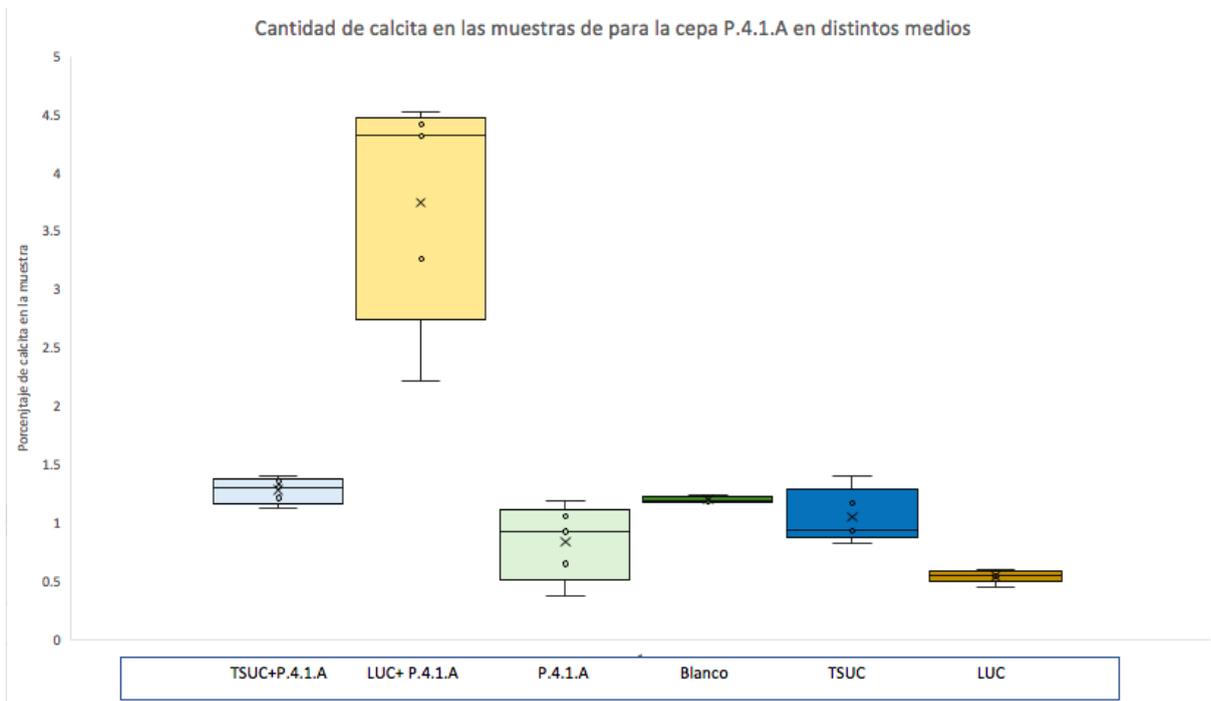
*(Notación de código de cepas en apartado 5.1 de metodología. Notación de código para medios en apartado 5.8 de la metodología)

Cuadro 8: Porcentaje masa masa de calcita en las muestras de biocemento después de 30 días

Medio	Cepa	% de calcita
TSUC	P.4.1.A	1.28
	P.5.2.A	1.50
	P.5.3.A.	1.74
	N-A	1.02
LUC	P.4.1.A	3.69
	P.5.2.A	2.71
	P.5.3.A.	1.65
	N-A	0.51
Blanco	P.4.1.A	0.83
	P.5.2.A	0.59
	P.5.3.A.	0.82
	N-A	1.21

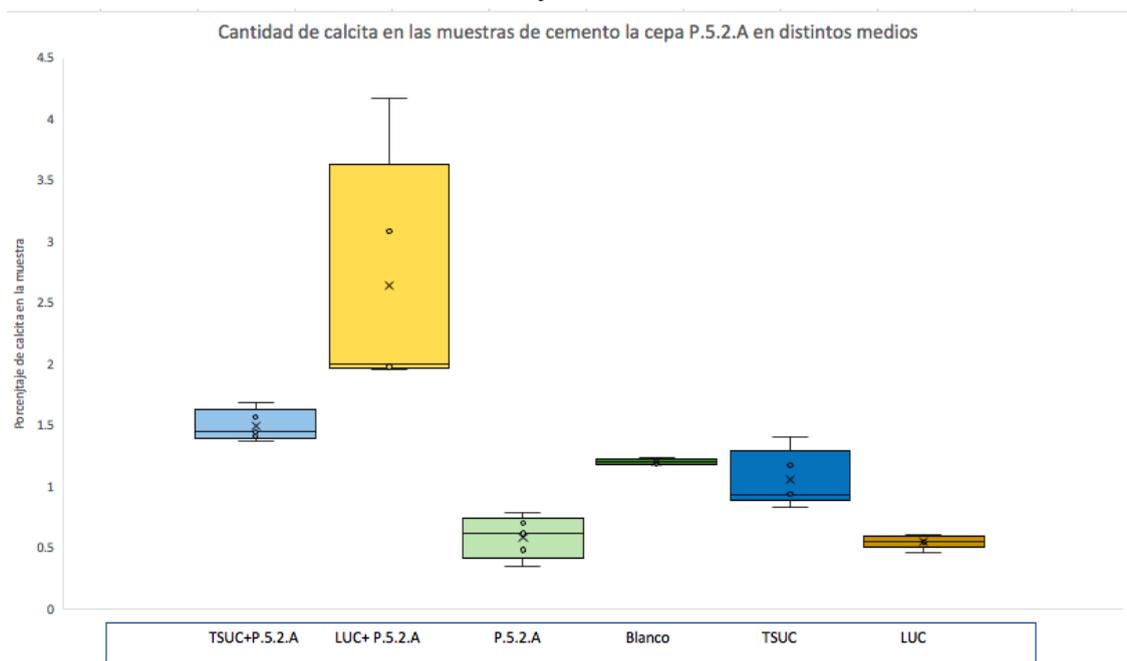
*Cuantificación de calcita obtenida según el apartado 5.11 de la sección de metodología (Notación de código de cepas en apartado A de metodología. Notación de código para medios en apartado 5.8 de la metodología)

Figura 18: Porcentaje de calcita en las muestras de cemento con la cepa P.4.1.A con medios TSUC, LUC y controles



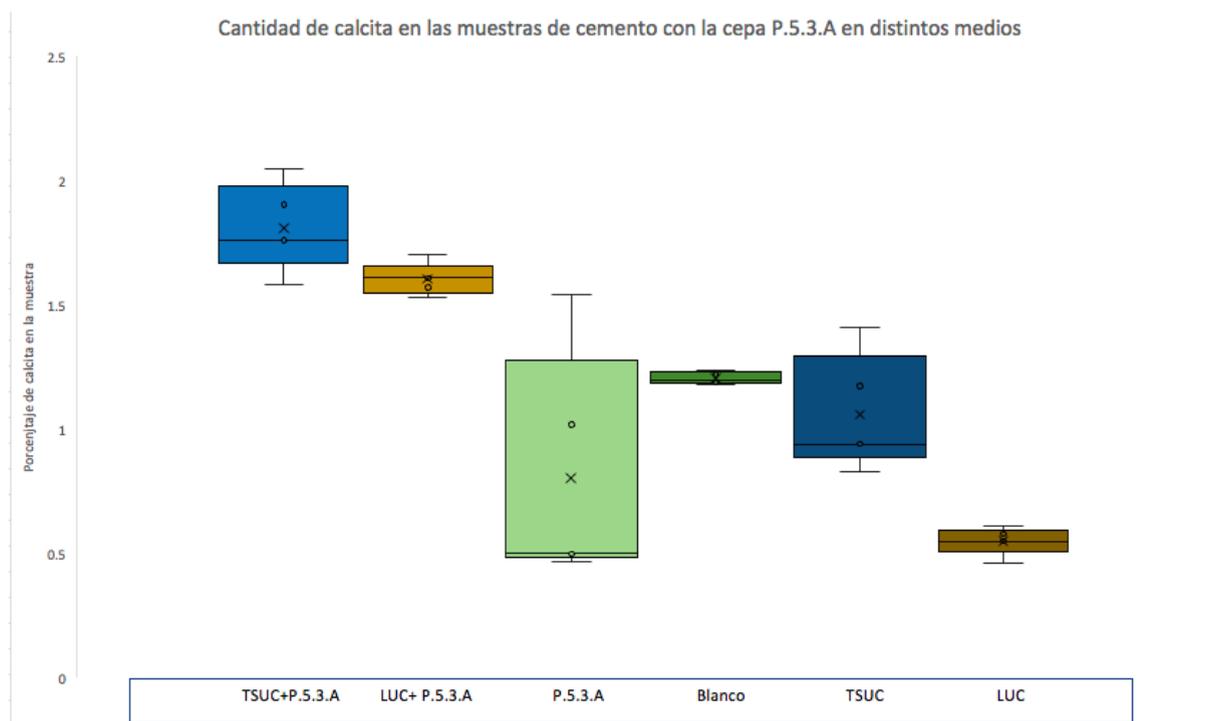
*Cuantificación de calcita obtenida según el apartado 5.12 de la sección de metodología (Notación de código de cepas en apartado A de metodología. Notación de código para medios en apartado 5.8 de la metodología)

Figura 19: Porcentaje de calcita en las muestras de cemento con la cepa P.5.2.A con medios TSUC, LUC y controles



*Cuantificación de calcita obtenida según el apartado 5.12 de la sección de metodología (Notación de código de cepas en apartado A de metodología. Notación de código para medios en apartado 5.8 de la metodología)

Figura 20: Porcentaje de calcita en las muestras de cemento con la cepa P.5.3.A con medios TSUC, LUC y controles



*Cuantificación de calcita obtenida según el apartado 5.12 de la sección de metodología (Notación de código de cepas en apartado A de metodología. Notación de código para medios en apartado 5.8 de la metodología)

7. *Discusión*

Se evaluó la efectividad de tres bacterias *Lysinibacillus sp* aisladas en la cantera de caliza de la planta San Miguel, Sanarate, El Progreso, Guatemala para hacer biocemento. Para el estudio se seleccionaron las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A por ser las mayores productoras de carbonato de calcio según Heredia Velasquez, 2019. Se planteó que al agregar un medio de precipitación y esporas de las cepas seleccionadas se pudiera producir un biocemento que fuera a aumentar la resistencia a compresión del cemento normal, que fuera a tener una cantidad mayor de calcita que el cemento normal después de un plazo de 30 días y que fuera capaz de reparar microgrietas en el cemento.

Las condiciones de propagación recomendadas se muestran en el Cuadro 1. Se definió como medio de propagación a escala de 1000 mL el caldo de tripticasa de soya ya que es un medio nutritivo que favorece el crecimiento de varios microorganismos. Está compuesto por peptonas de soya y caseína, dextrosa, cloruro de sodio y fosfato dipotásico. En el medio de cultivo, las peptonas de soya y caseína aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. Además, la peptona de soya es una fuente de carbohidratos que estimulan el crecimiento de varios microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y la dextrosa es la principal fuente de carbono. El componente más importante de este medio es la dextrosa, ya que es el sustrato que activa la glucólisis y por ende el metabolismo de división celular. Ya que el propósito de esta fermentación es la producción de biomasa, se busca lograr el crecimiento más rápido posible para alcanzar concentraciones celulares altas en poco tiempo. Para optimizar y escalar este proceso se debe determinar el rendimiento de biomasa por molécula de azúcar, por lo que se recomienda hacer un análisis de consumo de carbohidratos en el tiempo para cada una de las cepas en este medio. También se recomienda secuenciar el genoma completo de las bacterias para determinar su especie y diseñar un medio específico para sus requerimientos nutricionales preferenciales.

Un aspecto importante para la propagación eficiente de estas cepas es la temperatura. Es sabido que las bacterias de género *Lysinibacillus* son mesófilas, por lo que sus temperaturas óptimas de crecimiento están entre 25 y 40°C (Iftikhar, *et al*, 2007). Se estableció que la temperatura de operación fuera de 37 ° C para tener una tasa de división alta, pero sin desperdiciar energía sobrecalentando el medio. Esto porque a niveles industriales trabajar a temperaturas altas puede volverse una operación costosa. Sin embargo, se recomienda evaluar el método de propagación propuesto a temperaturas distintas dentro del rango preferencial de *Lysinibacillus*, para determinar cuál es la temperatura mínima de operación que no disminuya significativamente la producción de biomasa.

El género *Lysinibacillus* se compone de bacterias alcalófilas, cuyo rango preferencial de pH está entre 8 y 11 (Iftikhar, *et al*, 2007). El pH 8 del método de propagación se definió para favorecer el crecimiento de las cepas, pero tomando en cuenta que en un futuro al trabajar a nivel industrial puede resultar costoso alcalinizar el medio a un pH más elevado. Sin embargo, trabajar a un pH más alto en un contexto industrial puede servir como control de contaminación al favorecer únicamente la proliferación de bacterias alcalófilas como las cepas de este estudio. Por esto se recomienda determinar si un pH más elevado tiene un efecto significativo en la producción de biomasa de estas cepas y si puede servir como control de contaminación.

Las tendencias de las curvas de crecimiento finales se presentan en la Figura 3, donde se observa que todas las cepas alcanzaron la fase estacionaria en la curva de crecimiento después de 380 minutos. La fase logarítmica de crecimiento para las cepas P.5.3.A y P.5.2.A empieza después de 100 minutos. Estas dos cepas alcanzaron la mayor concentración de células, oscilando entre 5.13×10^{11} para P.5.3.A y 4.95×10^{11} células para P.5.2.A. La cepa P.4.1.A empieza su fase logarítmica después de 180 minutos y alcanzó una concentración celular de 2.98×10^{11} células por litro.

La corta duración de la fase lag que se observa en la Figura 3 es debido a que el inóculo de las células fue cultivado en las mismas condiciones que el sistema de fermentación (tripticasa de soya, pH 8, 37°C, 190 rpm). Al mantener constantes estas condiciones, las células no desperdician energía para adaptarse al medio y pueden empezar a proliferar inmediatamente. Otro factor determinante en el inicio casi inmediato de la fase logarítmica es el efecto de *quorum sensing* que resulta de la alta concentración de células en el inóculo inicial. El *quorum sensing* es un mecanismo que regula la expresión de los genes en función de la densidad celular. Este mecanismo consiste en la liberación de moléculas señal que pueden desencadenar una respuesta global a un estímulo (Darch, *et al*, 2012). Es importante que haya una densidad celular notoria al momento de iniciar la propagación, para provocar una reacción colectiva de crecimiento exponencial por medio de *quorum sensing*.

Para monitorear la propagación se determinó la concentración celular cada 90 minutos por medio de conteos con una cámara de Neubauer. Cabe mencionar ciertas desventajas de este método de conteo, como que no es posible distinguir entre las células vivas y las células muertas sin una tinción (Sepúlveda, 2014). Además, las células no fueron inmovilizadas al contar, lo cual agrega incertidumbre a la concentración celular calculada.

Se utilizó el programa de curvas de crecimiento microbiano en el lenguaje de programación R para determinar los tiempos de duplicación, la velocidad específica de crecimiento. En el Cuadro 2, se observa que el aumento de volumen de propagación del método no altera significativamente la tasa máxima de crecimiento ni el tiempo de duplicación para las cepas, por lo que las condiciones de la propagación (tamaño del inóculo, la temperatura y agitación) deben mantenerse para futuras operaciones de escalamiento. En general, los valores de tasa máxima de crecimiento y tiempo de duplicación son similares entre todas las cepas. Se observa que P.5.3.A tiene el menor tiempo de duplicación, por lo que alcanza concentraciones celulares más altas en un menor tiempo. Esto se puede comprobar en la Figura 3. En la escala de 1000 mL, la cepa P.4.1.A tiene el mayor tiempo de duplicación y por lo tanto es la cepa menos eficiente para propagar. Es posible que estas diferencias en rendimientos se deban a que son especies distintas con preferencias metabólicas individuales. Por esto se recomienda nuevamente hacer una secuenciación de genoma completo para las cepas del estudio. A partir de este método se pueden sentar las bases para proceder a desarrollar una cinética formal para la propagación de las cepas. Esto es fundamental para proceder al diseño de una planta piloto de producción de biomasa de estas bacterias, lo cual sería indispensable para continuar con el diseño de prototipos cada vez más realistas de un producto de biocemento.

En el Cuadro 3 se compara el rendimiento de formación de esporas por gramo de biomasa al realizar una esporulación por shock térmico en dos fases distintas de la curva de crecimiento de las cepas. Se confirmó la formación de endosporas cualitativamente para ambos métodos mediante la tinción con verde de malaquita de la biomasa recuperada, que se muestran en las Figuras 4,5,6,7,8 y 9. Inicialmente se indujo la esporulación después de 8 horas de propagación, durante la fase estacionaria de crecimiento. A pesar de que sí hubo formación de esporas, como se observa en las Figuras 5, 7 y 9,

la concentración de esporas por gramo de biomasa es notablemente menor que la esporulación inducida durante la fase logarítmica. Esto es debido a que la biomasa recuperada durante la fase estacionaria incluye células vivas y células muertas, por lo que el rendimiento de esporas viables por gramo de pellet es menor. En el Cuadro 3 se observa que al esporular durante la fase exponencial se obtiene un mayor rendimiento de células viables por gramo de pellet, ya que durante la fase logarítmica todas las células del sistema están vivas.

Para separar las esporas del medio se propuso una floculación seguida por centrifugación como el método más efectivo. Inicialmente se planteó recuperar las esporas por medio de filtración al vacío agregando 3.5g/L de $CaCl_2$ como floculante. Los rendimientos para este método se observan en el Cuadro 4. Este protocolo de recuperación de esporas resultó ser ineficiente, ya que los tiempos de filtrado fueron demasiado altos para el volumen trabajado y la recuperación de biomasa fue relativamente baja en comparación con el siguiente método evaluado. Sin embargo, vale la pena considerar que el filtro utilizado fue un filtro Büchner, el cual no es necesariamente la mejor opción para filtrado. Se podría explorar la posibilidad de que un filtro especializado pueda ser una opción más eficiente a nivel industrial. La metodología probada con los mejores rendimientos para recuperar esporas en este trabajo consiste en flocular con 3.5g/L $CaCl_2$, decantar el sobrenadante, centrifugar y por último secar. La biomasa recuperada con este método se observa en el Cuadro 4. la mayor recuperación de esporas fue para P.5.3.A, seguido por P.5.2.A y P.4.1.A. Esto es consistente con los resultados obtenidos con las curvas de crecimiento, ya que la cepa que mejor se propagó fue P.5.3.A, seguida por P.5.2.A y P.4.1.A. Se produjo significativamente más biomasa en la escala de propagación 1000mL que en la escala de propagación de 250mL. Esto es debido a que con un volumen de operación más grande, permite la producción de más biomasa por la abundancia de nutrientes. Esto se confirma con los órdenes de magnitud de la población celular final alcanzada en ambas escalas según la Figura 3 y la Figura 27.

Para determinar la efectividad de las cepas propuestas para la producción de biocemento se evaluaron 3 factores: su capacidad para rellenar microgrietas, el efecto de las cepas con distintos medios en las resistencias del concreto y la cantidad de calcita presentes en las muestras después de 30 días. Se realizaron todas estas pruebas con los medios TSUC, LUC y sin medio. Para el análisis estadístico, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk a los datos y, dependiendo del caso, un análisis ANOVA o la prueba HSD de Tukey para determinar si el medio o la cepa tienen un efecto significativo en los resultados de las pruebas.

En el Cuadro 32, se muestra que todas las cepas con medio TSUC lograron significativamente aumentar la resistencia a compresión del cemento a 28 días de curado. La mayor resistencia la presenta la cepa P.4.1.A, seguida por P.5.2.A y por último P.5.3.A para el medio TSUC. En el Cuadro 6, se observa que, en un período de treinta días de tratamiento con el medio TSUC, se cerró hasta el 74.71% de las grietas con la cepa P.5.3.A. La cepa P.4.1.A rellenó el 64.33% de las grietas y la P.5.2.A el 42.45%, en el mismo tiempo. A partir de los datos del Cuadro 30, se concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la capacidad de rellenar grietas de la cepa P.4.1.A y la cepa P.5.3.A con este medio, pero sí para la cepa P.5.2.A. Cabe mencionar que los resultados obtenidos tomaron en cuenta únicamente el largo de la grieta y no su profundidad. Es importante tomar esto en cuenta al momento de proponer un diseño para un producto de biocemento, ya que si la reparación que se observa es únicamente superficial se podría desarrollar un producto meramente estético. Por otra parte si se lograra saber con seguridad que las bacterias están rellenando las microgrietas internas de la muestra se podría utilizar para un material estructural. Una posibilidad a evaluar podría ser ensayar nuevamente la resistencia a compresión del cubo después del plazo establecido de reparación

de grietas, para determinar si realmente se logró recuperar algo de la resistencia original en su estructura, o bien en qué medida se recuperó. También se podría monitorear experimentalmente la profundidad de las grietas a lo largo del estudio además de su largo.

Una posible razón por la cual hay una variación experimental en la reparación de las grietas en distintos puntos del cubo es una distribución no homogénea de las esporas en la muestra de cemento. Para el análisis de resultados se asumió que las bacterias estaban homogéneas en la mezcla, pero esto no es necesariamente cierto. A pesar de que la norma NTG 41003 h4 incluye un paso de mezclado estandarizado del mortero para la generación de las muestras se debe de considerar que la distribución de las esporas igual tiene que ser garantizada. Este es un factor que determinaría si se puede garantizar o no la calidad de un producto de biocemento. Esta es una operación que debe estandarizarse ya a nivel industrial y merece una especial consideración para continuar con el desarrollo de un producto.

El tratamiento para reparación de grietas con el medio TSUC presentó varios inconvenientes. Para empezar, el medio tiñó secciones de las muestras de cemento de color amarillo, lo cual podría ser un factor en contra de la aceptación del biocemento como producto. Además, durante el tratamiento de precipitación las muestras presentaron un olor desagradable, ya que TSUC es un medio diseñado para la proliferación de bacterias de distintos tipos, por lo cual puede ser contaminado rápidamente por otras bacterias que presentan un olor desagradable. Además se debe considerar el alto costo de la tripticasa de soya como un desincentivo para seguir trabajando con TSUC como medio de precipitación. Otro aspecto a considerar es que al ser un medio rico en nutrientes, las cepas posiblemente desperdiciaron energía en activar su metabolismo de crecimiento y no en la conversión de urea a carbonato de calcio. Para optimizar la ruta metabólica propuesta por Morales Valenzuela, 2019 para producción de calcita de las cepas se planteó inicialmente suplementar el medio TSUC con bario, níquel y citrato. Sin embargo, las muestras fueron descartadas porque no fraguaron en un período de tiempo aceptable (tres días máximos) debido a un exceso de hidratación posiblemente causado por la interacción de hidróxido de bario con la mezcla de cemento.

Como alternativa, el medio LUC surge a partir de la idea de hacer un sustrato especializado que se enfoque únicamente en activar la ureasa presente en los microorganismos. De esta forma, al consumir urea y en la presencia de iones de calcio se precipita carbonato de calcio, en forma de calcita. Este fue el medio con mejor desempeño para todas las pruebas.

En el Cuadro 6, se observa que P.5.3.A alcanzó el mayor porcentaje de reparación de grietas con un 77.46%, seguido por 75.27% de P.4.1.A y 30.90% de P.5.2.A. Según los análisis estadísticos, no existe diferencia significativa entre la capacidad de rellenar grietas de las cepas P.4.1.A y P.5.3.A con medio LUC. Además, no existe diferencia significativa en el porcentaje de grietas reparadas entre el medio TSUC y medio LUC para estas cepas. En otras palabras, el medio de precipitación empleado no afecta la capacidad de las cepas para rellenar microgrietas. Sin embargo, el medio LUC presentó porcentajes de calcita más altos, resistencias a compresión más prometedoras y tiene la ventaja de tener un costo mucho menor.

Los ensayos de cubos con medio sin cepa presentaron porcentajes pequeños de reparación de grietas. El cierre de las mismas podría ser causado por la cristalización de minerales inducida por la interacción del medio orgánico con el cemento. Sin embargo, los minerales precipitados no son calcita, ya que como se observa en las Figuras 18, 19 y 20 el porcentaje de calcita para las muestras solo con medio no es mayor que el blanco. Los medios sin cepa también aumentan la resistencia a

compresión de las muestras, lo cual es consistente con estudios previos que demuestran que los materiales orgánicos contribuyen a aumentar la resistencia a compresión del cemento (Aizpurua, Moreno & Caballero, 2018).

Se observa en las Figuras 18, 19 y 20 que los tratamientos de cepas con medio TSUC no aumentan de manera significativa el porcentaje de calcita de las muestras control. Mientras que con el medio LUC las cepas P.4.1.A y P.5.2.A presentan mayor porcentaje de calcita que los controles. Según el Cuadro 7, el mayor porcentaje de calcita en una muestra del proyecto fue de 3.69%, y corresponde a la cepa P.4.1.A con medio LUC. La formación de calcita durante el tratamiento también se confirmó por microscopía electrónica de barrido usando EDS. Se tomó una fotografía al contenido de una grieta representativa para cada cepa y se confirmó la presencia de calcita por su estructura cuboide y el espectro indica los elementos Calcio, Carbono y Oxígeno en las proporciones coincidentes con el carbonato de calcio. Las imágenes y espectros de esta prueba se encuentran en la sección de anexos.

En general, se puede afirmar que todas las cepas lograron llenar por lo menos una fracción de las grietas. Según los Cuadros 32 y 33 el medio LUC aumenta significativamente la resistencia a compresión para las cepas al comparar el medio TSUC. Por esto, además de las desventajas del medio TSUC descritas anteriormente se determinó que la mejor opción para continuar el desarrollo de un producto de biocemento sea en base al medio LUC, ya que presenta mejores resultados en todas las pruebas. Existe una diferencia significativa entre el efecto que tienen las cepas en las resistencias a compresión del cemento. La cepa P.5.2.A presentó los resultados menos prometedores en las pruebas de resistencias y reparación de grietas. Sin embargo, es necesario considerar que esta cepa podría tener un mejor desempeño que las otras cepas en distintas condiciones. No vale la pena descartar esta posibilidad, ya que esta cepa también presenta ciertos resultados prometedores de este estudio. Las cepas P.4.1.A y P.5.3.A son efectivas en conjunto con el medio LUC para la producción de biocemento ya que aumentan la resistencia a compresión hasta un 15% y presentan un mayor porcentaje de calcita después de un período de 30 días de curado. Además, según los resultados experimentales, pueden reparar hasta un 77% de las microgrietas en una muestra de cemento después de 30 días con el tratamiento descrito en este trabajo.

Se recomienda hacer una secuenciación genómica para las cepas P.5.3.A y P.4.1.A, para descartar por completo que sean especies que presenten un riesgo para la salud o el ambiente. Al conocer la especie y genoma de la cepa se pueden diseñar experimentos para generar una cepa especializada para la producción de biocemento. Además, si los resultados indican que son la misma especie se puede proceder a hacer una evaluación de la diferencia en expresión de genes que les confieren características distintas. Si los resultados fueran especies distintas se podría considerar hacer un inóculo conjunto con ambas bacterias y observar si mejoran los rendimientos de las pruebas.

Para proceder con la investigación es necesario el diseño de un medio para la propagación industrial de las cepas. El diseño del medio de propagación, además del diseño de una planta de producción pueden ser utilizados como base para hacer empezar las proyecciones económicas sobre la viabilidad del biocemento como producto. Por la amplia gama de posibilidades de aplicación de biocemento se recomienda hacer un estudio de mercado para diseñar un producto según los requerimientos del mercado.

Cabe mencionar que el manejo y el monitoreo de un microorganismo en una muestra de cemento tiene dificultades. Por una parte es sumamente complejo predecir el efecto específico de ciertos metabolismos celulares que pudieran activarse. Además, es complejo determinar la vida útil de

las bacterias en la mezcla, ya que hasta el momento no se tienen datos que confirmen la cantidad de sustrato remanente en la muestra después de una reparación de las grietas. Se debe de considerar esto como un factor que determinará la vida útil de un producto hipotético. Se podría monitorear el comportamiento de las cepas con medio LUC en condiciones de laboratorio. Esto servirá para proyectar una vida útil del biocemento.

Se podría reducir la complejidad asociada al manejo de microorganismos al generar un biocemento agregando únicamente con la enzima inmovilizada ureasa con un medio de precipitación. Esto permitiría un aprovechamiento más específico del sustrato, ya que solamente hay una posible reacción que puede suceder, mientras que con el microorganismo es muy difícil predecir o monitorear qué metabolismos están activos en un momento dado.

8. Conclusiones

- El método de propagación propuesto consiste en inocular un sistema con un 10% (v/v) de un cultivo *overnight* de la cepa y propagar durante 8 horas a 37°C, con un pH de 8 y una agitación de 190 rpm.
- Con el protocolo de propagación propuesto, las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A alcanzaron concentraciones celulares entre 2.98 y 5.13 * 10¹¹ células por litro.
- La cepa que mejor prolifera en escala e 1000mL según los tiempos de duplicación experimentales es P.5.3.A
- El método para inducir la esporulación recomendado es por medio de shock térmico después de 6 horas de propagación
- Al esporular durante la fase logarítmica de crecimiento se obtiene una biomasa con rendimientos de 3.75E+11(±)1.88E+10 esporas por gramo de P.4.1.A; 1.30E+11(±) 6.53E+09 esporas por gramo de P.5.2.A y 2.58E+11(±)1.29E+10 esporas por gramo de P.5.3.A
- La recuperación de biomasa con el protocolo de floculación y centrifugado para recuperar esporas a escala de 1000 mL es de 0.752 +-0.0012g de P.4.1.A, 0.991+-0.0012g de P.5.2.A y 1.265+-0.0012g de P.5.3.A
- Con el medio TSUC las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A lograron rellenar en un 64.33%, 42.45% y 74.71% respectivamente las microgrietas generadas en el cubo de cemento
- Con el medio LUC las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A lograron rellenar en un 64.33%, 42.45% y 74.71% respectivamente las microgrietas generadas en el cubo de cemento
- No hay diferencia significativa en la capacidad de llenado de grietas entre P.4.1A y P.5.3.A en medio TSUC , pero sí la hay con P.5.2.A
- No hay diferencia significativa en la capacidad de llenado de grietas entre P.4.1A y P.5.3.A en medio LUC, pero sí la hay con P.5.2.A
- La mejor combinación para aumentar las resistencias a compresión a 28 días del cemento es la cepa P.5.3.A con medio LUC
- La mejor combinación para aumentar la cantidad de calcita en la muestra de cemento después de 30 días es la cepa P.4.1.A con medio LUC
- El medio de precipitación es un factor que no influye en la capacidad para rellenar grietas de las cepas propuestas.
- El medio de precipitación es un factor que influye en el aumento de la resistencia a compresión de las muestras
- El medio de precipitación es un factor que influye en la cantidad de calcita producida por las cepas al cabo de 30 días
- La cepa con mayor producción de calcita fue P.4.1.A con medio LUC y alcanzó un 3.69% de calcita en el medio.

9. Recomendaciones

- Se recomienda evaluar los resultados para pruebas de concepto futuras a distintas condiciones para determinar si se descarta o no la cepa P.5.2.A para posteriores experimentos relacionados con esta investigación
- Para tener una mayor certeza de la concentración celular durante la propagación, se recomienda inmovilizar las células para los conteos en cámara de Neubauer
- Se recomienda caracterizar el efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento de las cepas P.4.1.A y P.5.3.A
- Para determinar la especie y sus características de interés para el estudio se recomienda hacer una secuenciación de genoma completo de las cepas P.4.1.A y P.5.3.A
- Se debe monitorear el consumo de sustrato en el tiempo para hacer una cinética formal para poder proceder con el escalamiento de la propagación de las cepas
- Se recomienda continuar la experimentación en condiciones controladas de laboratorio para determinar el comportamiento de las cepas en medio LUC para servir como base para determinar la vida útil del biocemento producido.
- Se recomienda proceder con experimentación para el mejoramiento del medio LUC, por ejemplo con la adición de iones de citrato y bario según lo reportado en la literatura (Mo**CITA)
- Se recomienda probar combinaciones de bacterias para que conformen el inóculo del biocemento y determinar si se obtienen mejores resultados en las pruebas de concepto
- Considerar la posibilidad de hacer un biocemento con la enzima ureasa inmovilizada en vez de un microorganismo complejo.
- Hacer un estudio de mercado para determinar las características técnicas del biocemento que se requiere para comercializarlo.

10. Referencias bibliográficas

Achal V, Mukherjee A, Zhang Q (2016) Unearthing ecological wisdom from natural habitats and its ramifications on development of biocement and sustainable cities *Landscape and Urban Planning Vol.155*

Aizpurua L, Moreno G, Caballero K (2018) Estudio del concreto de alta resistencia con el uso de cenizas de materiales orgánicos y polímeros *Revista de I+D tecnológico Vol.14 No.2* DOI: <https://doi.org/10.33412/idt.v14.2.2071>

Amiri A, Azima M, Bundur Z.B (2017) Bio-based admixture for self-healing cement-based mortar Ozeygin University, Istanbul, Turkey

Anbu, P., Kang, C. H., Shin, Y. J., & So, J. S. (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. SpringerPlus, 5, 250. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1869-2>

Alhour M.T (2013) Isolation, Characterization and Application of Calcite Producing Bacteria from Urea Rich Soils Gaza islamic university Palestine <https://library.iugaza.edu.ps/thesis/109589.pdf>

Benavente D, Cañaveras J.C, Martínez-Martínez J, Muñoz Cervera M.C, Rodríguez García M.A y Ordóñez S(2012) Identificación de minerales mediante difracción de rayos X utilizando bases de datos online de libre acceso *Universidad de Alicante ISSN: 1132-9157*

Bugliani M.F, Di Lello C, Freire E, Polla G, Petragalli A, Reinoso M, Halac E.B (2012) Empleo de espectroscopia Raman, difracción de rayos x y microscopía electrónica para el análisis de pigmentos en cerámicas vaquerías *Bol. Mus. Chil. Arte Precolomb. vol.17 no.2*

Chu, Jian and Wen, Zhiyou, (2015) Proof of Concept: Biocement for Road Repair *In Trans Project Reports. No.129.*

COGUANOR (2019) *Norma técnica guatemalteca COGUANOR* (Norma NO. NTG 41003 h4)

Darch S.E, West S.A, Winzer K, Diggle S.P (2012) Density-dependent fitness benefits in quorum-sensing bacterial populations. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) Vol.109 No.21* <https://doi.org/10.1073/pnas.1118131109>

De Belie N (2012) Bio-based microstructure effects in view of durability of concrete and concrete structures Second International Conference on Microstructural-related Durability of Cementitious Composites *University of Amsterdam*

de Vries Y, Hornstra L.M, de Vos W.M, Abee T (2004) Growth and Sporulation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 under Defined Conditions: Temporal Expression of Genes for Key Sigma Factors *Appl Environ Microbiol. Vol.70 No.4* DOI: 10.1128/AEM.70.4.2514-2519.2004

Harrison R.G, Todd P, Rudge S.R. (2003). Bioseparations Science and Engineering *Oxford University Press*, Oxford

Heredia Velasquez A.M (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*.

Iftikhar A, Yokota A, Yamazoe A & Fujiwara T (2007) "Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* Vol.57 No.5

Jonkers H.M, Schlangen E (2008) Properties and micro-structural analysis of organic compound-enriched self-healing concrete. Delft University of technology, Holanda

Li M, Fang C, Kawasaki S, Achal V (2018) Fly ash incorporated with biocement to improve strength of expansive soil *Scientific Reports* vol. 8 No.2565 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20921-0>

Luna C.L, Lopes C.E, Massarani G (2005) Recovery of *Bacillus sphaericus* spores by flocculation/sedimentation and flotation *Braz. arch. biol. technol.* vol.48 https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132005000400008&lng=en&nrm=iso

Medinilla A (2019) Guatemala paga el triple que Europa por un kilómetro de carretera *Soy 502* Extraído de: <https://www.soy502.com/articulo/guatemala-paga-triple-europa-construir-kilometro-101025>

Mengmeng L, Chaolin F, Kawasaki S, Achal V (2019) Fly ash incorporated with biocement to improve strength of expansive soil *Scientific reports* Vol.8

Milijevic B, Lo Monte F, Vucetic S, Sovljanski O, Ristic I, Pilic B, Markov S, Ferrara L, Ranogajec J (2018) Characterization and monitoring of the crack self-healing ability of bio-mortar University of Novi Sad, Serbia

Miwa, Hiroki; Iftikhar Ahmed; Akira Yokota and Toru Fujiwara (2009) *Lysinibacillus parviboronicapiens* sp. nov. a low boron-containing bacterium isolated from soil *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 59 (6): 1427-1432.

Morales Valenzuela A.M (2020) Identificación de la ruta metabólica para producción industrial de calcita por hidrólisis de urea en *L. sphaericus* mediante análisis computacional genético de *Sporosarcina*, *Bacillus* y *Lysinibacillus* spp. *Universidad del Valle de Guatemala*.

Nilson A.H (2001) Diseño de Estructuras de concreto McGraw Hill, Bogotá. Recuperado de: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/48776149/167ddedcahn12e.PDF?1473696718=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DDiseno_geometrico_de_carreteras.pdf&Expires=1605798508&Signature=dcKMBEC~tW4HYmaeUdxypSOK9zIVBol26EvYBFmYBre-PxgBn2kSGIUmlK6MIzCjWbPbDqUVM1Ki25f62FTkqfm4Pv7Jq73EJmOP9Bi~mUZYmy5WEAKgC~reY3tOx~z4PdEG7sUE4apP0v2xHVscWzhspahzuG4DOVhuWBOoQUwpFBSJ5MpuYEECapNQ7Luk57JAD~go9AGPzwpHcpV5Wy3gvcCM~ZoswEzeswBxBdFgGayfhujYWd4ps6R10~i~BaAW9GfsSZIFpHzgX-ufdBinFBIPCrxF0h-IAU-L6KIG3NKR1UGsAuPRr5B4DoDbj9tgXKljvuOuvX9Cq0klw__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

Paramo L, Narváez Zapata J.A, Ortega Morales O (2015) La bioprecipitación de carbonato de calcio por la biota nativa como un método de restauración *Nexo Vol.28 No.1* DOI10.5377/nexo.v28i01.1779

Reyes Carrascal L.A (2015) Morfología y estructura Bacteriana McGraw Hill Recuperado de: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/39779542/MorfologiayEstructuraBacteriana-1-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1630635088&Signature=NfJLRse9MCzGLnYPZXQrphbYBBSrATCHEuqfZgFy4ce7LqijYR3~ghrhUE8yMtWwTWUGvV8k0T57i4arLxdXT1wLF6PsBI8vZW93v9~DRtbP2jLKi18dlhiOhREDZs1bl5M1tlRI1uy3-9E1hWImPSnzO9xaHe5Fprj3dP3v9wbmN4KZx-Nzj5zlGoYd0wHwo9FTjM8XtxuZP~kE4U-N36CWnPUrPSBaziF4ix8e5DEaztpMn6~szsSjwRB4uO6UmIpnuE1XfaOr-j1R9Ief5T1rMchGr1J5ErcCVQjyTmplt-hc0dJAWQVKzWtWP3z~PIbgSY1IbU44sOcC4TUr1Q__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

Rojas Cáceres J.P (2008) Estudio mineralización de carbonato de calcio usando como matriz quitoano y mezclas de quitosano con polímeros sintéticos hidrosolubles *Universidad de Chile* http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2008/rojas_j/sources/rojas_j.pdf

Sepúlveda L, Aguilar C (2014) Biofertilizantes microbianos *Universidad Autónoma de Coahuila*

Stabnikov, V., Jian, C., Ivanov, V., & 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.

Wang, J. Y., Soens, H., Verstraete, W., and De Belie, N. (2014). Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. *Cem. Concr. Res.* 56, 139–152. doi: 10.1016/j.cemconres.2013.11.009

Williams S.L, Artier J, Qiu J, Heveran C, Nagarajan A, Hubler M, Cook S.M, Cameron J.C, Srubar W.V (2019) Regenerative hydrogel-based microbial mortars: investigation of viability and strength in successive material generations 3rd International Conference on Bio-Based Building Materials, Belfast , UK

Whiffin V.S (2004) Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement Murdoch University, Australia

Zeng W, Zhao Y, Feng Z, Lv Z, Shah S (2019) *Optimizing precipitation method of microbial carbonate precipitation on model recycled aggregate ICBBM*, Belfast UK

11. Apéndice

11.1 Procedimiento detallado

11.1.1 Sujetos de estudio y reactivación de bacterias

11.1.1.2 Los sujetos de estudio son 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. Se reactivaron las cepas conservadas en glicerol al sembrar una asada en placas de TSA y dejando en incubación a 37°C durante 24 horas.

11.1.2 Preparación de medios de cultivo

11.1.2.1 Pesar 25g de caldo tripticasa de soya marca *Innovating Science* y disolver en 1 L de agua destilada

11.1.2.2 Agregar hidróxido de sodio para ajustar el pH a 8

11.1.3 Curvas de crecimiento

11.1.3.1 Generar un inóculo del 10% del volumen final del sistema a trabajar y dejar en un shaker a 190 rpm y 37 °C durante 24 horas

11.1.3.2 Inocular el sistema con 10% del volumen final a trabajar

11.1.3.3 Apartar 1mL para conteo

11.1.3.4 Apartar 1mL para medir absorbancia con OD600 con espectrofotómetro NanoDrop 2000c

11.1.3.5 Dejar sistema en agitación de 190 rpm y 37 °C hasta la siguiente medición

11.1.3.6 Repetir pasos del inciso c al e cada 90 minutos y repetir hasta que el OD no cambie entre mediciones.

11.1.4 Esporulación inducida (metodología modificada de Milijevic, et al, 2018 y Luna, et al, 2005)

11.1.4.1 Método 1

11.1.4.1.1 Propagar la cepa según el apartado 11.1.3

11.1.4.1.2 Después de 6 horas de propagación, introducir el sistema en un baño térmico a 80°C durante 10 minutos

11.1.4.1.3 Agregar 3.5g/L de cloruro de calcio dihidratado

11.1.4.1.4 Agitar el sistema a 90 rpm durante 5 minutos y a 40 rpm durante 10 minutos

11.1.4.1.5 Dejar en reposo 30 minutos

11.1.4.1.6 Descartar el sobrenadante

11.1.4.1.7 Filtrar al vacío

11.1.4.1.8 Secar biomasa en un horno.

11.1.4.2 Método 2

11.1.4.2.1 Propagar la cepa según el apartado 11.1.3

11.1.4.2.2 Después de 8 horas de propagación, introducir el sistema en un baño térmico a 80°C durante 10 minutos

11.1.4.2.3 Agregar 3.5g/L de cloruro de calcio dihidratado

11.1.4.2.4 Agitar el sistema a 90 rpm durante 5 minutos y a 40 rpm durante 10 minutos

11.1.4.2.5 Dejar en reposo 30 minutos

11.1.4.2.6 Descartar el sobrenadante

11.1.4.2.7 Filtrar al vacío

11.1.4.2.8 Secar biomasa en un horno.

11.1.5 Recuperación de esporas

11.1.5.1 Método 1

11.1.5.1.1 Propagar la cepa según el apartado 11.1.3

11.1.5.1.2 Después de 6 horas de propagación, introducir el sistema en un baño térmico a 80°C durante 10 minutos

11.1.5.1.3 Agregar 3.5g/L de cloruro de calcio dihidratado

11.1.5.1.4 Agitar el sistema a 90 rpm durante 5 minutos y a 40 rpm durante 10 minutos

11.1.5.1.5 Dejar en reposo 30 minutos

11.1.5.1.6 Descartar el sobrenadante

11.1.5.1.7 Filtrar al vacío

11.1.5.1.8 Secar biomasa en un horno.

11.1.5.2 Método 2

11.1.5.2.1 Propagar la cepa según el apartado C

11.1.5.2.2 Después de 6 horas de propagación, introducir el sistema en un baño térmico a 80°C durante 10 minutos

11.1.5.2.3 Agregar 3.5g/L de cloruro de calcio dihidratado

11.1.5.2.4 Agitar el sistema a 90 rpm durante 5 minutos y a 40 rpm durante 10 minutos

11.1.5.2.5 Dejar en reposo 30 minutos

11.1.5.2.6 Descartar el sobrenadante

11.1.5.2.7 Centrifugar solución rica en esporas en centrífuga eppendorf modelo 5430 R durante 15 minutos a 3000 rpm. Descartar sobrenadante

11.1.5.2.8 Secar pellet en un horno.

11.1.6 Cuantificación de esporas por gramo de pellet

11.1.6.1 Obtener OD del sistema previo al shock térmico para hacer la equivalencia a células viables con las curvas de crecimiento

11.1.6.2 Inducir esporulación, flocular y secar flóculos según el apartado 4 del procedimiento

11.1.6.3 Pesar 0.01g de flóculo de esporas secas

11.1.6.4 Hacer diluciones seriadas hasta 1×10^{-7}

11.1.6.5 Tomar 10uL y contar en cámara de Neubauer

11.1.6.6 Realizar en triplicado

11.1.7 Tinción de esporas

11.1.7.1 Ensamblar un sistema de soporte, pinzas, malla y mechero

11.1.7.2 Realizar frotis de esporas recuperadas en pellet

11.1.7.3 Cortar una sección de papel filtro suficiente para cubrir el frotis

11.1.7.4 Colocar portaobjetos sobre la malla con el papel filtro cubriendo el frotis y encender el mechero

11.1.7.5 Colocar el papel filtro sobre el frotis y agregar verde de malaquita constantemente de forma que no se seque durante 5 minutos

11.1.7.6 Apagar el mechero y retirar el portaobjetos cuidadosamente con una pinza. Descartar papel filtro

11.1.7.7 Lavar frotis con agua destilada

11.1.7.8 Cubrir frotis con safranina durante 1 minuto

11.1.7.9 Lavar con agua destilada

11.1.7.10 Observar en microscopio con el objetivo de inmersión

11.1.8 Definición de medios de precipitación

11.1.8 .1 Medio 1: Tripticasa de soya, urea, cloruro de calcio (TSUC)

11.1.8 .1.1 Mezclar la cantidad de cemento para el volumen requerido con de 2% urea (p/v), 2% cloruro de calcio (p/v) y $1 * 10^8$ de esporas por centímetro cúbico

11.1.8 .2 Medio 2: *Lysinibacillus*, urea, cloruro de calcio (LUC)

11.1.8 .2.1 Mezclar la cantidad de cemento para el volumen requerido con 2% urea (p/v), 2% cloruro de calcio (p/v) y $1 * 10^8$ de esporas por centímetro cúbico.

11.1.8 Prueba de reparación de grietas medio (metodología modificada de Jonkers & Schlangen, 2008)

11.1.8.1 Generar cubos de mortero normados según una variación de la norma NTG 41003 h4 (ASTMC 109) para evaluar 3 cubos de cemento Ari Plus (OPC de Cementos Progreso). , agregando medio TSUC con la esporas de la cepa correspondiente y una proporción de 1:2.75 de volumen de arena.

11.1.8.2 Después de cuatro días de curado en seco, Agrietar cubos de cemento por medio de prensa hidráulica marca ToniTechnick modelo ToniPACTII

11.1.8.3 Seleccionar 3 grietas por cubo para monitorear e identificarlas claramente.

11.1.8.4 Fotografiar las grietas seleccionadas utilizando un microscopio estereoscópico

11.1.8.5 Sumergir cubos en agua con medio de precipitación según tratamiento agregado durante 18 días y fotografiar grietas nuevamente

11.1.8.6 Sumergir cubos en agua sin medio durante 15 días más y fotografiar con estereoscopio.

11.1.8.7 Repetir procedimiento con todas las cepas seleccionadas

11.1.8.8 Repetir procedimiento para todas las cepas seleccionadas con medio LUC y sin medio (como blanco)

11.1.9 Pruebas de resistencia a compresión

11.1.9.1 Generar 12 cubos normados según la norma COGUANOR versión 2019 escala 1:50 para producir 3 cubos de cemento Ari Plus de Cementos Progreso, agregando medio TSUC con la esporas de la cepa correspondiente y una proporción de 1:2.75 de volumen de arena.

11.1.9.2 Medir la resistencia a compresión de los cubos según la norma COGUANOR versión 2019 escala 1:50 en las edades de 1,3,7 y 28 días por medio de una prensa hidráulica. Realizar mediciones para todas las cepas del estudio y en triplicado para cada edad.

11.1.9.3 Repetir procedimiento para todas las cepas seleccionadas con medio LUC y para todas las cepas seleccionadas sin medio (como blanco)

11.1.10 Análisis en SEM

11.1.10.1 A partir de las pruebas de reparación de grietas, seleccionar una grieta representativa para cada cepa y preparar muestra para analizar en microscopio electrónico ubicado en CETEC de marca Jeol, modelo JSM-IT500

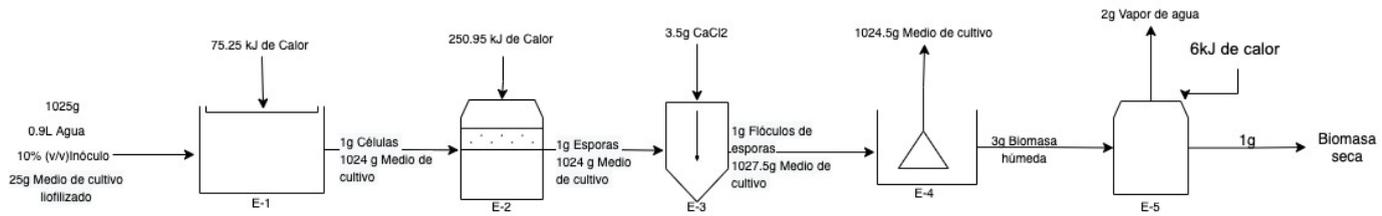
11.1.10.2 Obtener la imagen de los cristales de carbonato de calcio y el espectro de fluorescencia para distintos puntos observados por medio de espectroscopía de fluorescencia de Aztec por Oxford Instruments en aumento x50 μm

11.1.11 Mineralogía

11.1.11.1 Seleccionar un cubo representativo para cada cepa de la prueba de reparación de grietas y se triturar hasta volverlo polvo. Del polvo homogéneo tomar tres muestras y cuantificar el carbonato de calcio en estructura de calcita por medio de cristalografía por difracción de rayos x con el difractómetro Empyrean de marca Malvern Panalytical

11.2 Diagrama de flujo

Para una producción de 1L de medio



Equipo	Descripción
E-1	Tanque de propagación
E-2	Baño térmico
E-3	Recipiente de floculación
E-4	Centrífuga
E-5	Secadora

11.3 Datos de placa del equipo

Incubadora

Marca: Lab line

Modelo: Imperial III incubator

Espectrofotómetro

Marca: ThermoFisher

Modelo: NanoDrop 2000c

Centrífuga

Marca: eppendorf

Modelo: 5430 R

Horno

Marca: Labline

Modelo: L.C oven

Prensa hidráulica

Marca: Toni Technik

Modelo: ToniPACTII

Estereoscopio

Marca: Leica

Modelo: MZ10F

Cámara de estereoscopio

Marca: Leica

Modelo: MC170

Microscopio electrónico

Marca: Jeol

Modelo: JSM-IT500

Espectro de fluorescencia

Marca: Oxford Instruments

Modelo: Aztec Feature

Difractómetro multipropósito

Marca: Malvern Panalytical

Modelo: Empyrean

11.4 Datos originales

Cuadro 9: Lecturas de Densidad Óptica (OD por sus siglas en inglés) para las curvas de crecimiento para la cepa P.4.1.A

Escala			250mL			1000mL		
Cepa	Hora	Tiempo (min)	OD (1)	OD(2)	OD(3)	OD (1)	OD(2)	OD(3)
P.4.1.A	10:00	0	0.13	0.10	0.13	0.12	0.12	0.13
	11:30	90	0.22	0.16	0.22	0.17	0.24	0.20
	13:00	180	0.27	0.50	0.30	0.35	0.44	0.41
	14:30	270	0.44	0.81	0.54	0.48	0.77	0.54
	16:00	360	0.65	0.99	0.66	0.77	0.90	0.78
	18:00	480	0.66	0.99	0.67	0.76	0.92	0.81
	19:30	570	0.66	0.99	0.68	0.75	0.92	0.82

Cuadro 10: Lecturas de Densidad Óptica (OD por sus siglas en inglés) para las curvas de crecimiento para la cepa P.5.2.A

Escala			250mL			1000mL		
Cepa	Hora	Tiempo (min)	OD (1)	OD(2)	OD(3)	OD (1)	OD(2)	OD(3)
P.5.2.A	10:00	0	0.15	0.17	0.15	0.17	0.16	0.17
	11:30	90	0.33	0.42	0.33	0.33	0.33	0.3
	13:00	180	0.56	0.56	0.61	0.5	0.62	0.56
	14:30	270	0.78	0.79	0.73	0.7	0.79	0.78
	16:00	360	0.81	0.82	0.76	0.78	0.75	0.89
	18:00	480	0.83	0.85	0.78	0.82	0.78	0.92
	19:30	570	0.84	0.85	0.79	0.84	0.79	0.93

Cuadro 11: Lecturas de Densidad Óptica (OD por sus siglas en inglés) para las curvas de crecimiento para la cepa P.5.3.A

Escala			250mL			1000mL		
Cepa	Hora	Tiempo (min)	OD (1)	OD(2)	OD(3)	OD (1)	OD(2)	OD(3)
P.5.3.A	10:00	0	0.08	0.11	0.11	0.09	0.1	0.17
	11:30	90	0.16	0.16	0.19	0.14	0.16	0.3
	13:00	180	0.26	0.26	0.35	0.29	0.25	0.56
	14:30	270	0.37	0.35	0.65	0.5	0.41	0.78
	16:00	360	0.54	0.43	0.72	0.59	0.55	0.89
	18:00	480	0.73	0.55	0.82	0.83	0.62	0.92
	19:30	570	0.73	0.56	0.83	0.82	0.63	0.93

Cuadro 12: Conteos iniciales para las curvas de crecimiento para la cepa P.4.1.A

Escala		250mL			1000mL		
Hora	Tiempo (min)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
10 am	0	9	9	9	9	9	9
		9	9	8	9	9	9
		10	9	9	9	9	9
		9	8	8	9	9	9
		8	9	8	9	9	8
11:30 am	90	9	9	9	9	9	9
		9	9	9	9	9	9
		10	9	8	9	9	9
		9	9	8	9	9	9
		9	9	9	9	9	9
1 pm	180	16	28	17	29	28	29
		16	31	17	28	34	30
		14	31	16	29	34	30
		15	30	17	32	28	34
		17	36	17	32	31	29
2:30pm	270	29	67	35	62	65	36
		32	59	34	63	68	35
		30	63	34	60	64	35
		35	61	38	59	65	38
		34	59	37	63	67	36
4pm	360	62	123	60	63	120	63
		63	122	62	64	120	64
		61	120	63	64	117	66
		63	121	64	66	115	66
		63	122	62	65	121	64
5:30pm	450	68	123	62	63	118	63
		66	121	61	64	114	65
		65	122	63	64	116	67
		70	123	60	65	117	64
		65	123	59	65	122	66
7:00pm	540	65	122	63	64	116	63
		65	123	60	63	117	66

		67	123	61	64	120	63
		69	121	60	64	120	67
		68	123	60	65	120	66

Cuadro 13: Conteos iniciales para las curvas de crecimiento para la cepa P.5.2.A

Escala		250mL			1000mL		
Hora	Tiempo (min)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
10 am	0	10	8	7	10	9	6
		10	8	8	9	7	7
		10	9	9	10	9	8
		10	8	8	9	11	8
		10	8	8	10	11	10
11:30 am	90	16	16	17	29	28	28
		16	21	17	27	33	29
		14	21	16	28	32	29
		15	22	17	33	27	31
		17	21	17	31	26	30
1 pm	180	36	40	35	62	63	63
		38	34	34	63	62	63
		36	38	35	60	62	61
		38	36	37	59	60	60
		37	34	37	63	63	63
2:30pm	270	61	68	60	106	107	106
		64	58	59	106	106	107
		62	64	60	103	106	103
		65	62	64	101	101	102
		63	59	63	107	107	106
4pm	360	67	75	66	116	118	117
		70	64	64	117	116	117
		68	71	66	113	116	114
		72	68	70	111	111	112
		70	64	69	117	118	117
5:30pm	450	68	75	66	117	118	118
		70	65	65	116	117	118

		68	71	66	124	117	117
		73	68	70	112	118	112
		69	65	76	117	118	115
		68	75	66	117	114	114
		70	65	65	116	114	111
		68	71	66	124	112	111
		73	68	70	112	113	112
7:00pm	540	69	65	76	117	113	113

Cuadro 14: Conteos iniciales para las curvas de crecimiento para la cepa P.5.3.A

Escala		250mL			1000mL		
Hora	Tiempo (min)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
10 am	0	10	8	7	10	9	6
		10	8	8	9	7	7
		10	9	9	10	9	8
		10	8	8	9	11	8
		10	8	8	10	11	10
11:30 am	90	16	16	17	29	28	28
		16	21	17	27	33	29
		14	21	16	28	32	29
		15	22	17	33	27	31
		17	21	17	31	26	30
1 pm	180	36	40	35	62	63	63
		38	34	34	63	62	63
		36	38	35	60	62	61
		38	36	37	59	60	60
		37	34	37	63	63	63
2:30pm	270	61	68	60	106	107	106
		64	58	59	106	106	107
		62	64	60	103	106	103
		65	62	64	101	101	102
		63	59	63	107	107	106
4pm	360	67	75	66	116	118	117
		70	64	64	117	116	117

		68	71	66	113	116	114
		72	68	70	111	111	112
		70	64	69	117	118	117
5:30pm	450	68	75	66	117	118	118
		70	65	65	116	117	118
		68	71	66	124	117	117
		73	68	70	112	118	112
		69	65	76	117	118	115
7:00pm	540	68	75	66	117	114	114
		70	65	65	116	114	111
		68	71	66	124	112	111
		73	68	70	112	113	112
		69	65	76	117	113	113

Cuadro 15: Datos originales para recuperación de biomasa con el método propuesto

Escala		250mL			1000mL		
Cepa	Ensayo	Peso falcon (+-0.0005g)	Peso falcon con biomasa (+-0.0005g)	Biomasa recuperada (+-0.0007g)	Peso falcon (+-0.0005g)	Peso falcon con biomasa (+-0.0005g)	Biomasa recuperada (+-0.0007g)
P.4.1.A	1	13.190	13.423	0.233	13.240	13.959	0.719
	2	13.200	13.421	0.221	13.251	14.023	0.772
	3	13.230	13.432	0.202	13.192	13.976	0.784
P.5.2.A	1	13.030	13.398	0.368	12.925	13.980	1.055
	2	13.001	13.440	0.439	13.101	14.180	1.079
	3	13.100	13.480	0.380	13.221	14.012	0.791
P.5.3.A	1	13.210	13.438	0.228	13.200	14.214	1.014
	2	13.120	13.441	0.321	13.111	14.371	1.260
	3	13.190	13.421	0.231	12.978	14.41	1.432

Cuadro 16: Datos originales para determinar número de células por gramo de biomasa

Cepa	Bacterias totales en volumen de conteo (dilución 10 ⁻⁶)	Bacterias totales en volumen de conteo (dilución 10 ⁻⁷)	Concentración original de esporas (g/mL)
P.4.1.A	35	4	0.011
P.5.2.A	11	2	0.010
P.5.3.A	27	3	0.010

Cuadro 17: Monitoreo de reparación de grietas para todas las cepas con medio TSUC

Cepa		Grieta	Largo de la grieta (mm ± 3%)			Porcentaje de recuperación de grietas	Promedio de recuperación de grietas (± 5%)
			Día 1	Día 18	Día 30		
P.4.1.A	Cubo 1	A	7.3	2.8	0	100.0	64.3
		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	42.5
		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	74.7
		B	6.1	3.4	3.4	43.4	

N/A	Cubo 2	C	6.8	0	0	100.0	24.7
		A	5.3	4.1	0.9	83.2	
		B	7.7	3.1	3	60.8	
	Cubo 3	C	6.2	1.9	1.6	73.5	
		A	6.2	2.2	0	100.0	
		B	6.6	4.1	0	100.0	
	Cubo 1	C	6.3	5.8	4.6	26.6	
		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	
Cubo 3	F	7	7	7	0.0		
	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		
Cubo 3	D	5.5	0.2	0.2	97.1		

Cuadro 18: Monitoreo de reparación de grietas para todas las cepas con medio LUC

Cepa	Grieta	Largo de la grieta (mm \pm 3%)			Porcentaje de recuperación de grietas	Promedio de recuperación de grietas (\pm 5%)	
		Día 1	Día 18	Día 30			
P.4.1.A	Cubo 1	A	6.234	535	0	100.00	75.27
		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	5.675	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	30.90
		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	77.46
		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	29.46
		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 19: Monitoreo de reparación de grietas para todas las cepas sin medio

Cepa	Cubo	Grieta	Largo de la grieta (mm \pm 3%)			Porcentaje de recuperación de grietas	Promedio de recuperación de grietas (\pm 5%)		
			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
		A	5.9	5.9	5.9	0.0
	Cubo 3	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 20: 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	

LUC

	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 21: 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	

11.4 Ecuaciones y cálculo de muestra

11.4.1 Ecuaciones

11.4.1.1 **Ecuación 1:** Conversión de conteos en cámara a células totales en el sistema

$$C = n * p * v * V$$

Donde:

C= Células totales en el sistema

n= Número de microorganismos contados en un cuadrado pequeño de la cámara

p= No. de cuadrados pequeños en volumen de conteo

v= Volumen de conteo

V= Volumen total de sistema

11.4.1.2 **Ecuación 2:** Determinación de células por gramo seco de pellet

$$g = \left(\frac{n * F}{v}\right) * (C) * (x)$$

Donde:

g= Células por gramo de pellet

n=No de células contadas

F= Factor de dilución

C= Conversión de uL a mL

x= Gramos de pellet disuelto por mL para conteo

11.4.1.3 **Ecuación 3:** Cálculo de Gramos de pellet a agregar a la mezcla de cemento

$$m = \frac{C * V * r}{g}$$

Donde:

m= Gramos de pellet a agregar a la mezcla de cemento

C= Concentración deseada de células/mL de cemento

g=Células por gramo de pellet

V= Volumen final de muestras de cemento

r= Número de muestras

11.4.1.4 **Ecuación 4:** Velocidad específica de crecimiento

$$\mu = \frac{\ln(Ca) - \ln(Cao)}{(Ta - Tao)}$$

Donde:

μ = Velocidad específica de crecimiento

Ca = Concentración de células al final de la fase logarítmica de crecimiento

Cao = Concentración de células al inicio de la fase logarítmica de crecimiento

Ta = Tiempo de crecimiento al final de la fase logarítmica de crecimiento

Tao = Tiempo de crecimiento al inicio de la fase logarítmica de crecimiento

11.4 1.5 Ecuación 5: Tiempo de duplicación

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Donde:

μ = Velocidad específica de crecimiento

td = Tiempo de duplicación

11.5 Cálculos

11.5.1 Cálculo 1: Conversión de conteos en cámara a células totales en el sistema

$$9 * 400 * 10^{-7} L * 0.25 L = 8.67 * 10^9 \text{ células}$$

Se utilizó la Ecuación 1 para determinar el número de células totales en el sistema de propagación de P.4.1.A escala 250 mL en el minuto 0 de la curva. Este cálculo se repitió para todos los puntos de la curva de crecimiento en escala de 250 mL y 1000 mL para las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A.

11.5.2 Cálculo 2: Determinación de células por gramo seco de pellet

$$\left(\frac{3.75 * 10^7 \text{ células}}{10 \mu L}\right) * \left(\frac{10^3 \mu L}{mL}\right) * \left(\frac{mL}{0.01g}\right) = 3.75 * 10^{11} \text{ células/gramo}$$

Se utilizó la Ecuación 2 para determinar el número de células por gramo para los pellet recuperados de de P.4.1.A. Este cálculo se repitió en triplicado para los pellets obtenidos para las cepas P.4.1.A, P.5.2.A y P.5.3.A.

11.5.3 Cálculo 3: Gramos de pellet a agregar a la mezcla de cemento

$$\frac{1 * 10^8 \left(\frac{\text{Células}}{cm^3}\right) * 16.38 cm^3 * 6}{3.75 * 10^{11} \left(\frac{\text{Células}}{g}\right)} = 0.05g$$

Se utilizó la Ecuación 3 para determinar los gramos de pellet de esporas de P.4.1.A. para añadir a una mezcla de 6 cubos de cemento de 2 pulgadas cúbicas según la norma NTG 41003 (ASTMC

109) . Este cálculo se repitió para determinar el peso del inóculo para todas las otras otras muestras de biocemento.

11.5.4 Cálculo 4: Velocidad específica de crecimiento

$$\frac{\ln(5.27)-\ln(2.77)}{(450-180)\text{min}} = 0.016$$

Se utilizó la Ecuación 4 para determinar la velocidad específica de crecimiento para cepa P.5.2.A. en escala 250mL. Este cálculo se repitió para determinar la velocidad específica de crecimiento para todas las cepas a las dos escalas

11.5.5 Cálculo 5: Tiempo de duplicación

$$\frac{\ln(2)}{0.015} = 46 \text{ min}$$

Se utilizó la Ecuación 5 para determinar la velocidad específica de crecimiento para cepa P.5.2.A. en escala 250mL. Este cálculo se repitió para determinar el tiempo de duplicación de crecimiento para todas las cepas a las dos escalas

11.6 Análisis de error y estadística

11.6.1 Ecuaciones

Ecuación 6. Propagación de error para sumas y restas

$$s_y = \sqrt{(s_a)^2 + (s_b)^2 + (s_c)^2 \dots}$$

Donde:

S_y = Incertidumbre del resultado

$S_{a,b,c,\dots}$ = Incertidumbre de cada medida a, b, c, etc.

11.6.2 Ecuación 7. Propagación de error para multiplicaciones y divisiones

$$\frac{s_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{s_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{s_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{s_c}{c}\right)^2 \dots}$$

Donde:

S_y = Incertidumbre del resultado (multiplicación/división)

y = Valor del resultado del cálculo

a, b, c... = Valor de cada medida

$S_{a,b,c,\dots}$ = Incertidumbre de cada medida a, b, c, etc.

11.6.3 Ecuación 8. Q de Dixon para determinación de valores atípicos

$$Q_{Exp} = \frac{V_a - V_{a-1}}{V_{max} - V_{min}}$$

Donde:

n= Tamaño de la muestra

Va= Valor sospechoso

Va-1= Valor anterior del valor sospechoso

Vmax= Valor máximo de la serie

Vmin= Valor mínimo de la serie

Qexp = Valor del resultado del cálculo para Q experimental

11.6.2 Cálculos

11.6.2.1 Cálculo 6. Propagación de error para sumas y restas

$$s_y = \sqrt{(0.5)^2 + (0.5)^2} = 0.7$$

Se utilizó la Ecuación 4 para determinar la incertidumbre del diferencial de presión. Se sumó las incertidumbres de las presiones de los diferentes puntos. Este cálculo se repitió para todas las operaciones que implican sumas, y restas presentadas anteriormente.

11.6.2.2 Cálculo 7. Propagación de error para multiplicaciones y divisiones

$$S_y = 37.8\% * \sqrt{\left(\frac{0.7}{6.12}\right)^2 + \left(\frac{0.5}{16.46}\right)^2} = \pm 1.23\%$$

Se utilizó la Ecuación 5 para determinar la incertidumbre del porcentaje de error del tubo PVC con un caudal de 40 LPM. Este cálculo se repitió para todas las operaciones que implican multiplicaciones y divisiones anteriormente.

11.6.2.3 Cálculo 8. Q de Dixon para determinación de valores atípicos

$$Q_{Exp} = \frac{V_a - V_{a-1}}{V_{max} - V_{min}}$$

Si $Q_{exp} > Q_c$, se descarta el valor

Se utilizó la Ecuación 6 para evaluar el valor Q experimental de los valores sospechosos de ser atípicos durante el estudio

11.7 Datos calculados

Cuadro 22: Datos calculados para obtener las bacterias totales en solución para las curvas de crecimiento de la cepa P.4.1.A

Escala		250mL					1000mL				
Cepa	Tiempo (min)	Bacterias promedio por cuadro	Bacterias totales en área de conteo	Volumen de conteo (L)	Concentración (Bacterias/L)	Bacterias totales en solución	Bacterias promedio por cuadro	Bacterias totales en área de conteo	Volumen de conteo (L)	Concentración (Bacterias/L)	Bacterias totales en solución
P.4.1.A	0	9	3.47E+03	1.00E-07	3.47E+10	8.67E+09 ± 4.33E+08	9	3.60E+03	1.00E-07	3.60E+10	3.60E+10 ± 1.08E+09
	90	9	3.47E+03	1.00E-07	3.47E+10	8.67E+09 ± 4.33E+08	9	3.60E+03	1.00E-07	3.60E+10	3.60E+10 ± 1.08E+09
	180	21	8.53E+03	1.00E-07	8.53E+10	2.13E+10 ± 1.07E+09	31	1.23E+04	1.00E-07	1.23E+11	1.23E+11 ± 6.13E+09
	270	43	1.73E+04	1.00E-07	1.73E+11	4.33E+10 ± 2.17E+09	57	2.27E+04	1.00E-07	2.27E+11	2.27E+11 ± 1.13E+10
	360	82	3.28E+04	1.00E-07	3.28E+11	8.20E+10 ± 4.10E+09	69	2.76E+04	1.00E-07	2.76E+11	2.76E+11 ± 1.38E+10
	450	83	3.33E+04	1.00E-07	3.33E+11	8.33E+10 ± 4.17E+09	69	2.77E+04	1.00E-07	2.77E+11	2.77E+11 ± 1.38E+10
	540	84	3.35E+04	1.00E-07	3.35E+11	8.37E+10 ± 4.18E+09	69	2.77E+04	1.00E-07	2.77E+11	2.77E+11 ± 1.39E+10

Cuadro 23: Datos calculados para obtener las bacterias totales en solución para las curvas de crecimiento de la cepa P.5.2.A

Escala		250mL					1000mL				
Cepa	Tiempo (min)	Bacterias promedio por cuadro	Bacterias totales en área de conteo	Volumen de conteo (L)	Concentración (Bacterias/L)	Bacterias totales en solución	Bacterias promedio por cuadro	Bacterias totales en área de conteo	Volumen de conteo (L)	Concentración (Bacterias/L)	Bacterias totales en solución
P.5.2.A	0	9	3.47E+03	1.00E-07	3.47E+10	8.67E+09 ± 4.33E+08	9	3.60E+03	1.00E-07	3.60E+10	3.60E+10 ± 1.80E+09
	90	18	7.07E+03	1.00E-07	7.07E+10	1.77E+10 ± 8.83E+08	29	1.16E+04	1.00E-07	1.16E+11	1.16E+11 ± 5.80E+09
	180	37	1.47E+04	1.00E-07	1.47E+11	3.67E+10 ± 1.83E+09	62	2.47E+04	1.00E-07	2.47E+11	2.47E+11 ± 1.23E+10
	270	62	2.48E+04	1.00E-07	2.48E+11	6.20E+10 ± 3.10E+09	105	4.19E+04	1.00E-07	4.19E+11	4.19E+11 ± 2.09E+10
	360	68	2.72E+04	1.00E-07	2.72E+11	6.80E+10 ± 3.40E+09	115	4.61E+04	1.00E-07	4.61E+11	4.61E+11 ± 2.31E+10
	450	69	2.76E+04	1.00E-07	2.76E+11	6.90E+10 ± 0	117	4.67E+04	1.00E-07	4.67E+11	4.67E+11 ± 2.33E+10

						3.45E+09					
	540	69	2.76E+04	1.00E-07	2.76E+11	6.90E+10 ± 3.45E+09	114	4.56E+04	1.00E-07	4.56E+11	4.56E+11 ± 2.38E+10

Cuadro 24: Datos calculados para obtener las bacterias totales en solución para las curvas de crecimiento de la cepa P.5.3.A

Escala		250mL					1000mL				
Cepa	Tiempo (min)	Bacterias promedio por cuadro	Bacterias totales en área de conteo	Volumen de conteo (L)	Concentración (Bacterias/L)	Bacterias totales en solución	Bacterias promedio por cuadro	Bacterias totales en área de conteo	Volumen de conteo (L)	Concentración (Bacterias/L)	Bacterias totales en solución
P.5.3.A	0	7	2.80E+03	1.00E-07	2.80E+10	7.00E+09 ± 3.50E+08	8	3.33E+03	1.00E-07	3.33E+10	3.33E+10 ± 1.67E+09
	90	8	3.33E+03	1.00E-07	3.33E+10	8.33E+09 ± 4.17E+08	10	4.13E+03	1.00E-07	4.13E+10	4.13E+10 ± 2.07E+09

180	17	6.80E+0 3	1.00E-0 7	6.80E+10	1.70E+10 ± 8.50E+08	19	7.47E+0 3	1.00E-0 7	7.47E+10	7.47E+10 0± 3.73E+0 9
270	34	1.37E+0 4	1.00E-0 7	1.37E+11	3.43E+10 ± 1.72E+09	60	2.40E+0 4	1.00E-0 7	2.40E+11	2.40E+11 ± 1.20E+1 0
360	68	2.73E+0 4	1.00E-0 7	2.73E+11	6.83E+10 ± 3.42E+09	120	4.79E+0 4	1.00E-0 7	4.79E+11	4.79E+11 ± 2.39E+1 0
450	74	2.95E+0 4	1.00E-0 7	2.95E+11	7.37E+10 ± 3.68E+09	131	5.24E+0 4	1.00E-0 7	5.24E+11	5.24E+11 ± 2.62E+1 0
540	79	3.16E+0 4	1.00E-0 7	3.16E+11	7.90E+10 ± 3.95E+09	134	5.37E+0 4	1.00E-0 7	5.37E+11	5.37E+11 ± 2.69E+1 0

Cuadro 25: Datos para convertir gramos de biomasa recuperada con el método a células

Escala		250mL		1000mL	
Cepa	Esporas por gramo de pellet	Biomasa recuperada (+-0.0007g)	No de esporas en pellet	Biomasa recuperada (+-0.0007g)	No de esporas en pellet
P.4.1.A	3.75E+11(±) 1.88E+10	0.233	8.74E+10	0.719	2.70E+11
		0.221	8.29E+10	0.772	2.90E+11
		0.202	7.58E+10	0.784	2.94E+11
P.5.2.A	1.30E+11(±) 6.53E+09	0.368	4.78E+10	1.055	1.37E+11
		0.439	5.71E+10	1.079	1.40E+11
		0.380	4.94E+10	0.791	1.03E+11
P.5.3.A	2.58E+11(±) 1.29E+10	0.228	5.87E+10	1.014	2.61E+11
		0.321	8.27E+10	1.260	3.24E+11
		0.231	5.95E+10	1.432	3.69E+11

Cuadro 26: Datos calculados para determinar células por gramo de biomasa

Cepa	Esporas totales en solución	Esporas por gramo de pellet
P.4.1.A	3.75E+07 (±)1.88E+06	3.75E+11(±)1.88E+10
P.5.2.A	1.30E+06 (±)6.50E+05	1.30E+11(±)6.53E+09
P.5.3.A	2.58E+07 (±)1.29E+06	2.58E+11(±)1.29E+10

Cuadro 27: Monitoreo de reparación de grietas con medio TSUC sin datos atípicos

Cepa	Cubo 1	Grieta	Largo de la grieta (mm ± 3%)			Porcentaje de recuperación de grietas	Promedio de recuperación de grietas (± 5%)
			Día 1	Día 18	Día 30		
P.4.1.A	Cubo 1	A	7.3	2.8	0.0	100.0	64.33
		B	5.6	5.0	3.0	46.1	
		C	5.2	4.9	3.7	29.4	
	Cubo 2	A	5.9	2.0	0.8	87.1	
		B	6.2	5.4	1.6	74.8	
		C	5.5	5.2	5.0	10.3	
	Cubo 3	A	6.0	0.7	0.0	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	6.0	4.8	4.7	20.9	42.45
		B	4.3	2.9	2.6	38.9	
		C	6.0	2.2	0.0	100.0	
	Cubo 2	A	5.0	3.2	2.3	54.4	
		B	5.7	5.3	4.6	20.3	
		C	5.0	4.1	4.0	18.5	
	Cubo 3	A	3.5	2.9	2.5	27.1	
		B	5.4	4.3	3.0	43.2	
		C	5.3	4.6	2.2	58.8	
P.5.3.A	Cubo 1	A	6.6	4.5	1.0	85.0	74.71

		B	6.1	3.4	3.4	43.4	
		C	6.8	0.0	0.0	100.0	
	Cubo 2	A	5.3	4.1	0.9	83.2	
		B	7.7	3.1	3.0	60.8	
		C	6.2	1.9	1.6	73.5	
	Cubo 3	A	6.2	2.2	0.0	100.0	
		B	6.6	4.1	0.0	100.0	
		C	6.3	5.8	4.6	26.6	
	N/A	Cubo 2	B	6.0	5.9	5.8	
C			4.5	4.5	4.5	0.0	
E			6.9	6.9	6.9	0.0	
F			7.0	7.0	7.0	0.0	
Cubo 3		B	6.4	6.3	6.2	2.5	
						3.6	
		C	6.4	6.2	6.2		

Cuadro 28: Monitoreo de reparación de grietas LUC sin datos atípicos

Cepa		Grieta	Largo de la grieta (mm \pm 3%)			Porcentaje de recuperación de grietas	Promedio de recuperación de grietas (\pm 5%)
			Día 1	Día 18	Día 30		
P.4.1.A	Cubo 1	A	6.234	535	0	100.00	75.27
		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	5.675	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	30.90		
		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	77.46
			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	6.26	6.095	6.092	0.56	0.36	
		Cubo 2	A	5.39	5.864	5.864	1.26		
			C	7.377	7.377	7.377	0.00		
	Cubo 3	A	5.046	5.046	5.046	0.00			
		B	4.581	4.573	4.569	0.26			
		C	5.833	5.831	5.830	0.05			

Cuadro 29: Monitoreo de reparación de grietas sin medio sin datos atípicos

		Largo de la grieta (mm \pm 3%)	
--	--	----------------------------------	--

Cepa	Cubo 1	Grieta	Día 1	Día 18	Día 30	Porcentaje de recuperación de grietas	Promedio de recuperación de grietas ($\pm 5\%$)
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 30: Resultados de análisis HSD de Turkey comparando medios para la reparación de microgrietas en cemento

Medio de precipitación	Comparación de cepas	Prueba	Valor-p	Conclusión
TSUC	P.4.1.A con P.5.2.A	Prueba HSD de Tukey	$1.74 * 10^{-3}$	Existe diferencia significativa
	P.4.1.A con P.5.3.A	Prueba HSD de Tukey	$5.43 * 10^{-1}$	No hay diferencia significativa
	P.5.2.A con P.5.3.A	Prueba HSD de Tukey	$1.19 * 10^{-4}$	Existe diferencia significativa
LUC	P.4.1.A con P.5.2.A	Prueba HSD de Tukey	$5.00 * 10^{-7}$	Existe diferencia significativa
	P.4.1.A con P.5.3.A	Prueba HSD de Tukey	$9.30 * 10^{-1}$	No hay diferencia significativa
	P.5.2.A con P.5.3.A	Prueba HSD de Tukey	$2.00 * 10^{-7}$	Existe diferencia significativa

Cuadro 31: Resistencias a compresión promedio con las cepas para los medios TSUC, LUC y control

Cepa	Día	Resistencias a compresión ($\pm 1.25\text{psig}$)		
		TSUC	LUC	Blanco

P.4.1.A	1	3678	3515	3685
	3	5708	5945	5714
	7	6358	6946	6790
	28	7551	8299	7290
P.5.2.A	1	4109	3671	3822
	3	5606	5815	5803
	7	6979	6850	6284
	28	7228	8034	7400
P.5.3.A	1	4033	4098	3337
	3	5766	6688	5503
	7	6581	7137	5897
	28	7250	8659	7302
N/A	1	3850	4027	3552
	3	5508	6256	5489
	7	6613	6943	6258
	28	7039	8342	7169

Cuadro 32: Resultados de análisis ANOVA comparando medios para la resistencia a compresión a 28 días de las muestras de biocemento

Cepa	Comparación	Análisis	Valor-p	Interpretación
------	-------------	----------	---------	----------------

P.4.1.A	Blanco y TSUC	ANOVA	$2.29 * 10^{-11}/0$	Existe diferencia significativa
	Blanco y LUC	ANOVA	$2.29 * 10^{-11}/0$	Existe diferencia significativa
	TSUC y LUC	ANOVA	$2.29 * 10^{-11}/0$	Existe diferencia significativa
P.5.2.A	Blanco y TSUC	ANOVA	$1.16 * 10^{-7}/$ $1.30 * 10^{-6}$	Existe diferencia significativa
	Blanco y LUC	ANOVA	$1.16 * 10^{-7}/$ $5.98 * 10^{-5}$	Existe diferencia significativa
	TSUC y LUC	ANOVA	$1.16 * 10^{-7}/$ $2.00 * 10^{-7}$	Existe diferencia significativa
P.5.3.A	Blanco y TSUC	ANOVA	$5.42 * 10^{-11}/0$	Existe diferencia significativa
	Blanco y LUC	ANOVA	$5.42 * 10^{-11}/$ 0	Existe diferencia significativa
	TSUC y LUC	ANOVA	$5.42 * 10^{-11}/$ $1.52 * 10^{-4}$	Existe diferencia significativa

Cuadro 33: Resultados de análisis ANOVA comparando cepas para la resistencia a compresión a 28 días de las muestras de biocemento

Medio	Comparación	Análisis	Valor-p	Interpretación
-------	-------------	----------	---------	----------------

TSUC	P.4.1.A y P.5.2.A	ANOVA	$5.38 * 10^{-8} /$ $1.02 * 10^{-7}$	Existe diferencia significativa
	P.4.1.A y P.5.3.A	ANOVA	$5.38 * 10^{-8} /$ $2.02 * 10^{-7}$	Existe diferencia significativa
	P.5.2.A y P.5.3.A	ANOVA	$5.38 * 10^{-8} /$ $2.19 * 10^{-3}$	Existe diferencia significativa
LUC	P.4.1.A y P.5.2.A	ANOVA	$1.96 * 10^{-10} /$ $7.00 * 10^{-7}$	Existe diferencia significativa
	P.4.1.A y P.5.3.A	ANOVA	$1.96 * 10^{-10} /$ 0	Existe diferencia significativa
	P.5.2.A y P.5.3.A	ANOVA	$1.96 * 10^{-10} /$ 0	Existe diferencia significativa
Blanco	P.4.1.A y P.5.2.A	ANOVA	$1.41 * 10^{-10} /$ $3.70 * 10^{-6}$	Existe diferencia significativa
	P.4.1.A y P.5.3.A	ANOVA	$1.41 * 10^{-10} /$ 0	Existe diferencia significativa
	P.5.2.A y P.5.3.A	ANOVA	$1.41 * 10^{-10} /$ 0	Existe diferencia significativa

Cuadro 34: Porcentajes promedio de calcita para las cepas con medio TSUC, LUC y controles después de 30 días de tratamiento.

Medio	Cepa	% de Calcita
-------	------	--------------

TSUC	P.4.1.A	1.28
	P.5.2.A	1.50
	P.5.3.A	1.74
	N-A	1.02
TSUC	P.4.1.A	3.69
	P.5.2.A	2.71
	P.5.3.A	1.65
	N-A	0.51
Sin medio	P.4.1.A	0.83
	P.5.2.A	0.59
	P.5.3.A	0.82
	N-A	1.21

Figura 21: Curva de crecimiento densidad óptica cepa P.4.1.A escala 1000 mL en triplicado

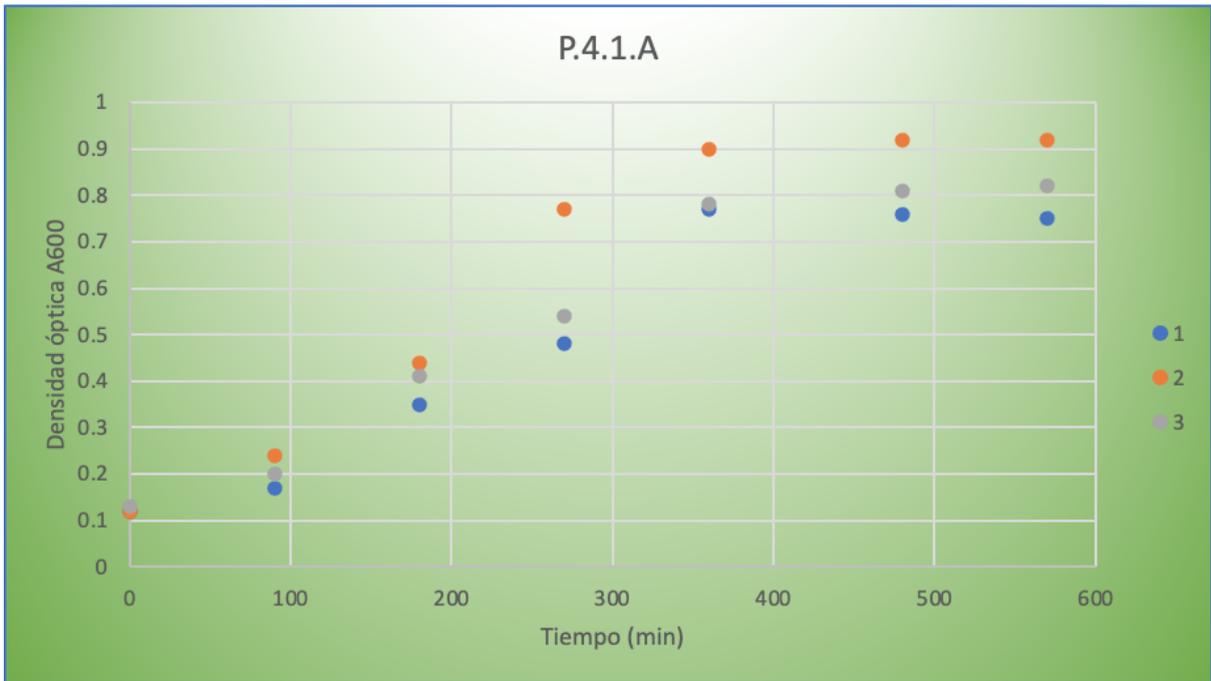


Figura 22: Curva de crecimiento densidad óptica cepa P.5.2.A escala 1000 mL en triplicado

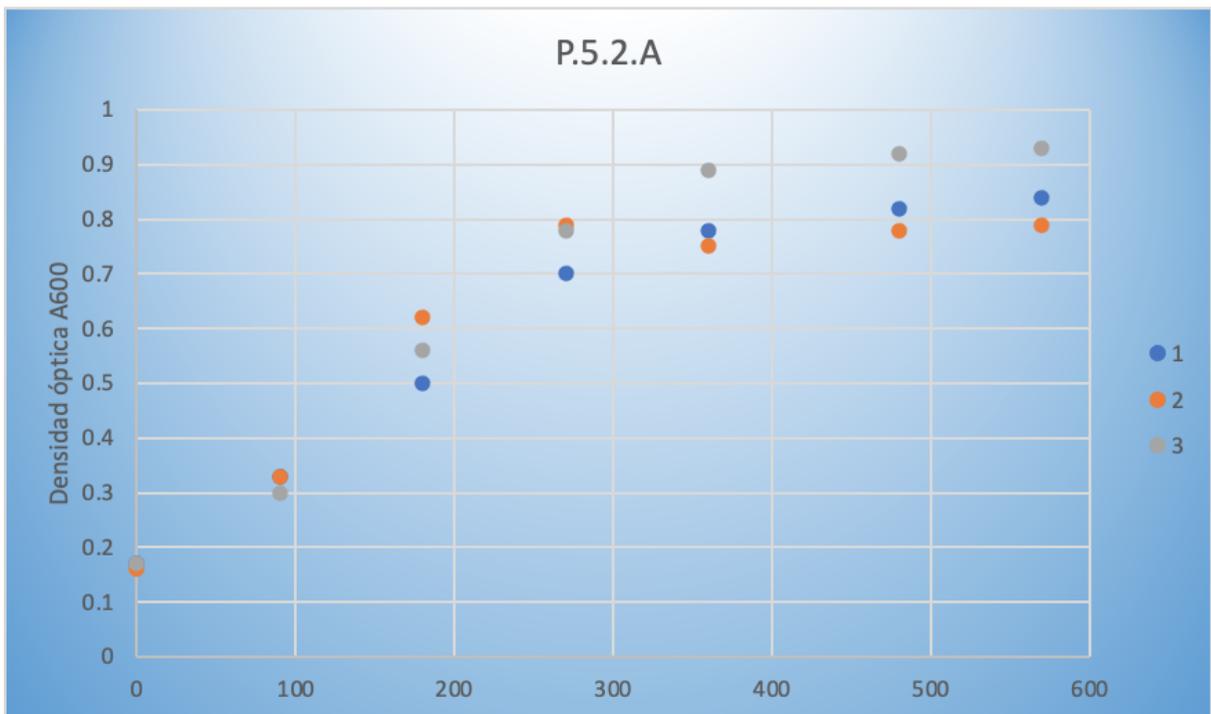


Figura 23: Curva de crecimiento densidad óptica cepa P.5.3.A escala 1000 mL en triplicado

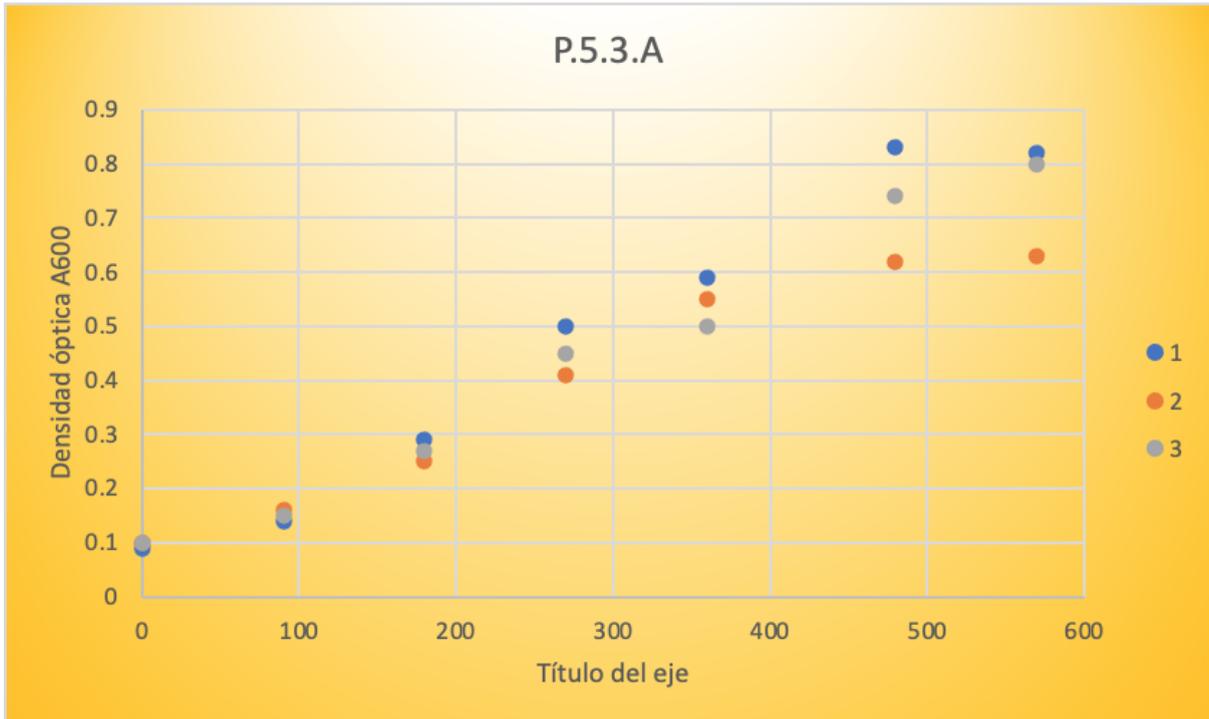


Figura 24: Curva de crecimiento densidad óptica cepa P.4.1.A escala 250 mL en triplicado

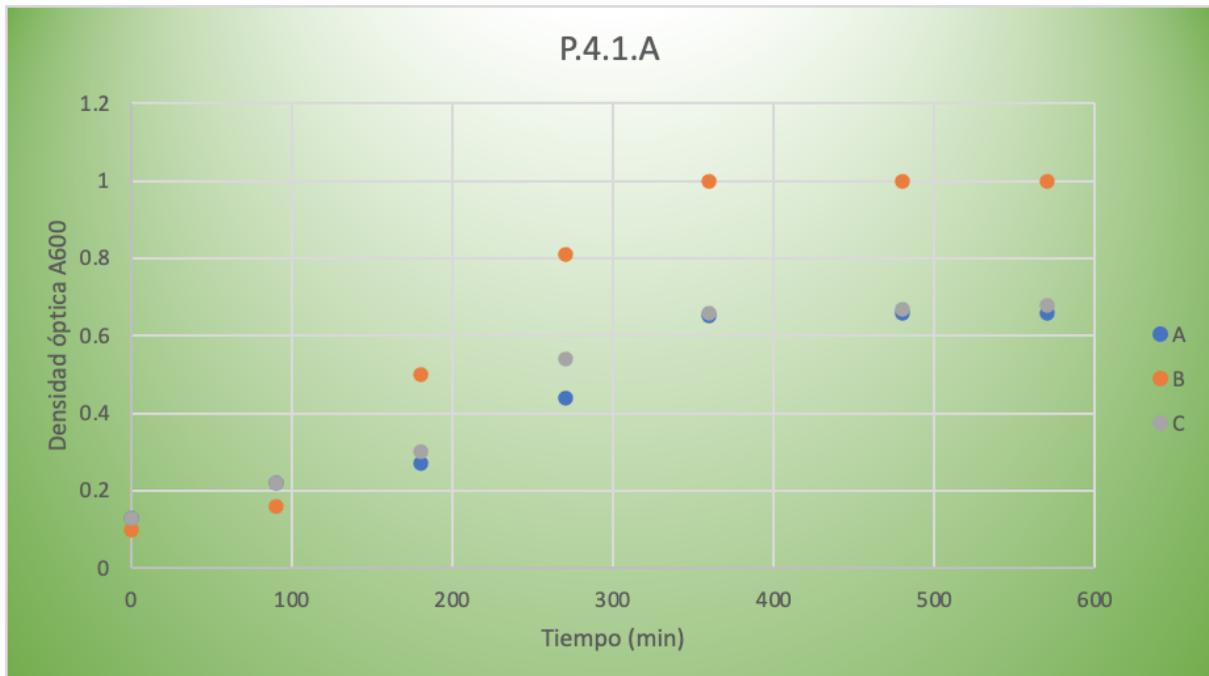


Figura 25: Curva de crecimiento densidad óptica cepa P.5.2.A escala 250 mL en triplicado

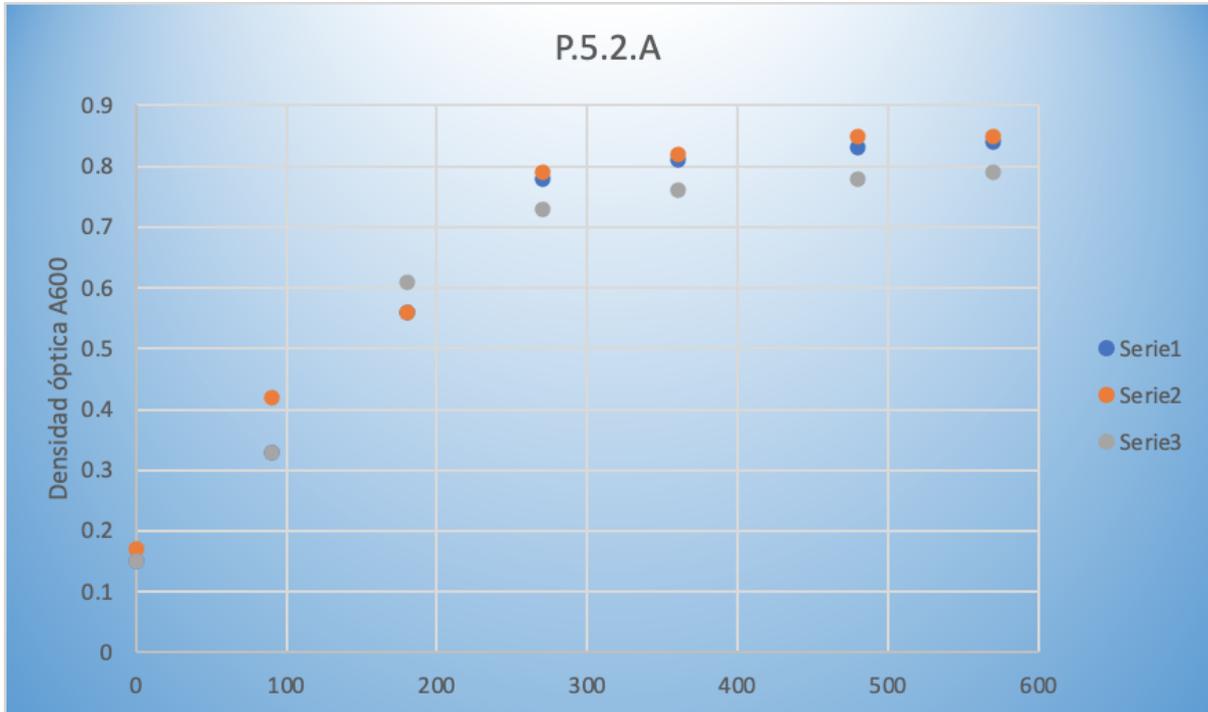


Figura 26: Curva de crecimiento densidad óptica cepa P.5.3.A escala 250 mL en triplicado

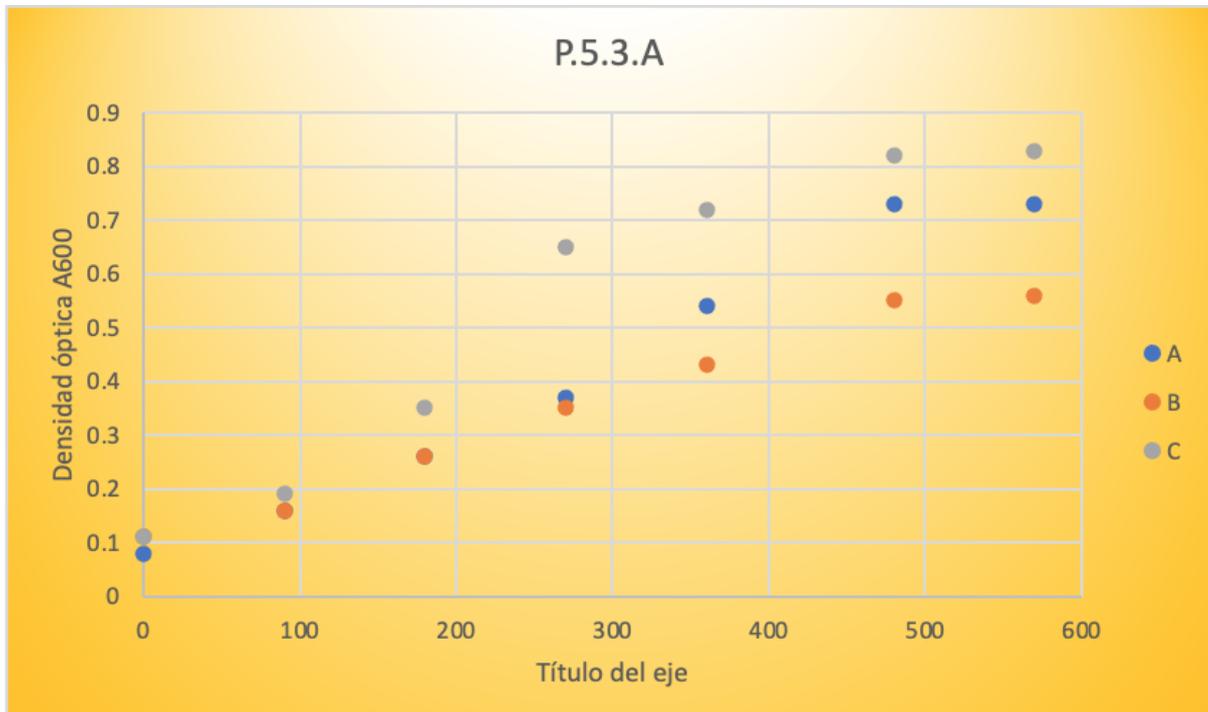
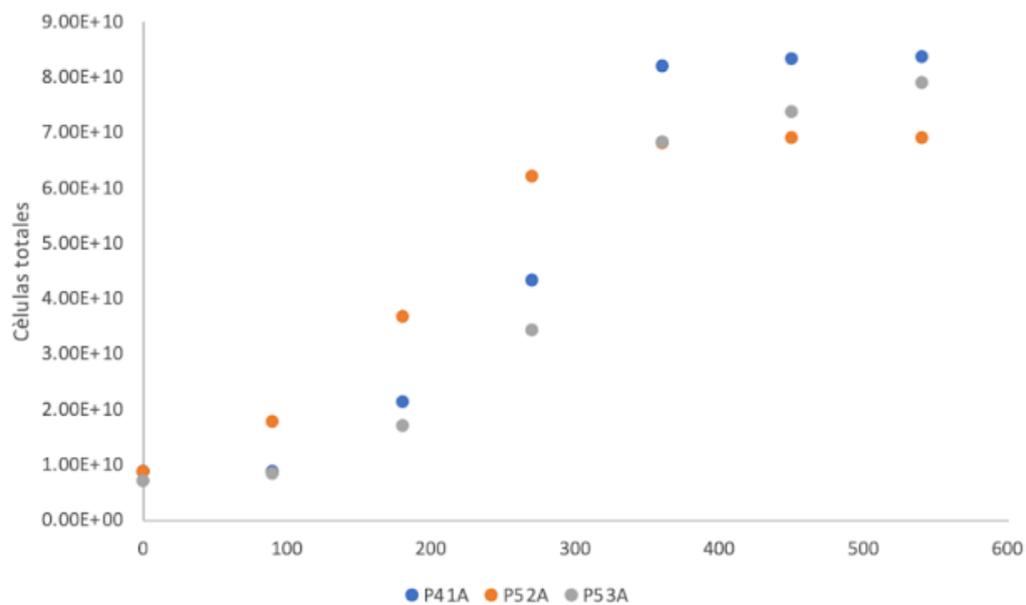
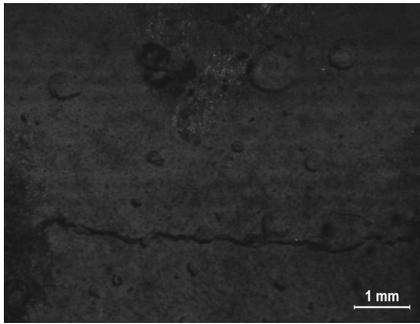
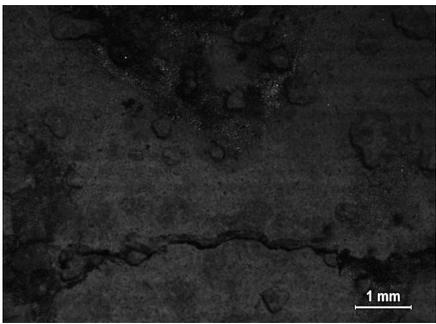
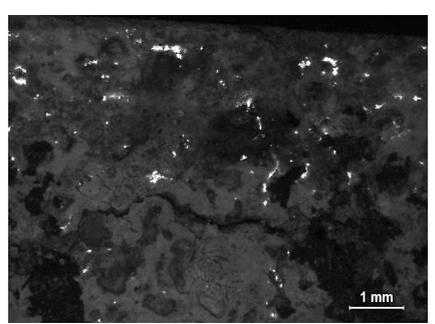
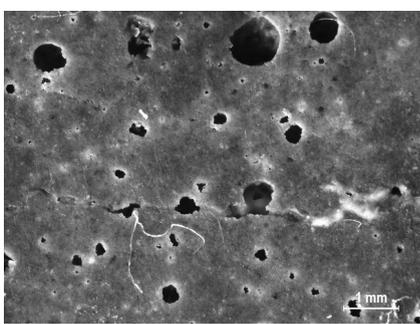
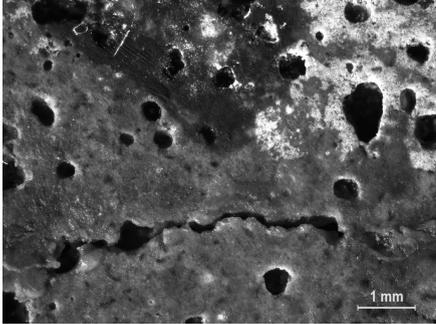
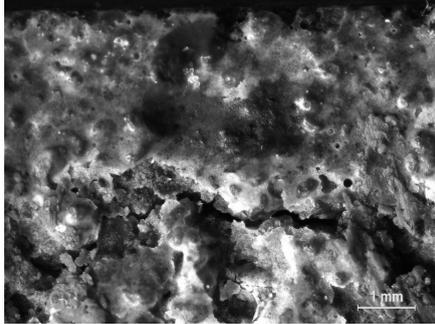
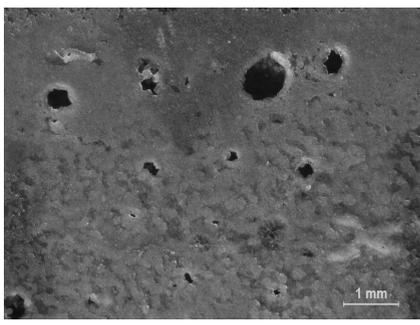
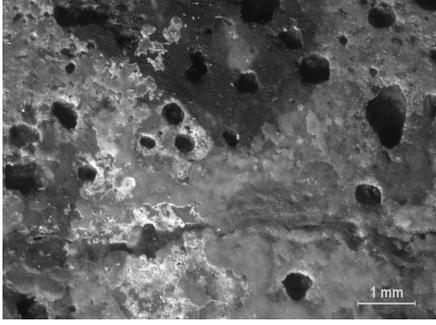
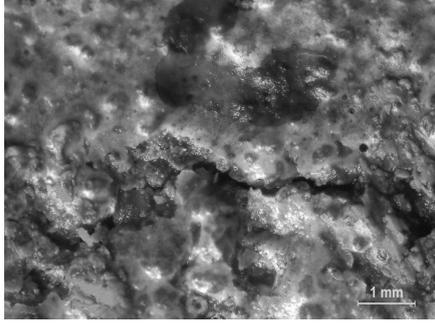


Figura 27: Curvas de crecimiento promedio para las cepas seleccionadas en medio tripticasa de soya escala 250mL

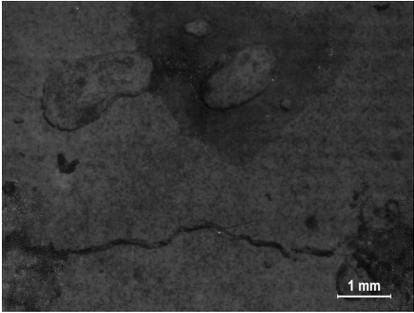
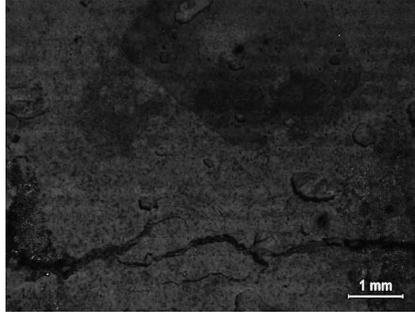
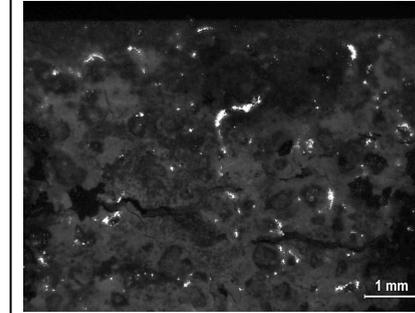
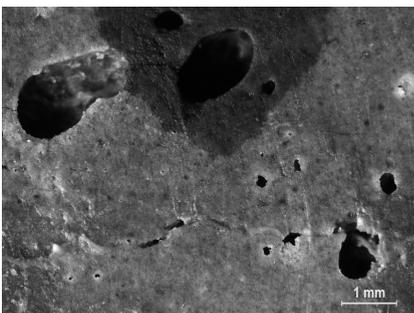
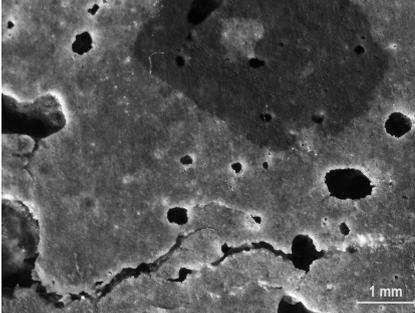
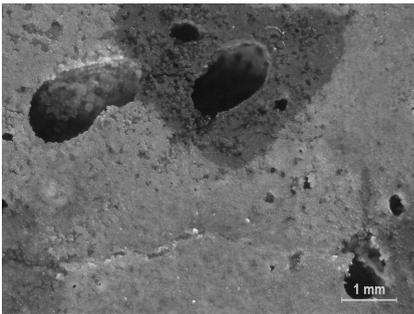
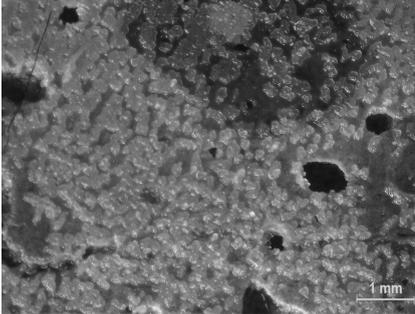


Cuadro 35: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A medio TSUC Cubo 1

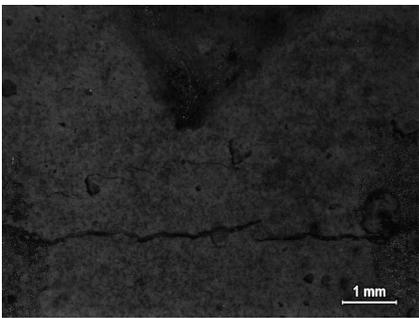
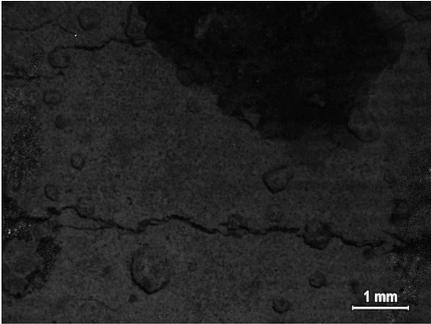
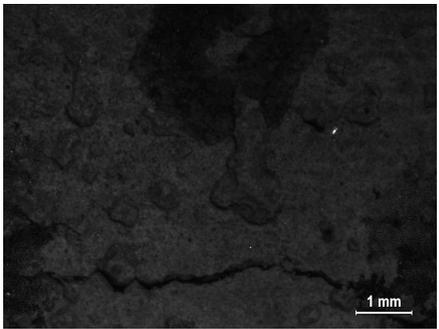
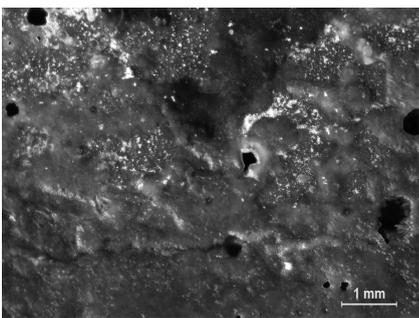
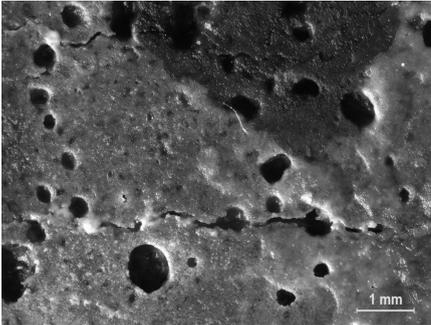
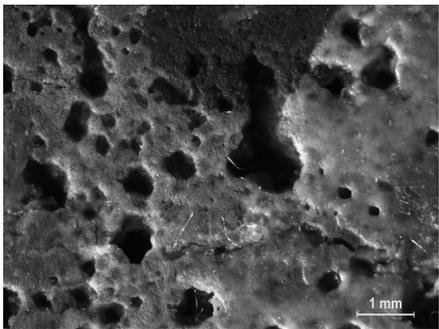
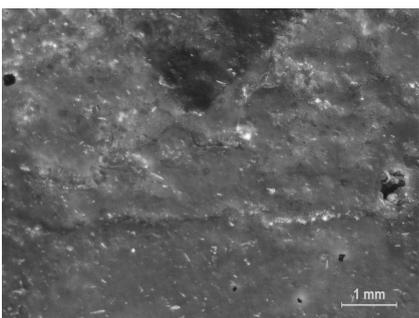
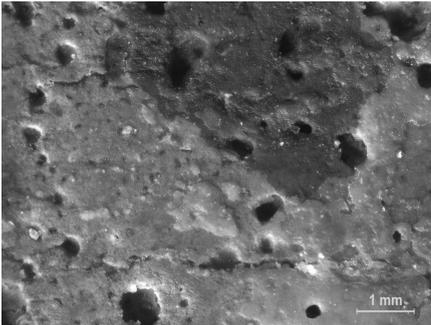
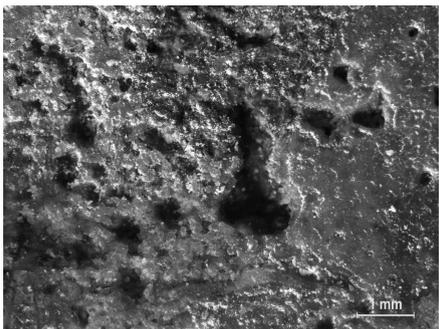
Cubo	1
------	---

Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

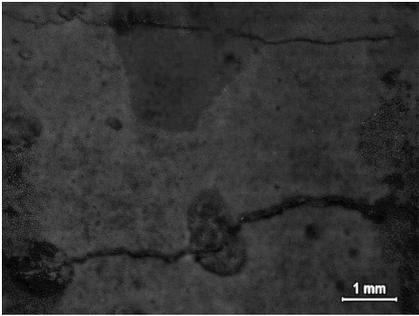
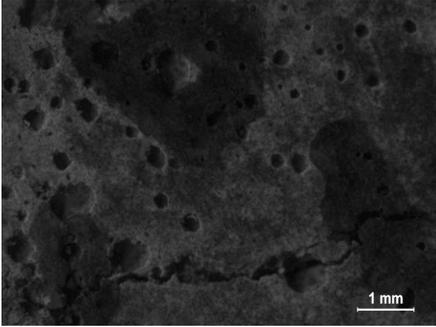
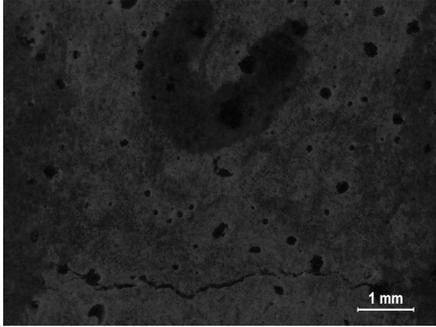
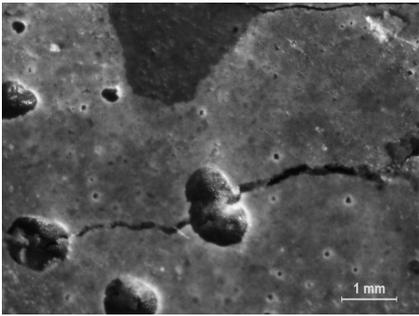
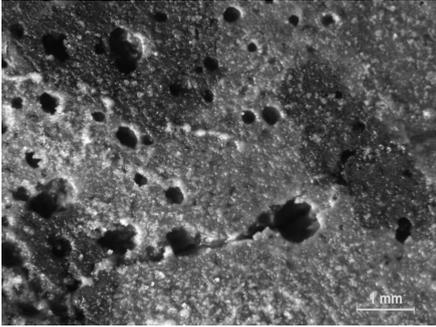
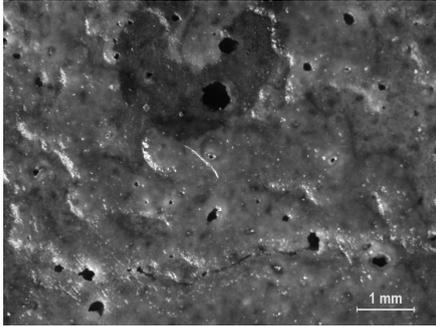
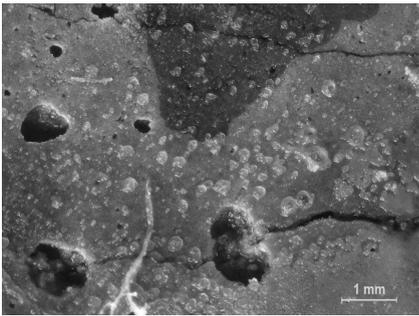
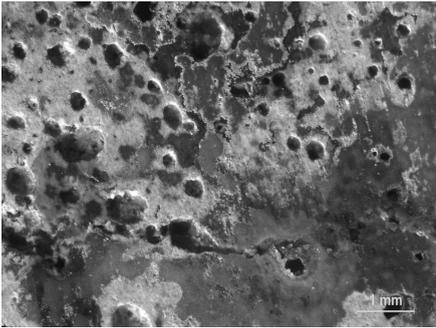
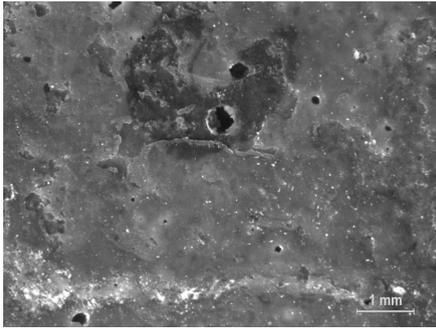
Cuadro 36: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A medio TSUC Cubo 2

Cubo	2		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

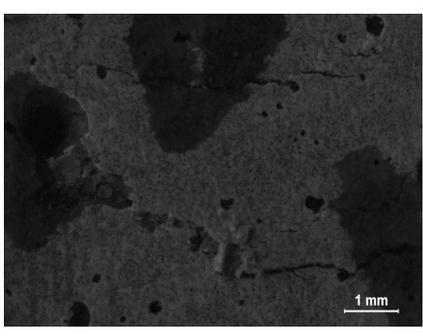
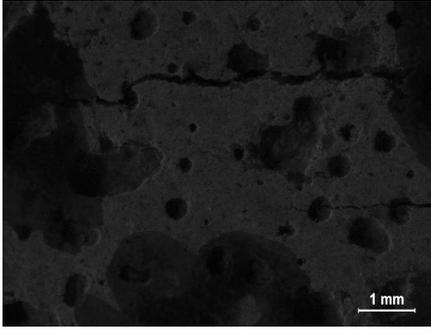
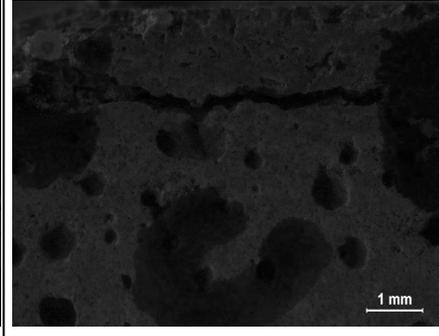
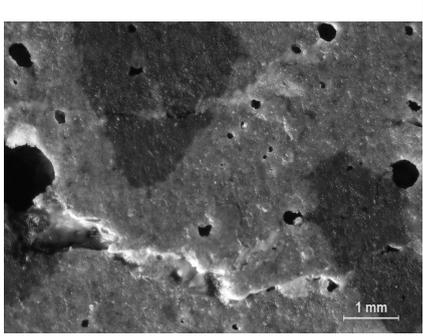
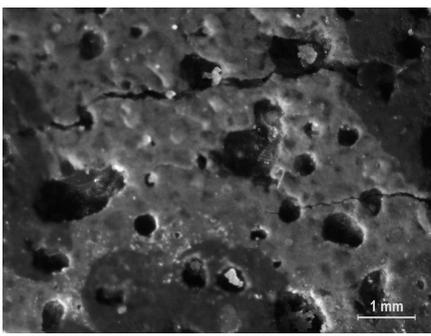
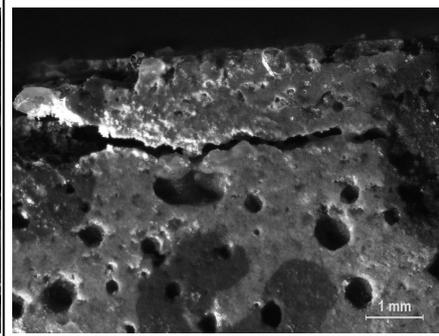
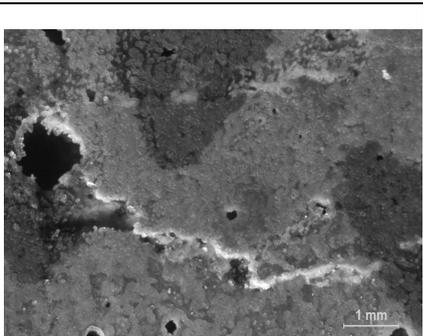
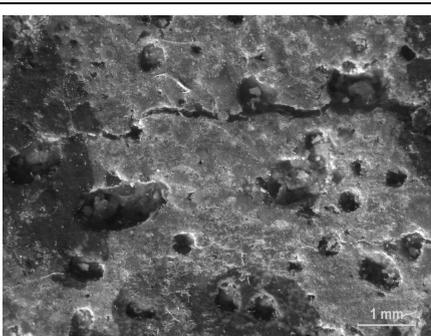
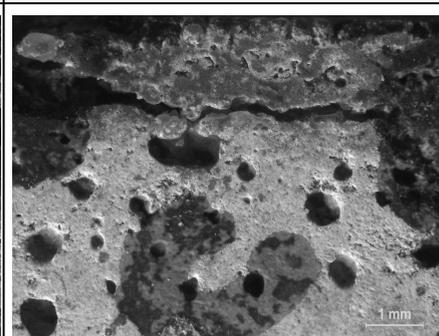
Cuadro 37: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A medio TSUC Cubo 3

Cubo	3		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

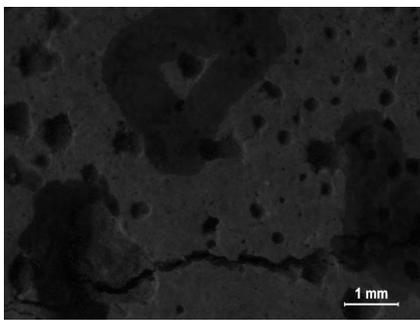
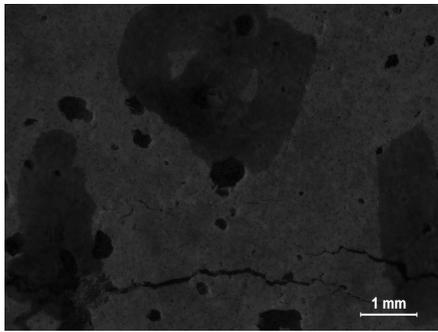
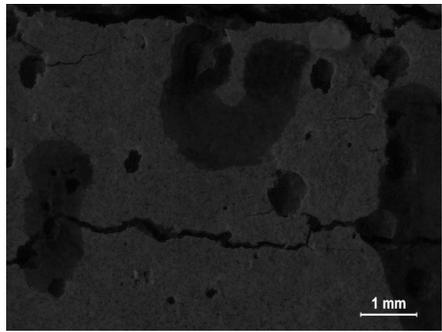
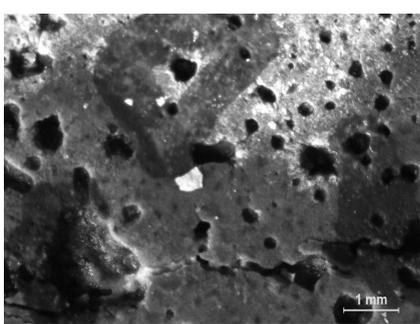
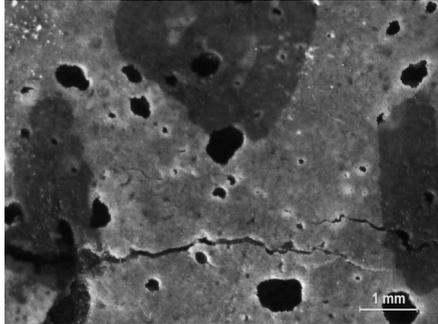
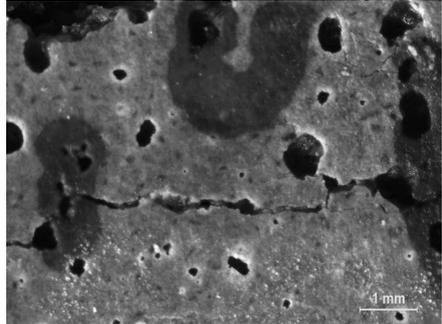
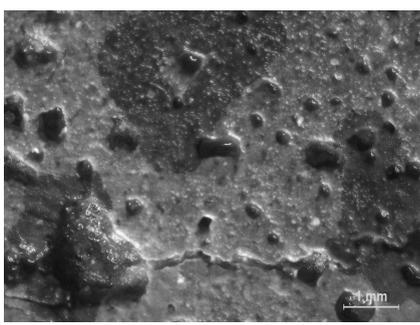
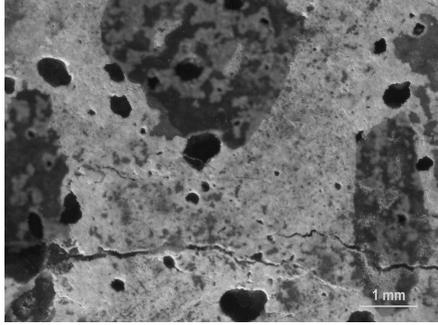
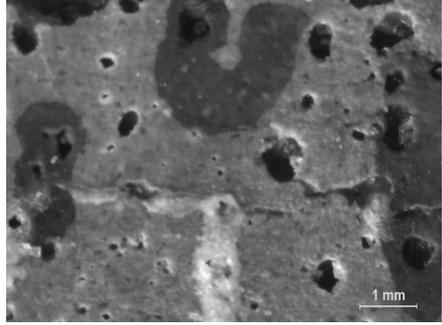
Cuadro 38: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A medio TSUC Cubo 1

Cubo	1		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

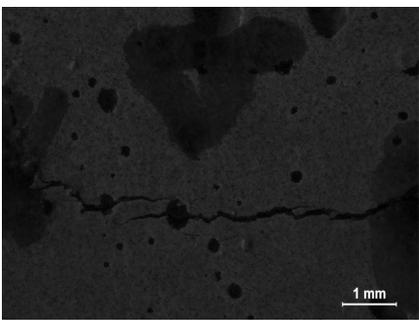
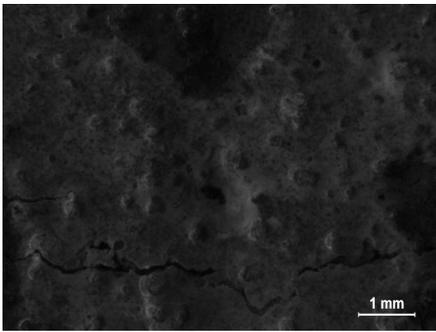
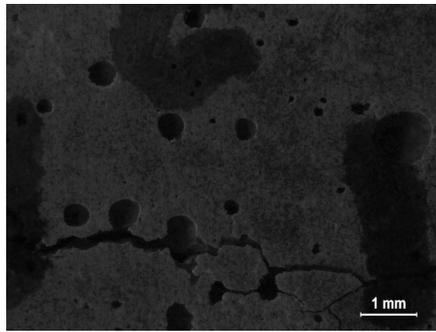
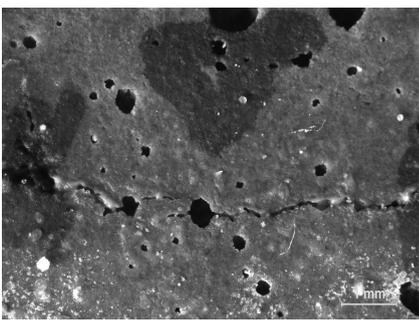
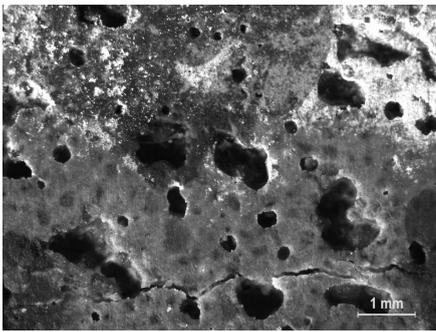
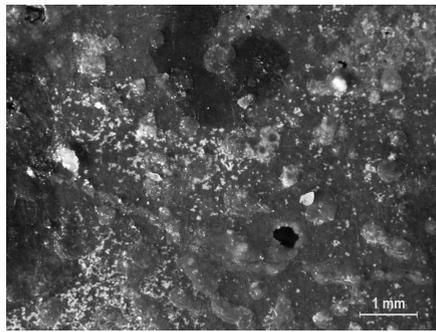
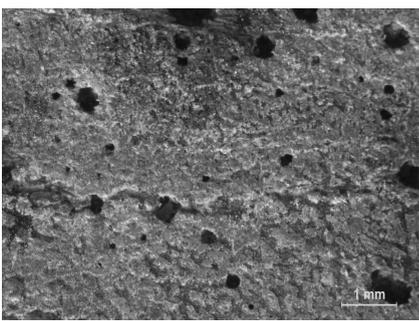
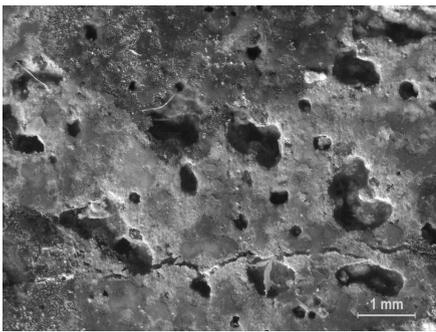
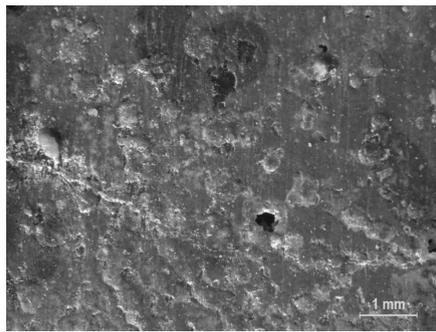
Cuadro 39: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A medio TSUC Cubo 2

Cubo	2		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

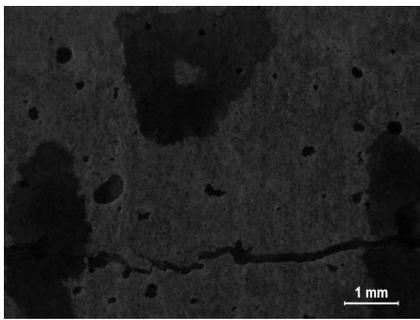
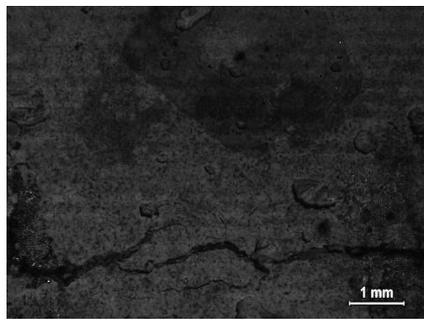
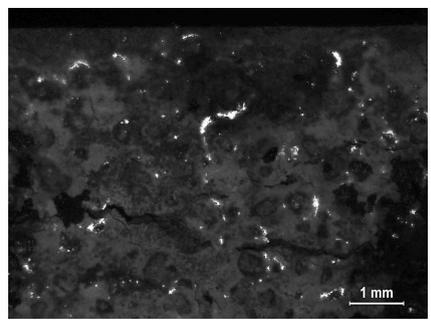
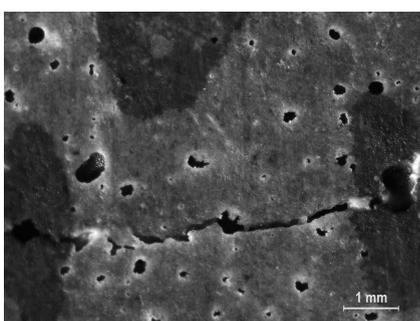
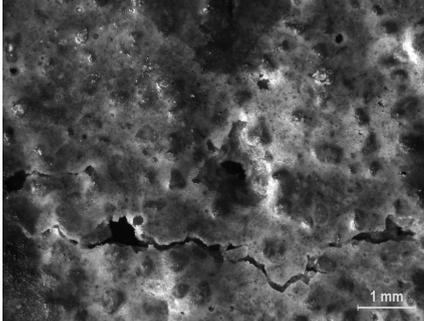
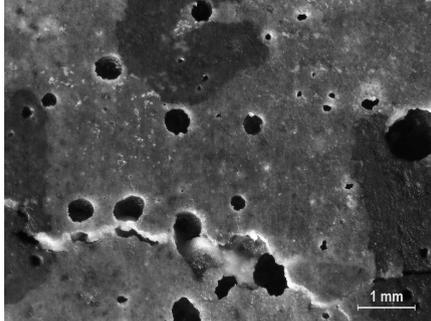
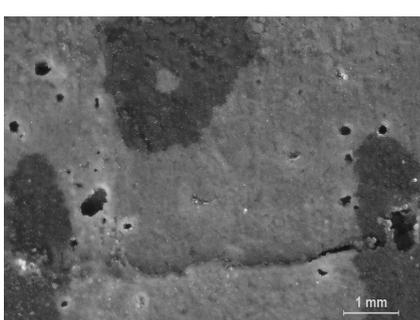
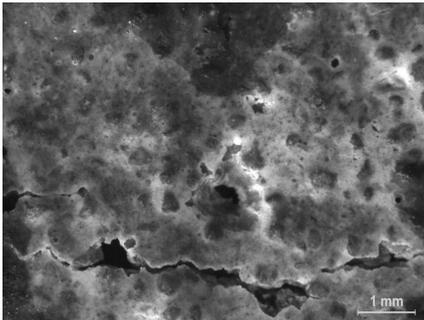
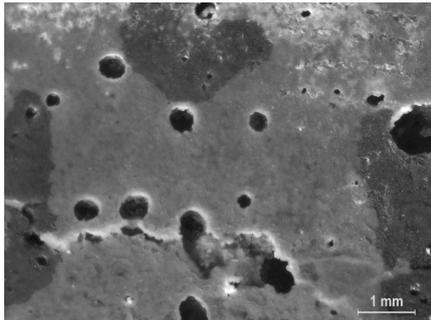
Cuadro 40: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A medio TSUC Cubo 3

Cubo	3		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

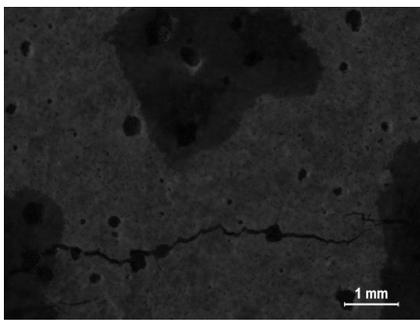
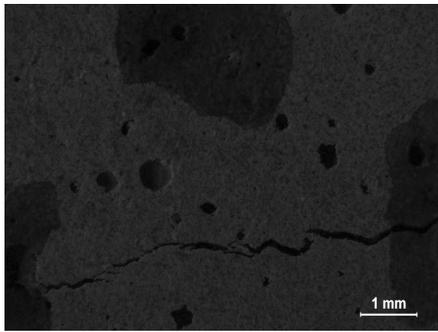
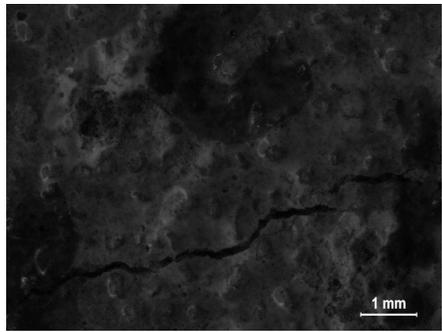
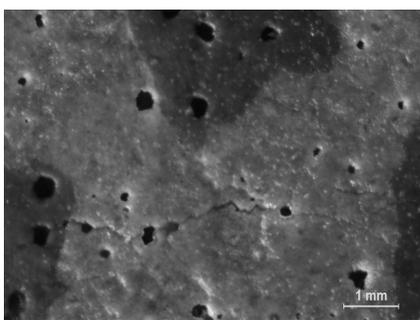
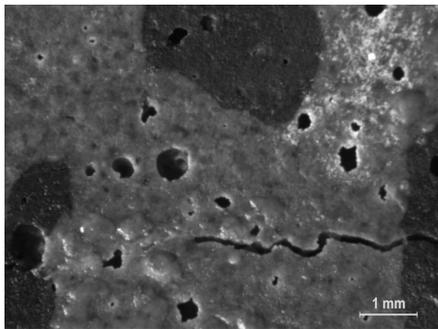
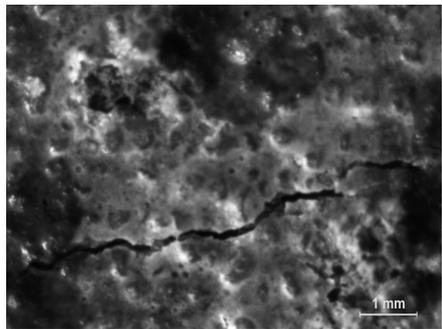
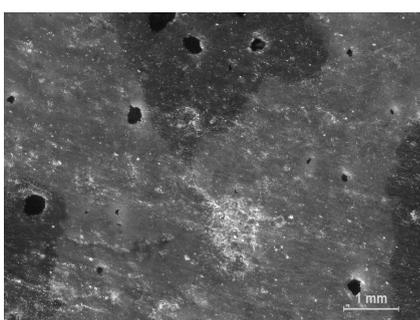
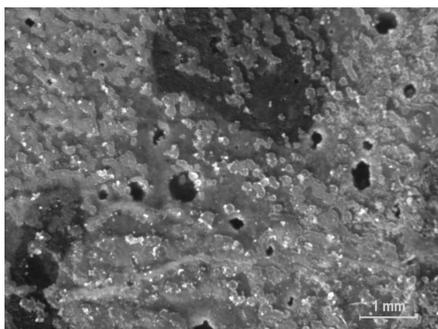
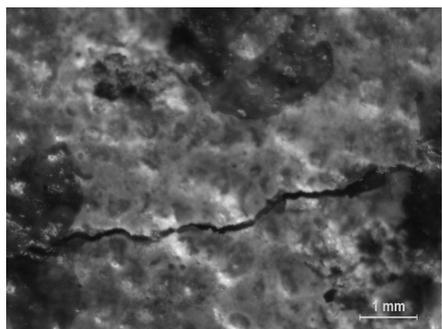
Cuadro 41: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A medio TSUC Cubo 1

Cubo	1		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

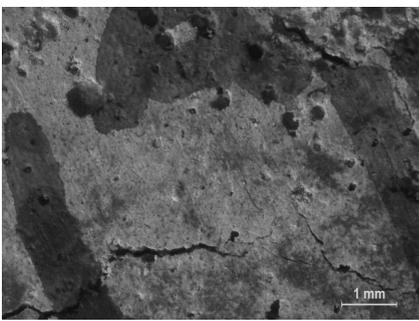
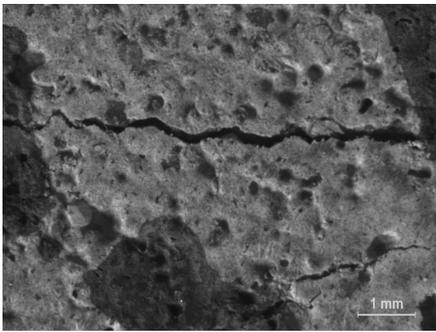
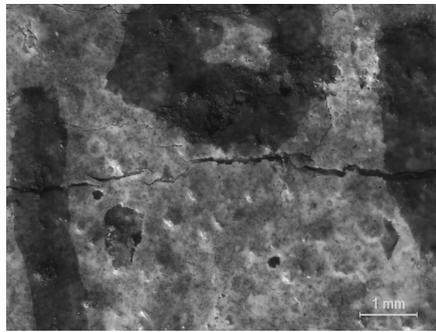
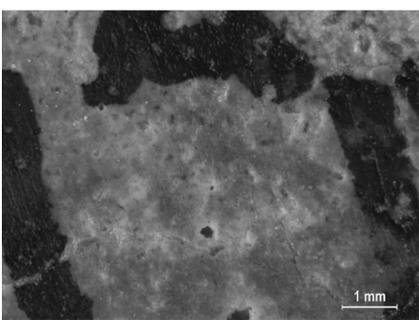
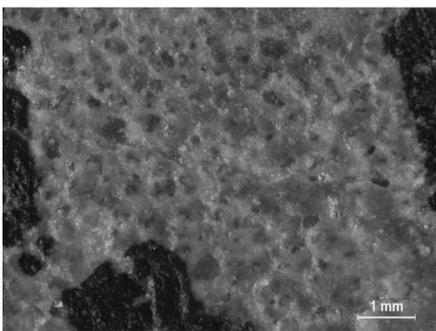
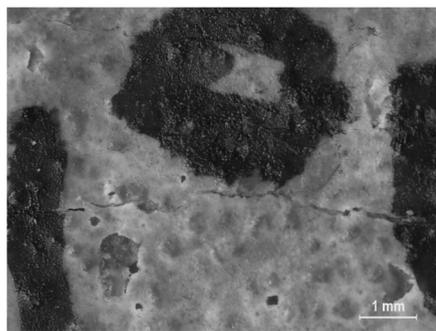
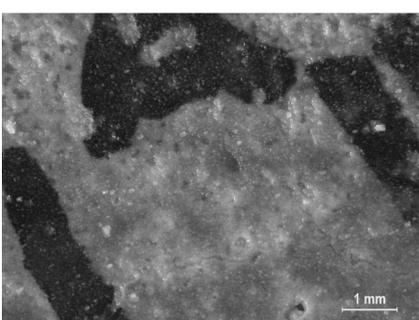
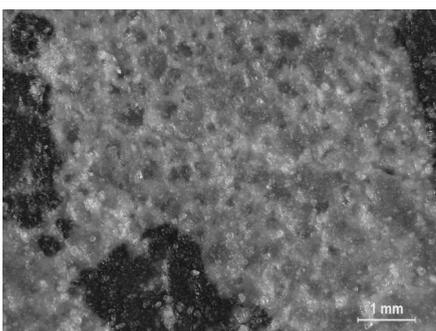
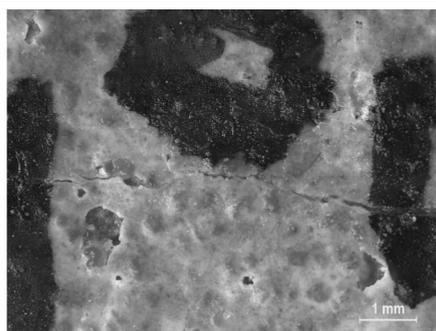
Cuadro 42: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A medio TSUC Cubo 2

Cubo	2		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

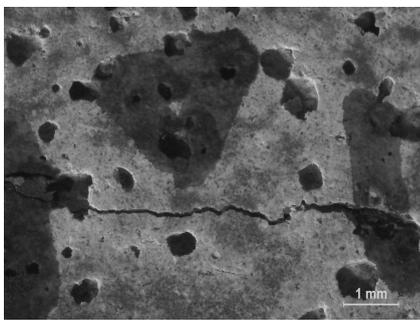
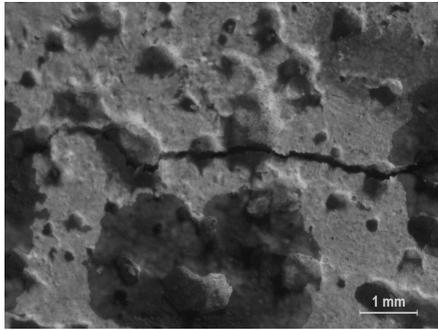
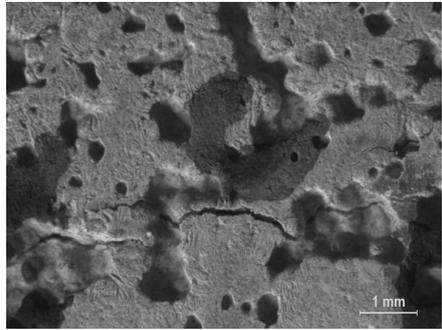
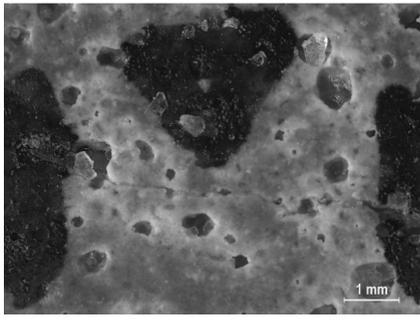
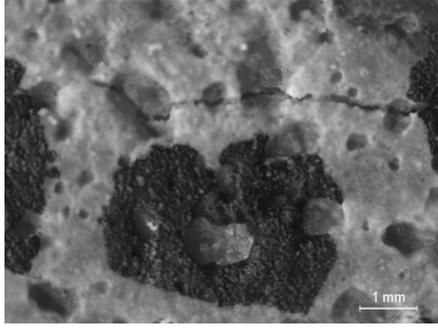
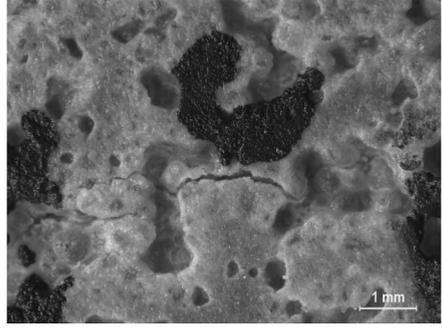
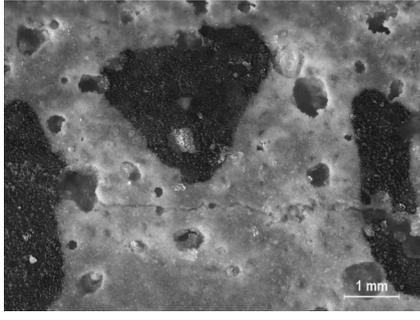
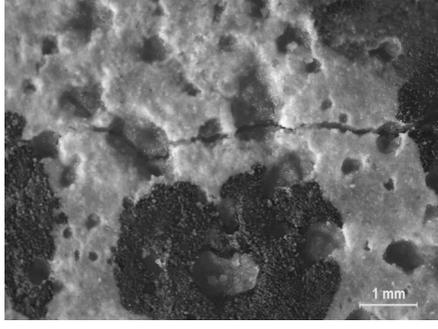
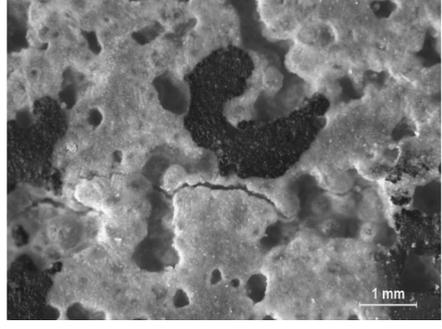
Cuadro 43: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A medio TSUC Cubo 3

Cubo	3		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

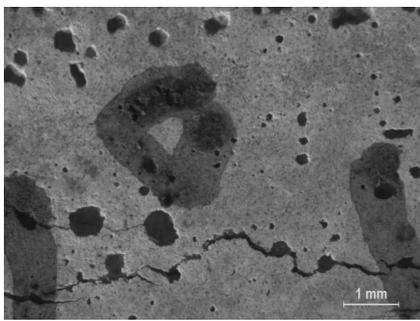
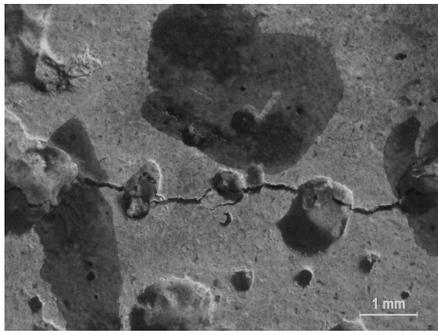
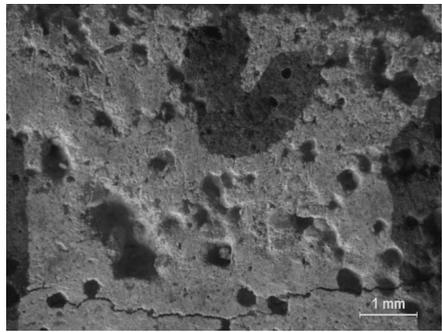
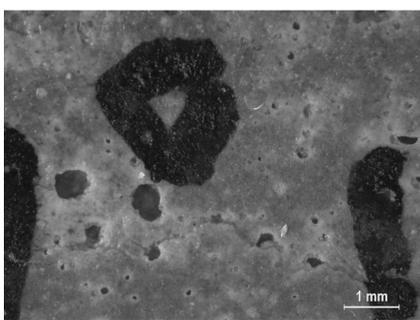
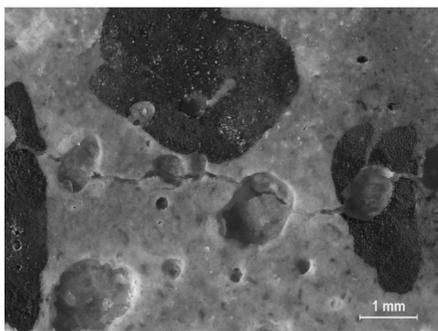
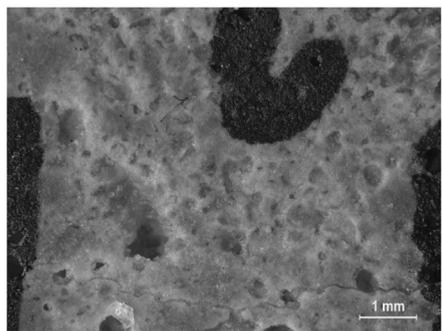
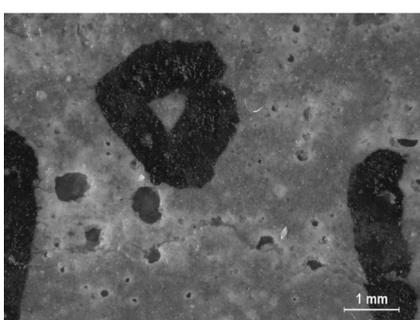
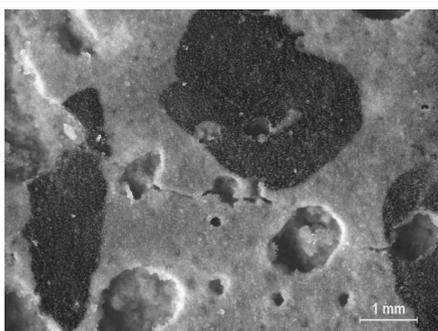
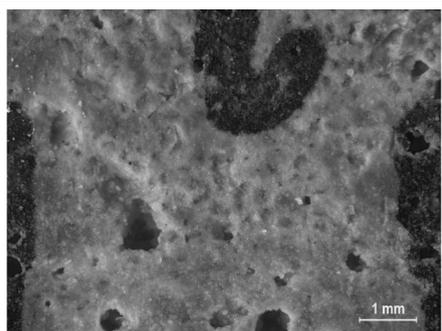
Cuadro 44: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A medio LUC Cubo 1

Cubo	1		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

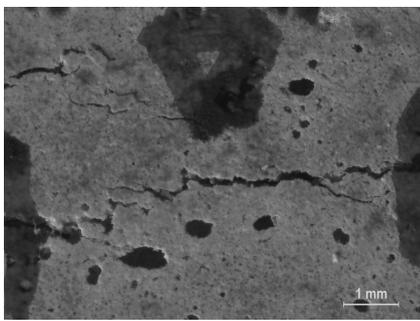
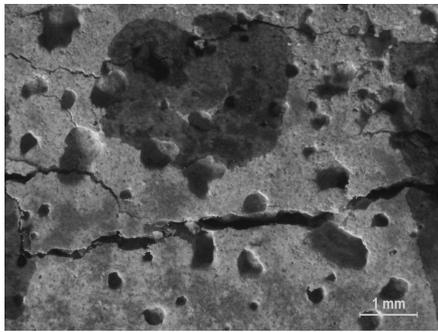
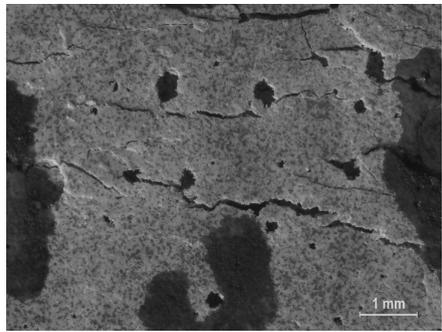
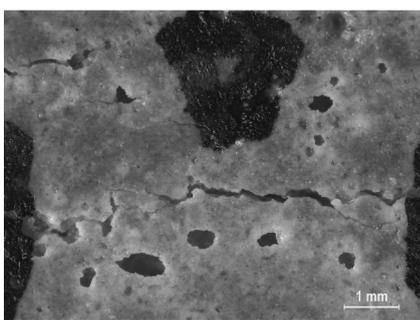
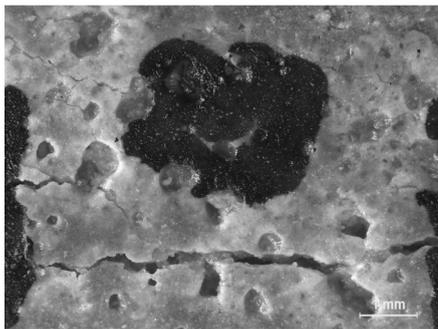
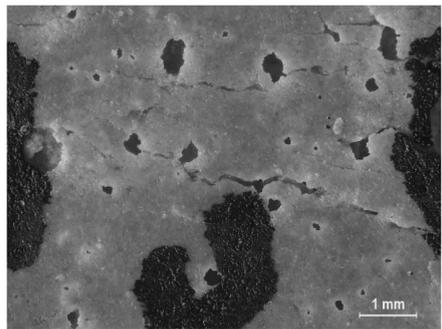
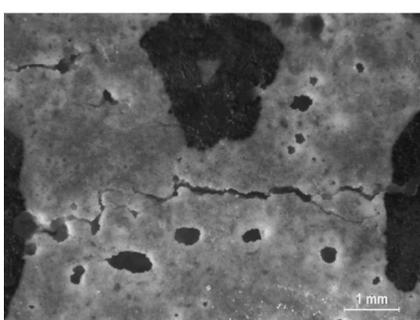
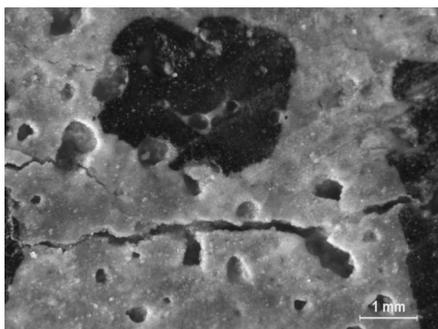
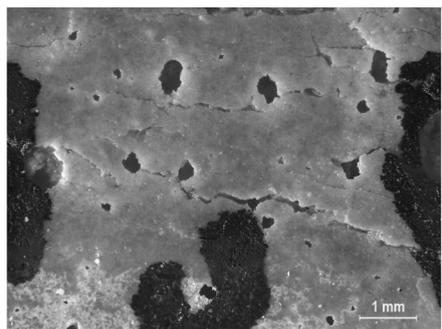
Cuadro 45: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A medio LUC Cubo 2

Cubo	2		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

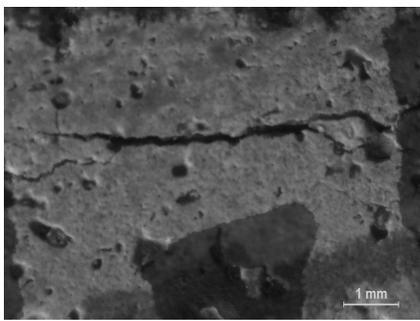
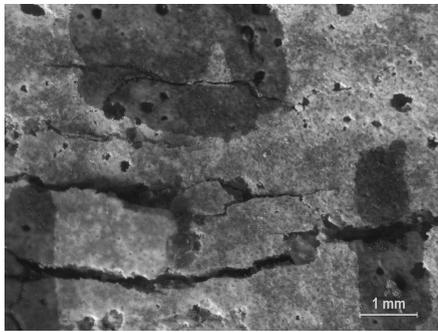
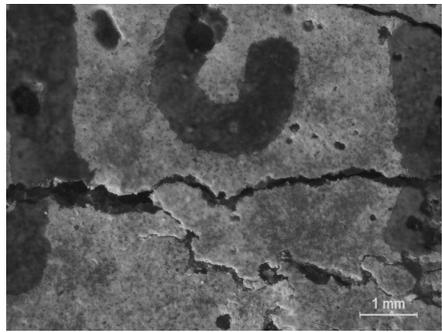
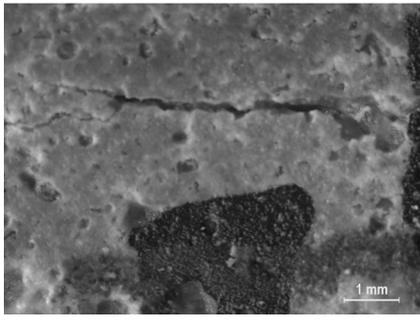
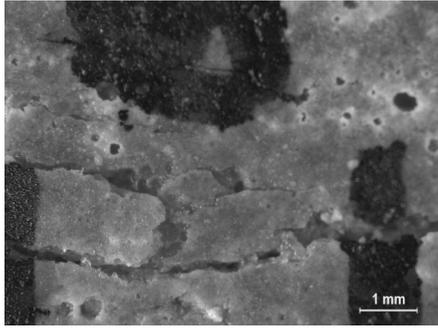
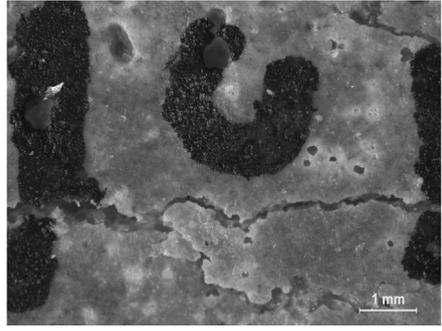
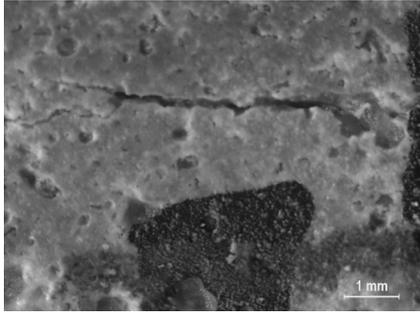
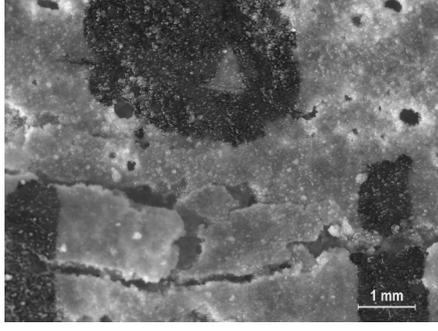
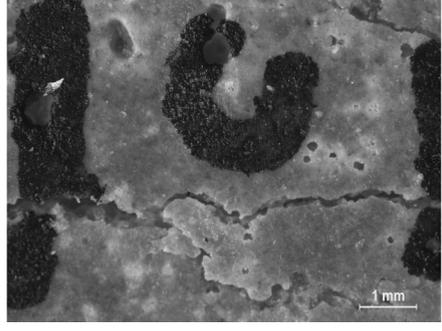
Cuadro 46: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A medio LUC Cubo 3

Cubo	3		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

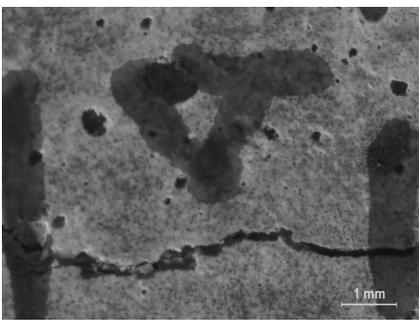
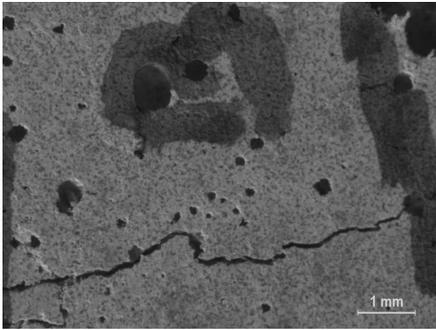
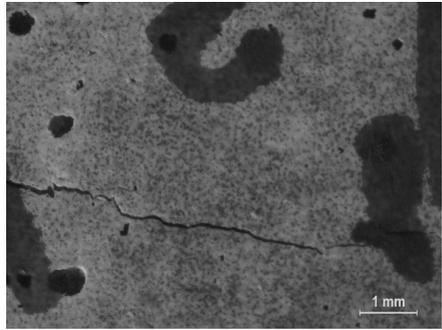
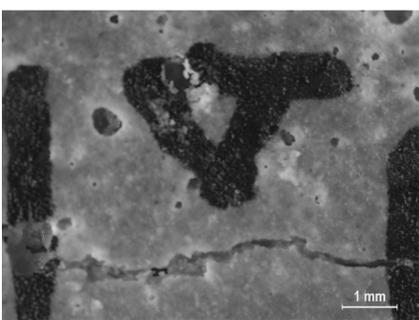
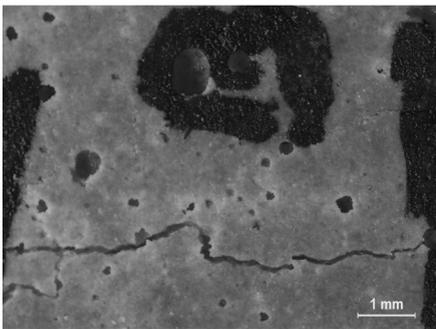
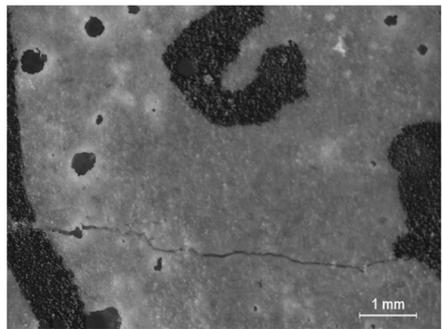
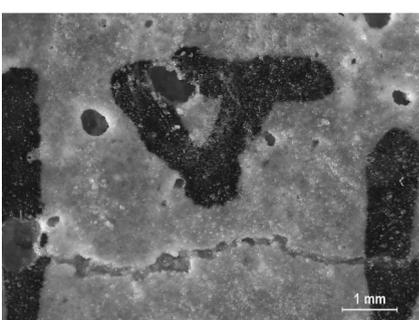
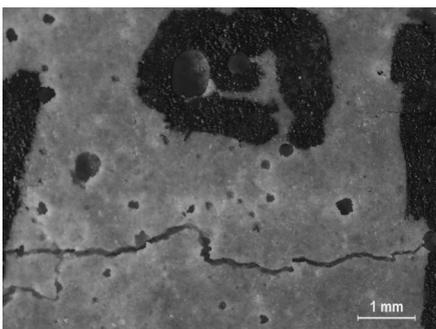
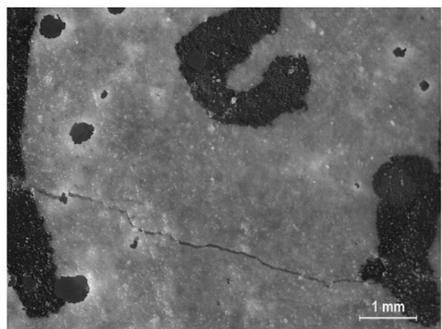
Cuadro 47: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A medio LUC Cubo 1

Cubo	1		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

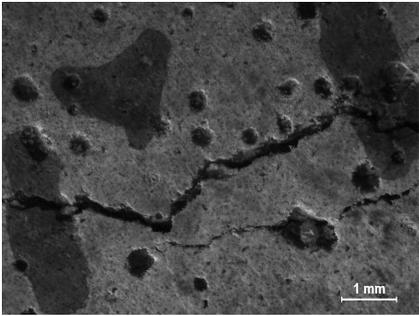
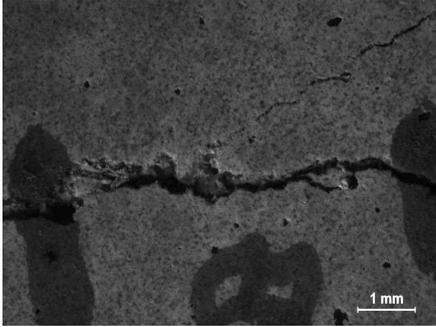
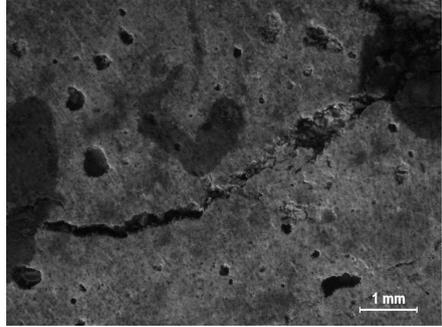
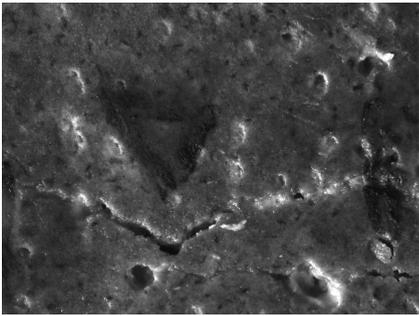
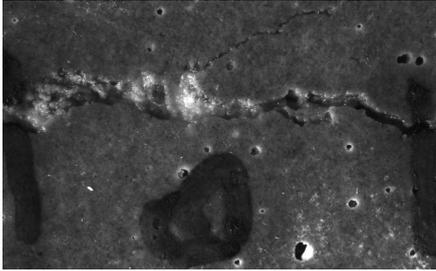
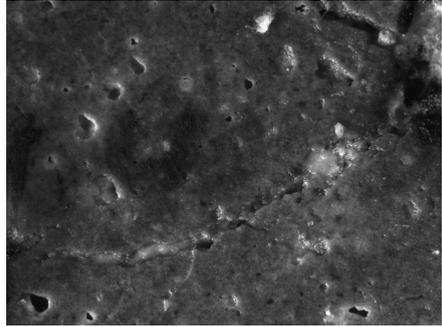
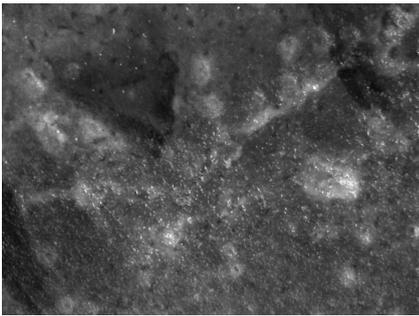
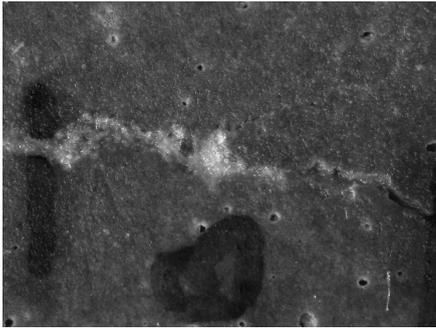
Cuadro 48: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A medio LUC Cubo 2

Cubo	2		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

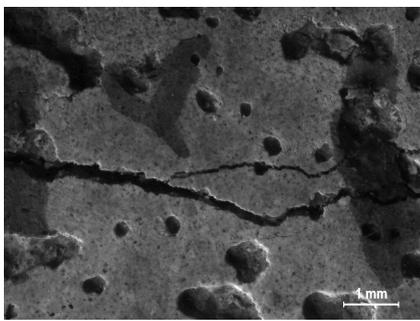
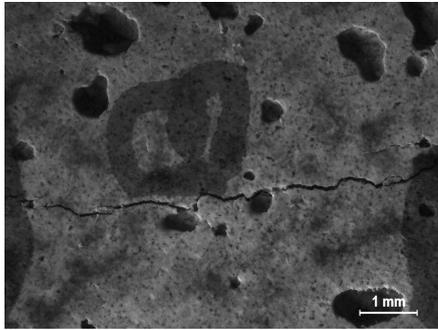
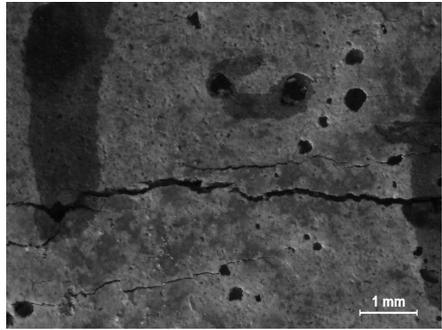
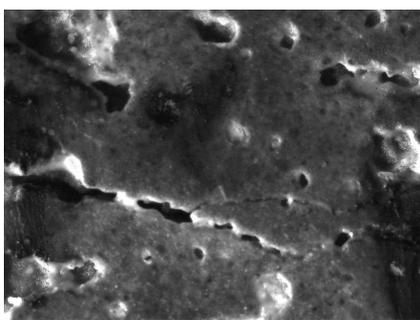
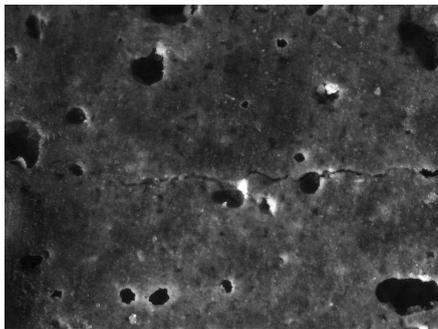
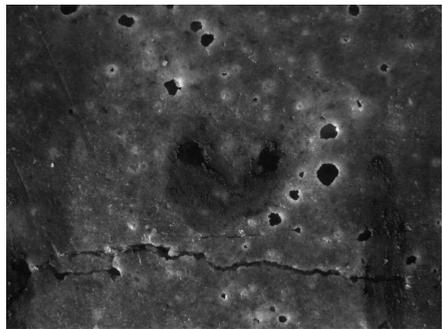
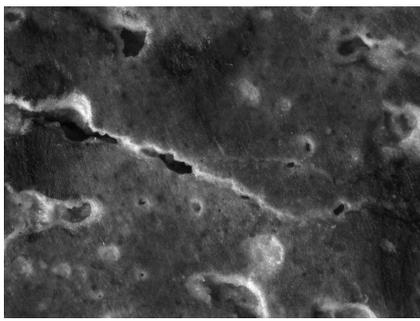
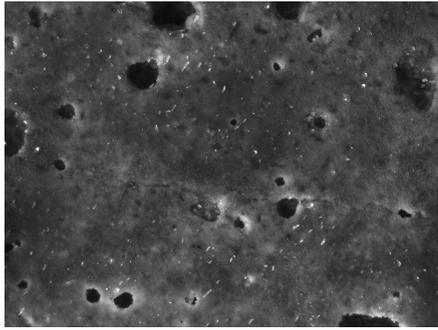
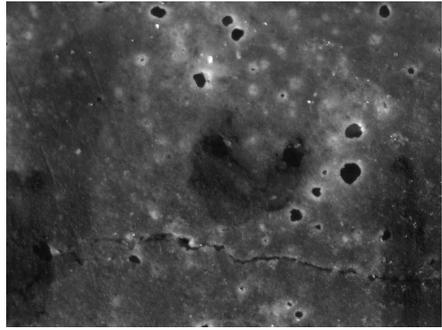
Cuadro 49: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A medio LUC Cubo 3

Cubo	3		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

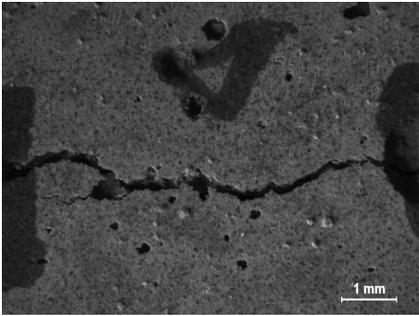
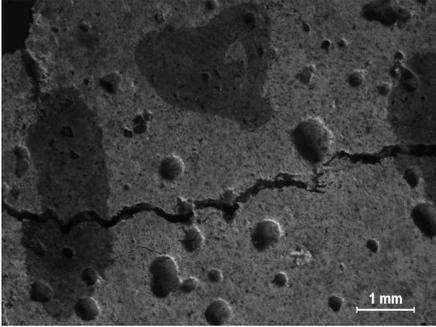
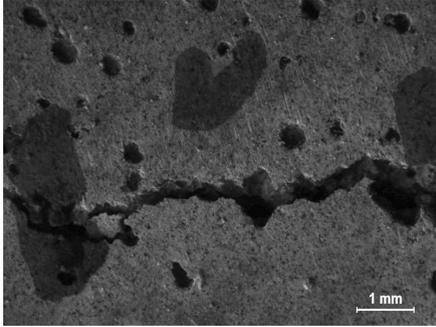
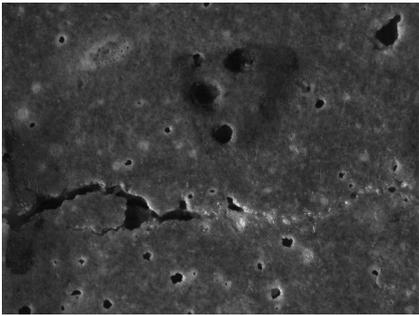
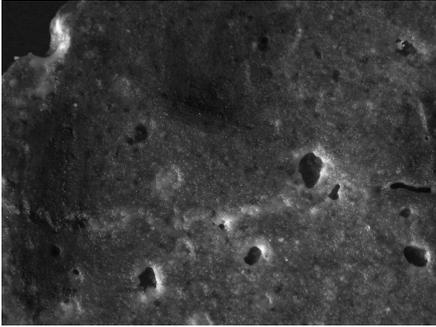
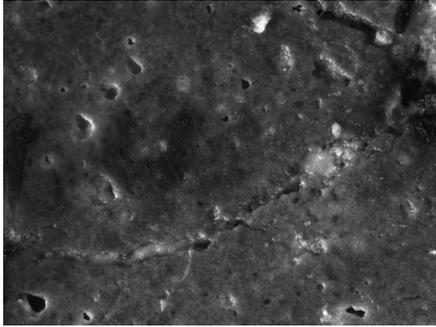
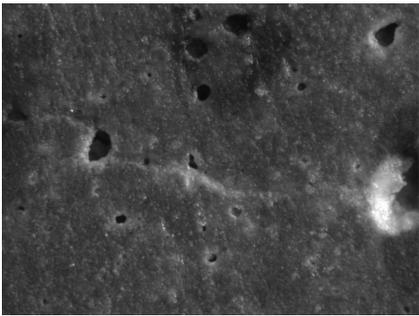
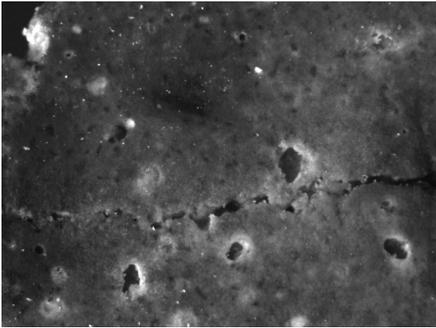
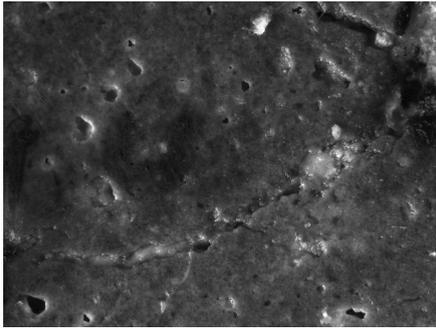
Cuadro 50: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A medio LUC Cubo 1

Cubo	1		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

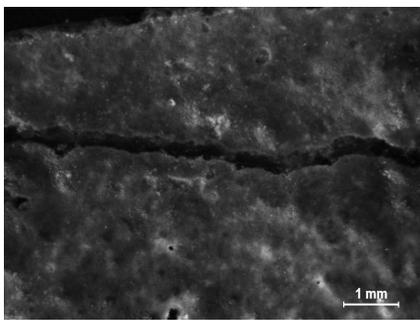
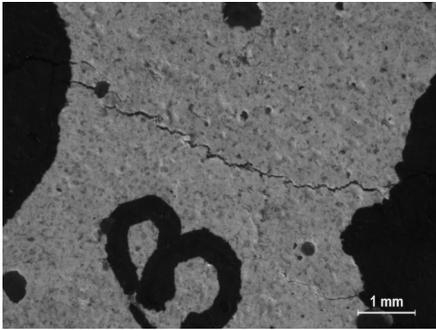
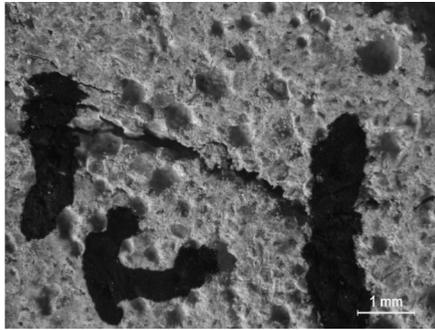
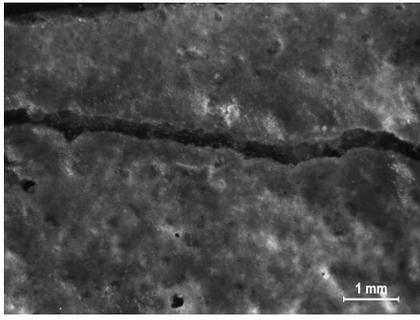
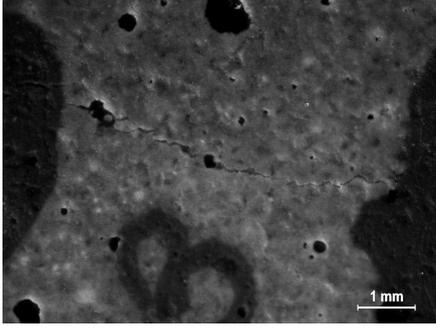
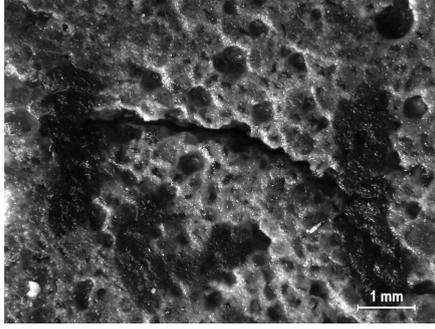
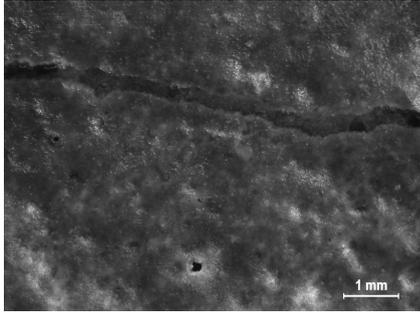
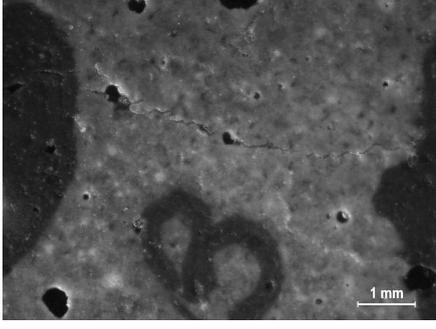
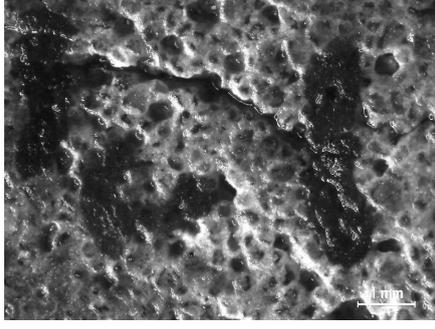
Cuadro 51: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A medio LUC Cubo 2

Cubo	2		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

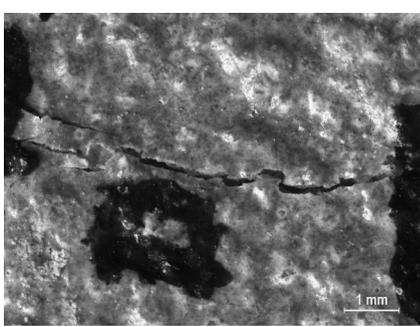
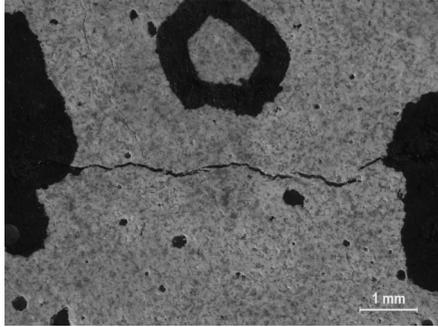
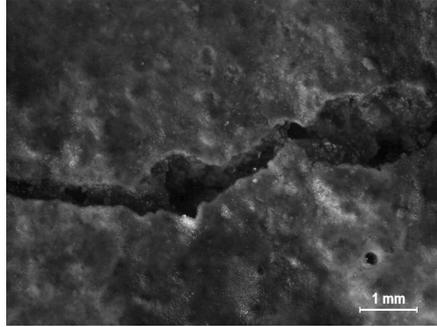
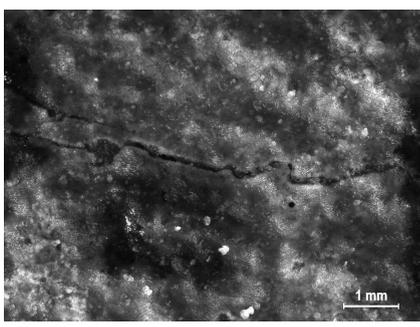
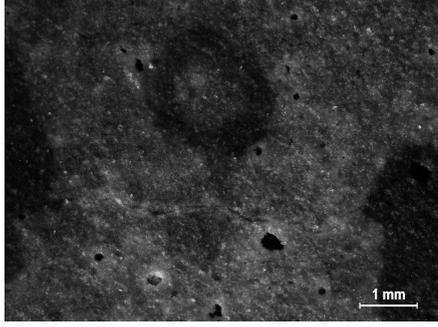
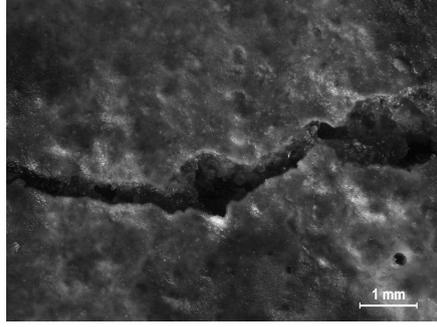
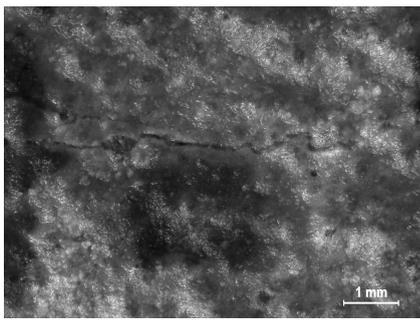
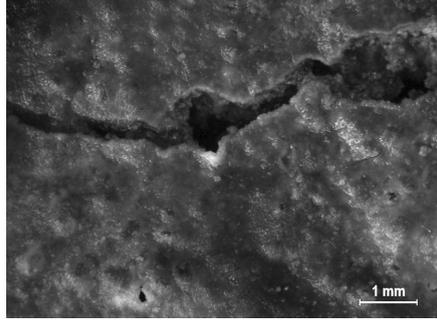
Cuadro 52: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A medio LUC Cubo 3

Cubo	3		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

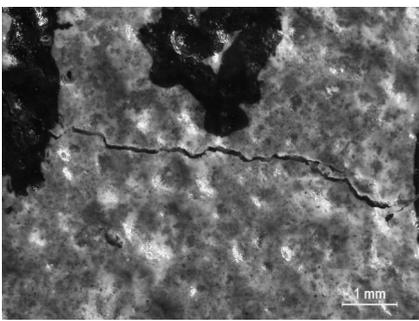
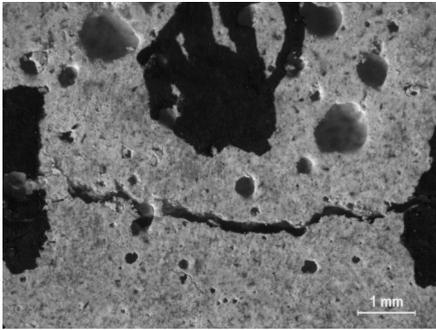
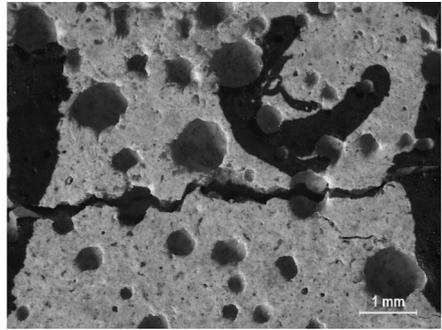
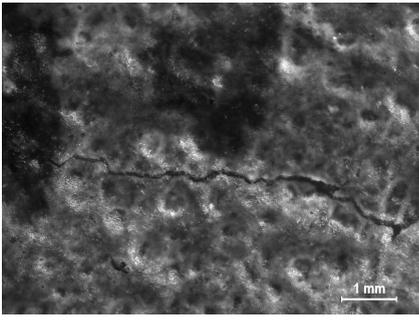
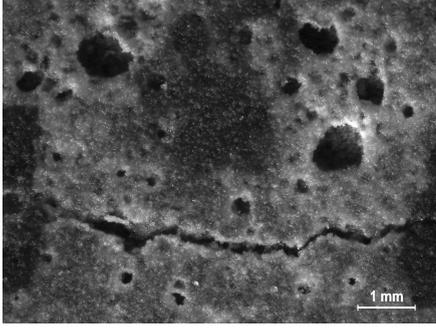
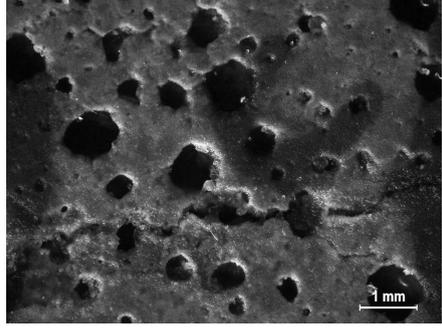
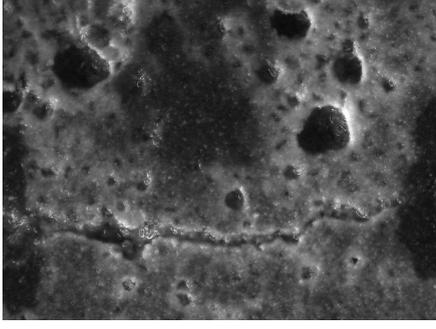
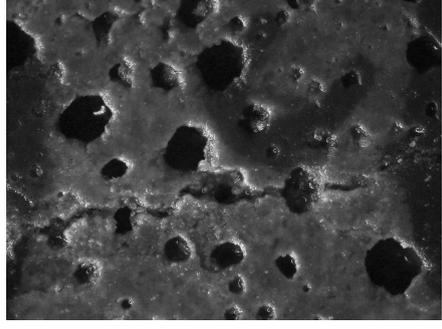
Cuadro 53: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A medio TSUC Cubo 1

Cubo	1		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

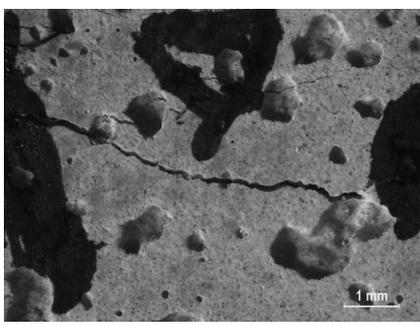
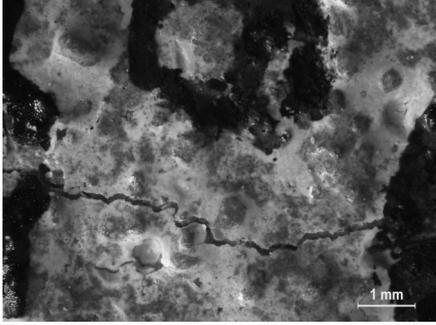
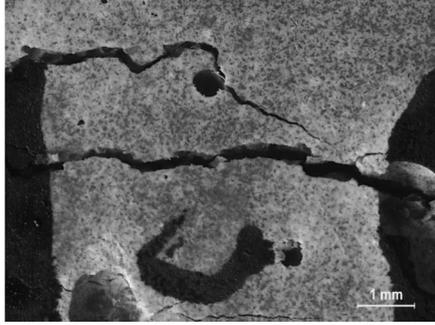
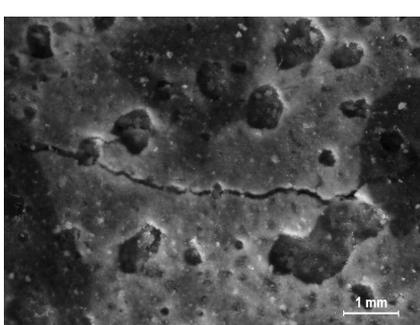
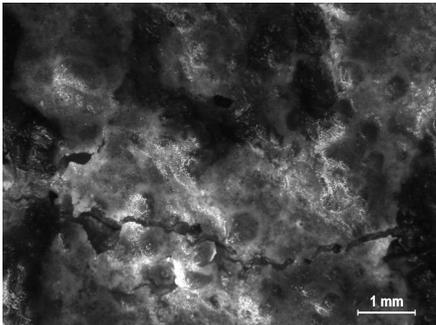
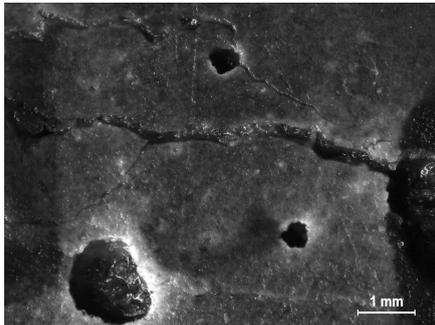
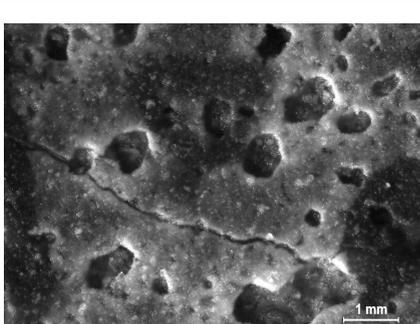
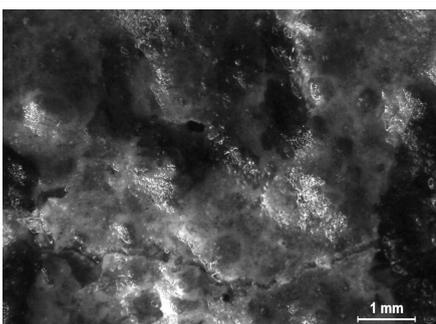
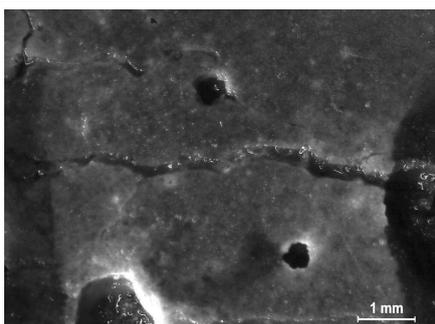
Cuadro 54: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A medio TSUC Cubo 2

Cubo	2		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

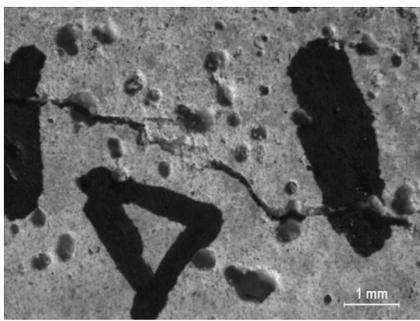
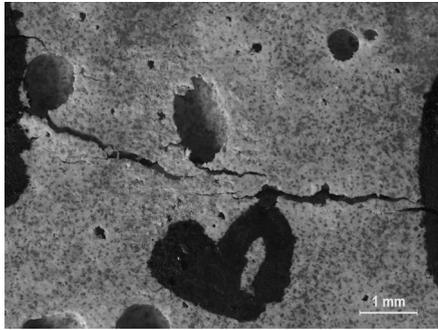
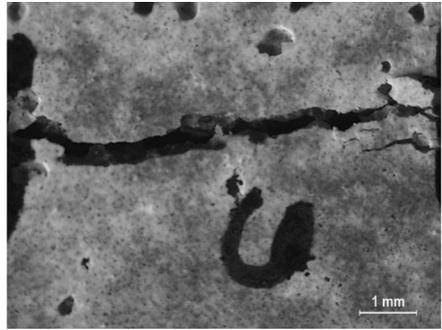
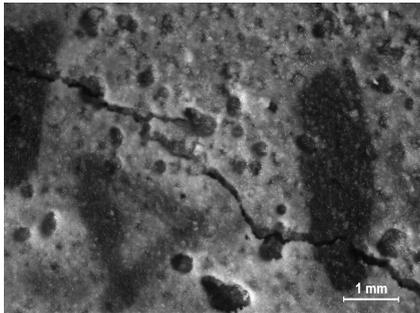
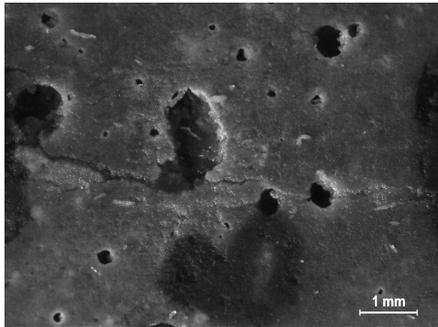
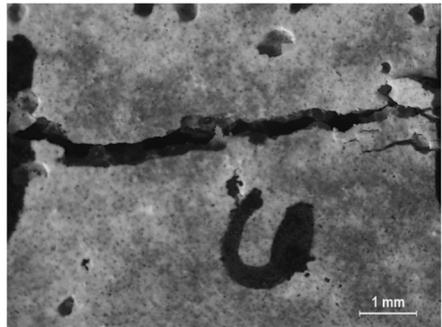
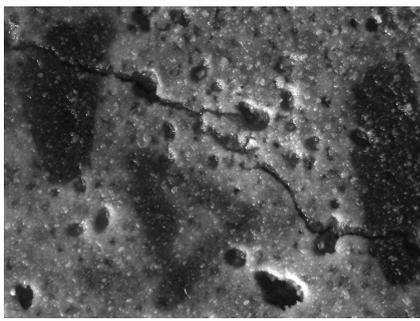
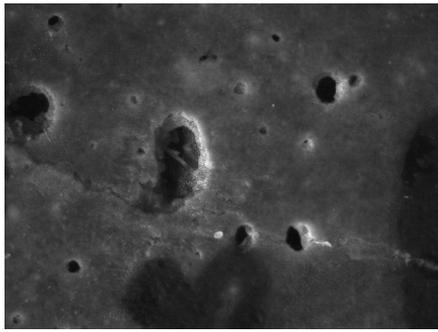
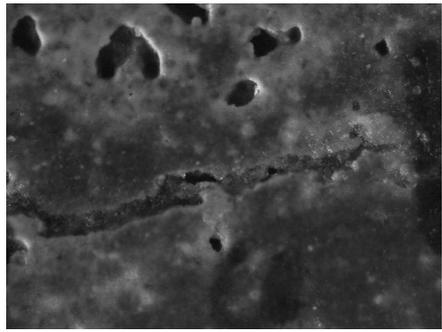
Cuadro 55: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A medio TSUC Cubo 3

Cubo	3		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

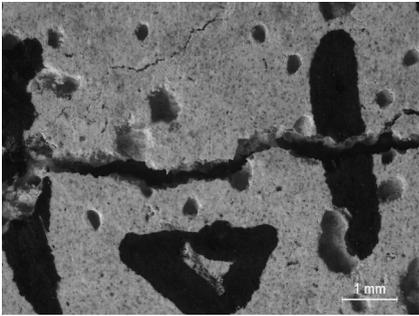
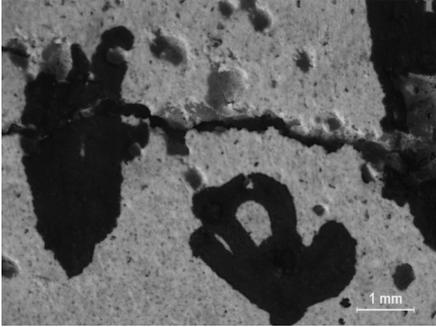
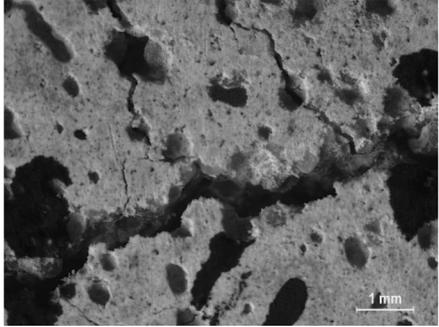
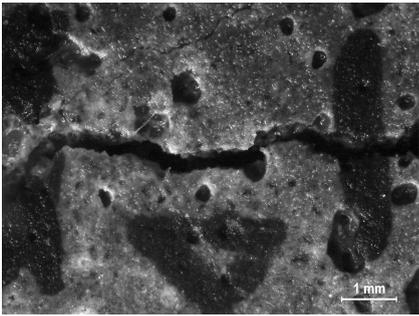
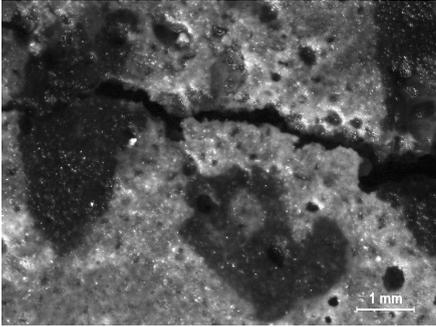
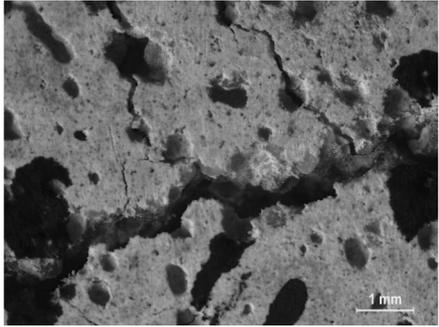
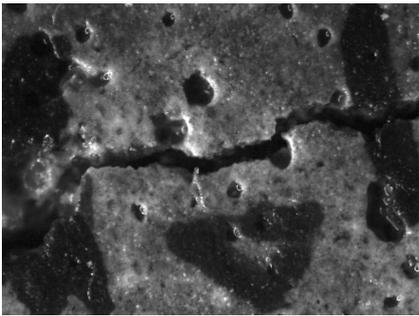
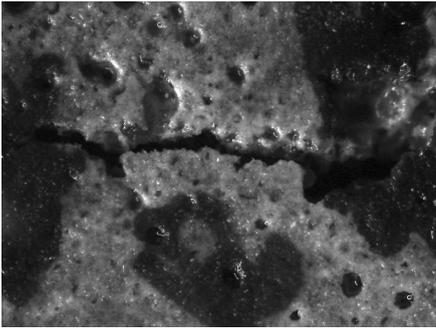
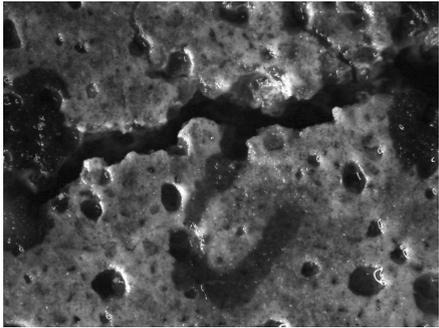
Cuadro 56: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A medio LUC Cubo 1

Cubo	1		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

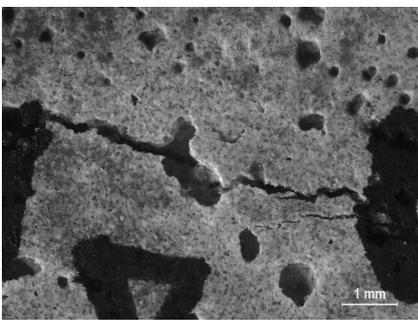
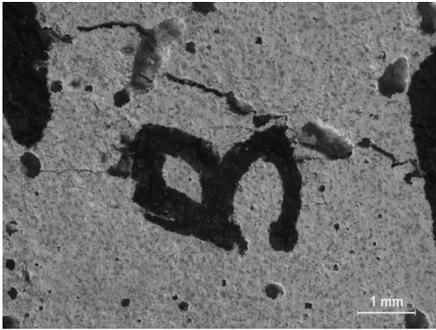
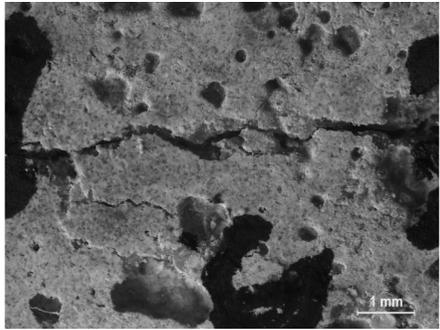
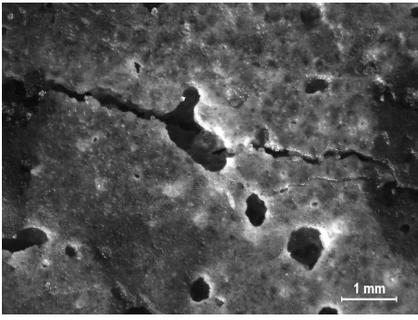
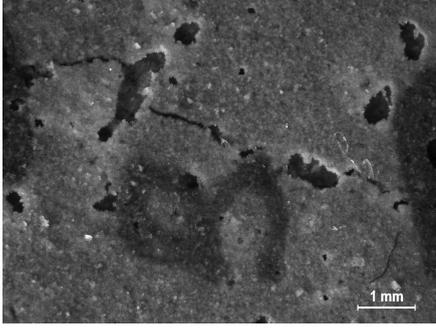
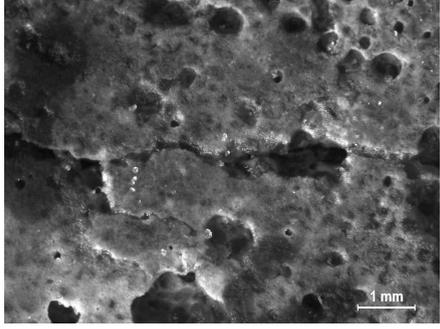
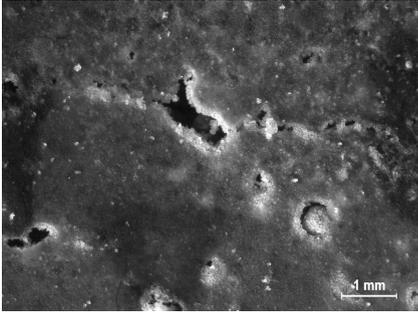
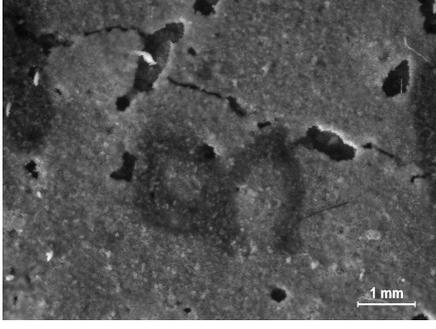
Cuadro 57: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A medio LUC Cubo 2

Cubo	2		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

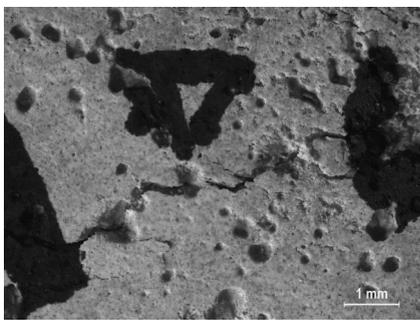
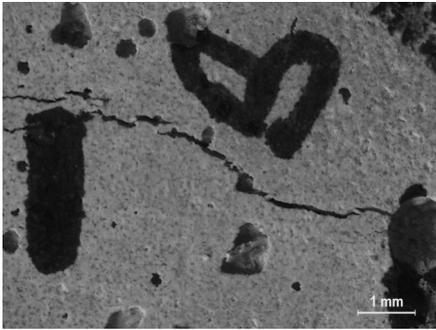
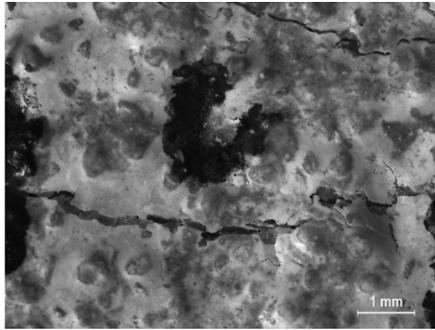
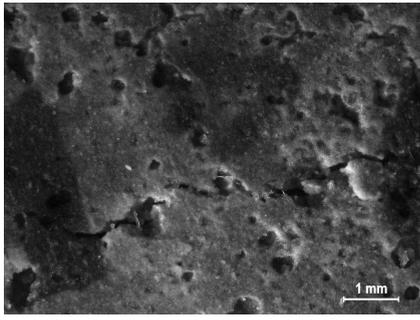
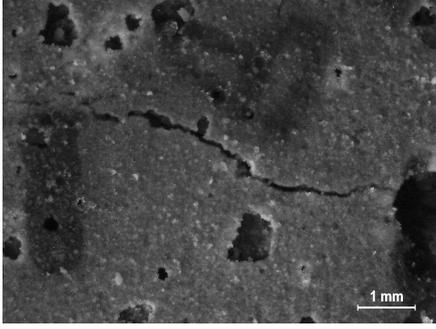
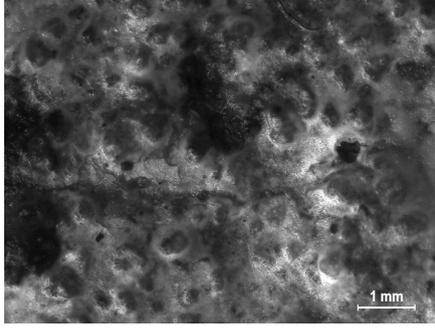
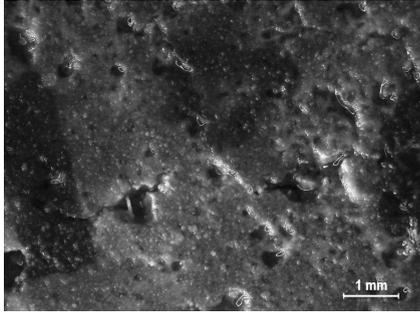
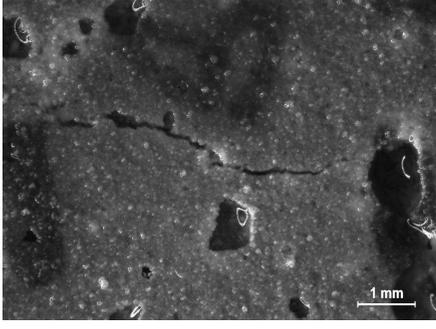
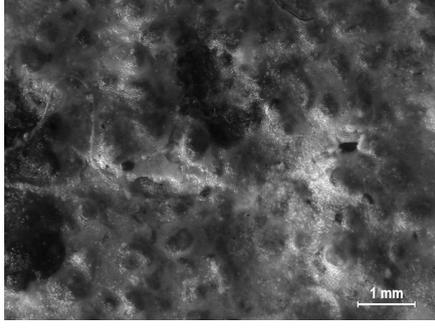
Cuadro 58: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A medio LUC Cubo 3

Cubo	3		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

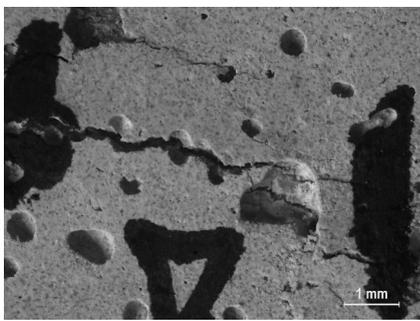
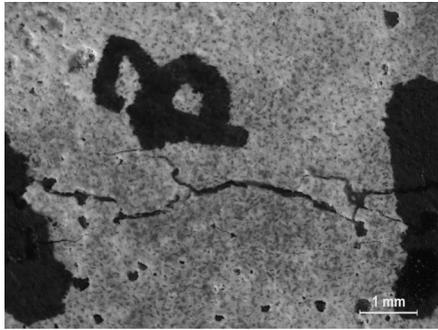
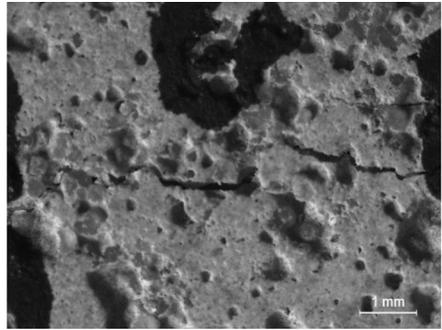
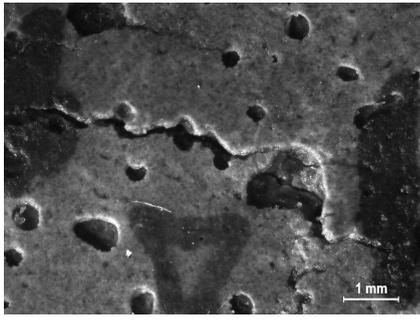
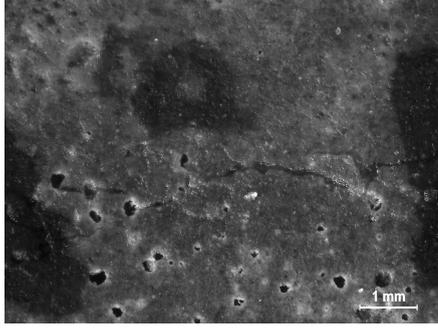
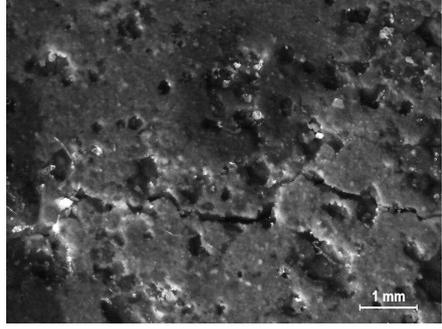
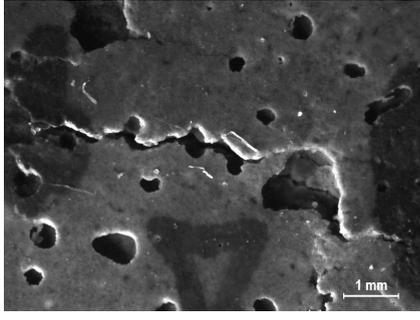
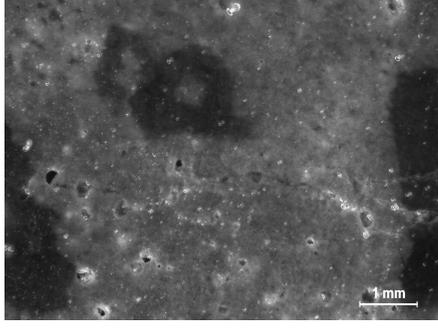
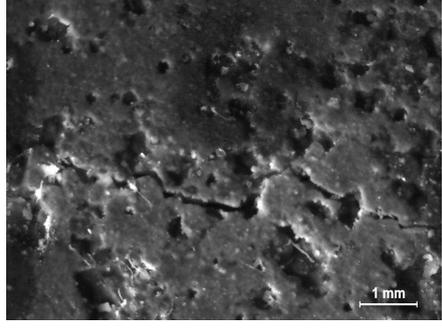
Cuadro 59: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A sin medio Cubo 1

Cubo	1		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			La grieta se desintegró por completo

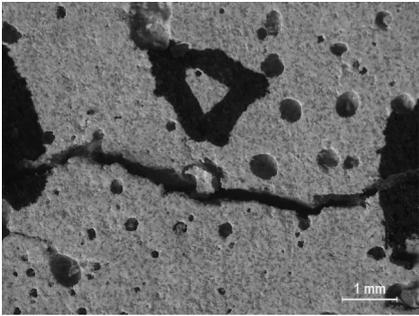
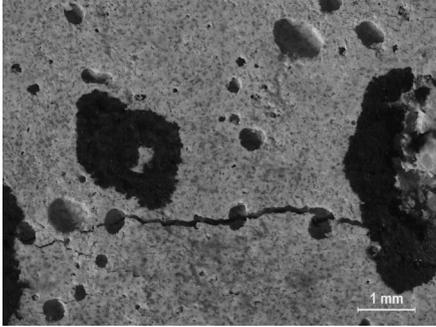
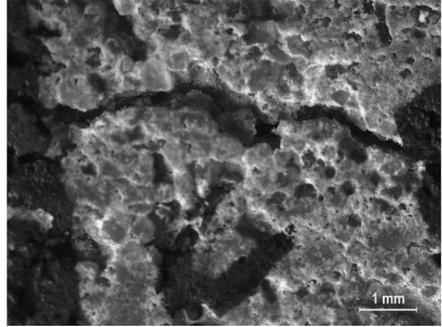
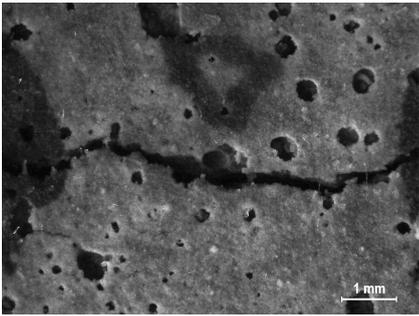
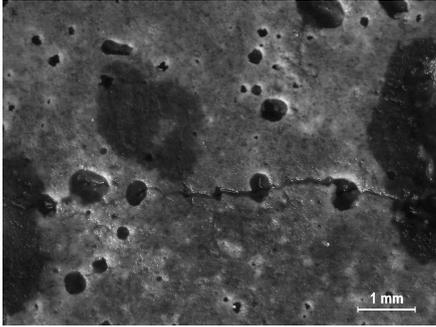
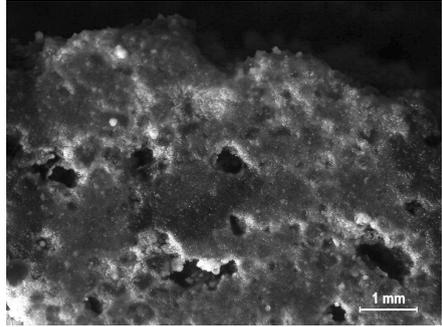
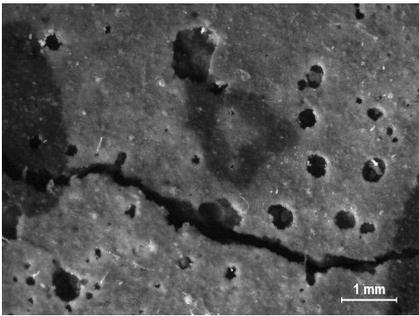
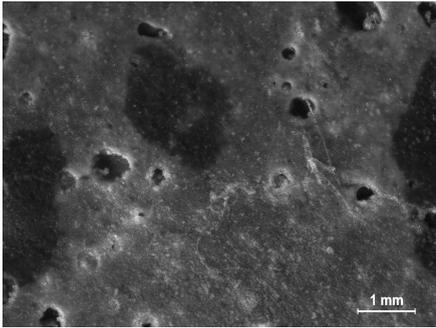
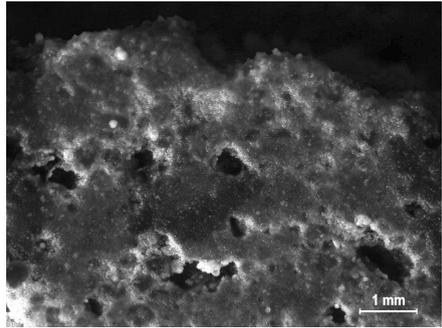
Cuadro 60: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A sin medio Cubo 2

Cubo	2		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

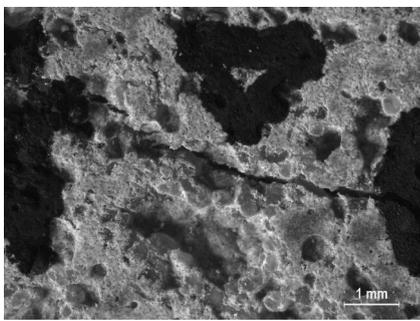
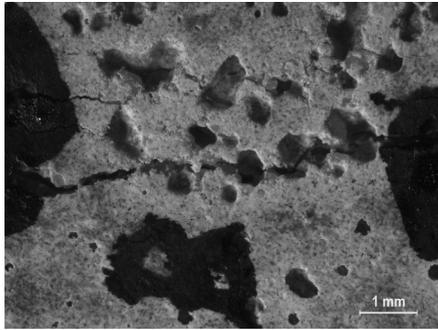
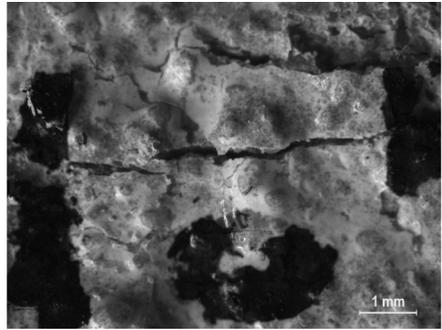
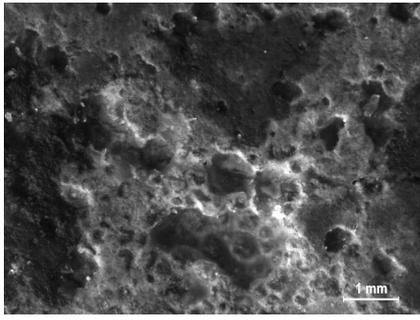
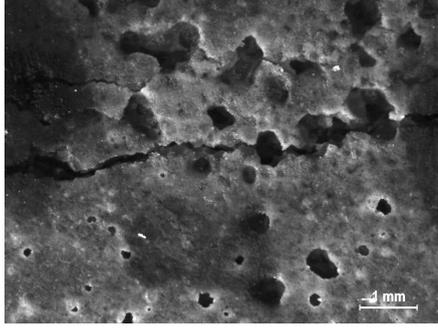
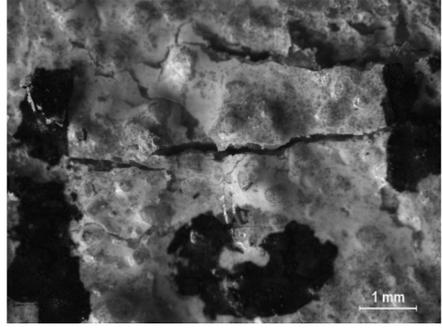
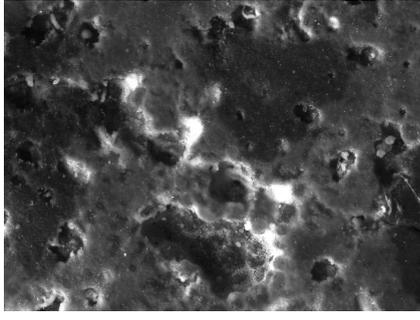
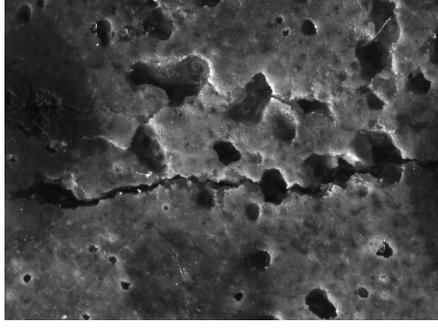
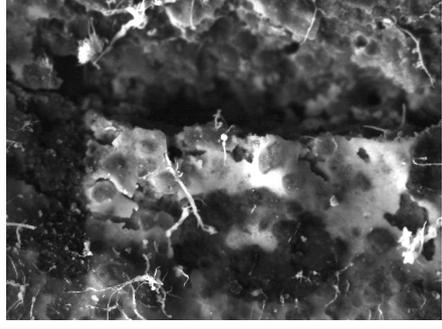
Cuadro 61: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.4.1.A sin medio Cubo 3

Cubo	3		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

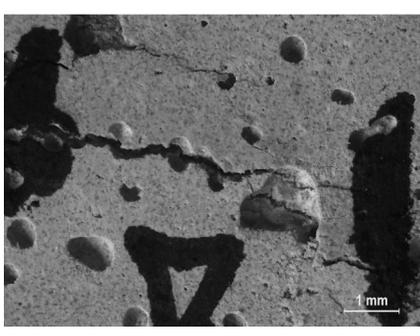
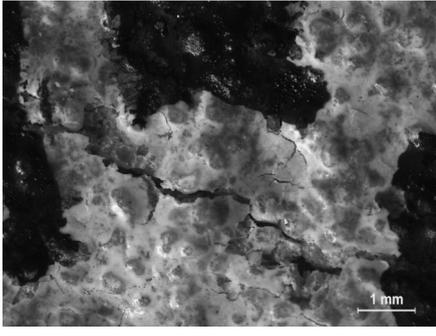
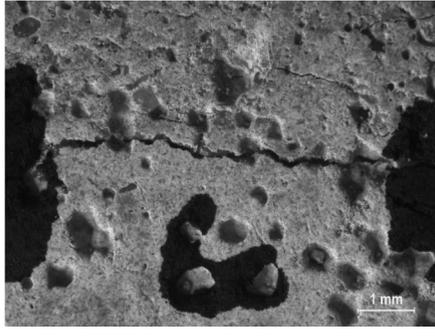
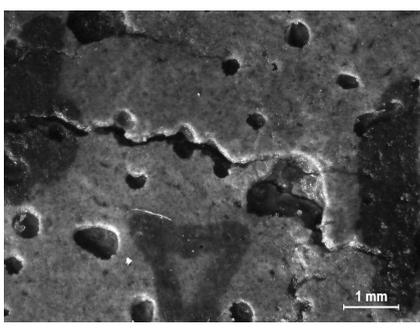
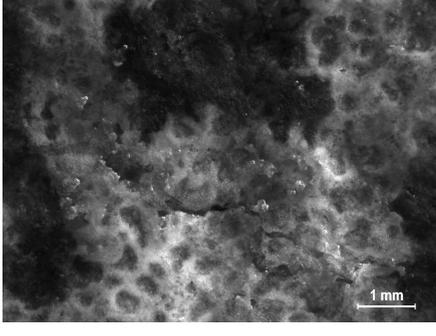
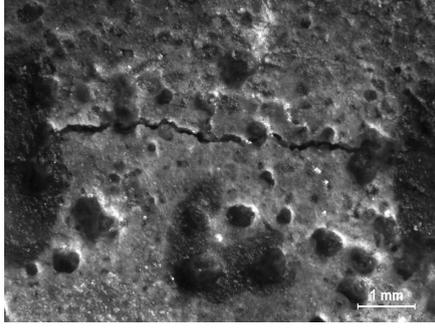
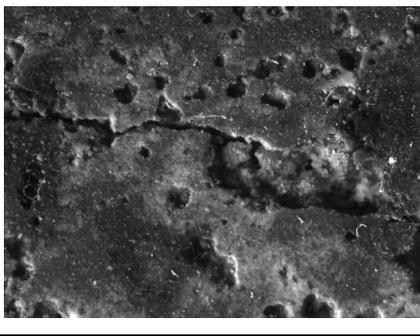
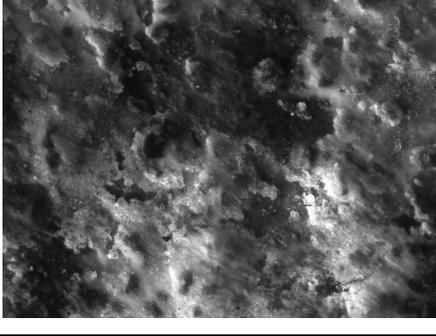
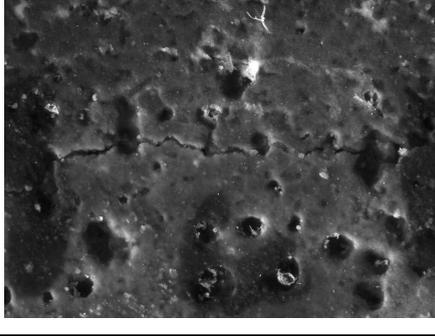
Cuadro 62: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A sin medio Cubo 1

Cubo	1		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

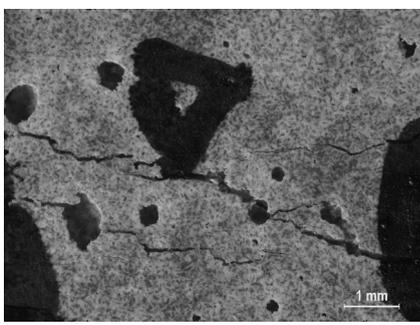
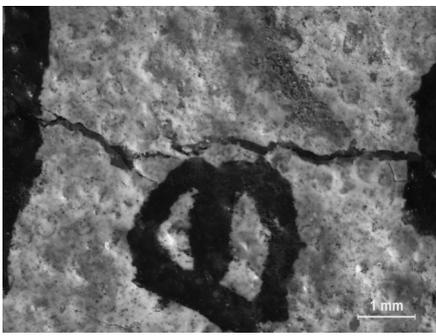
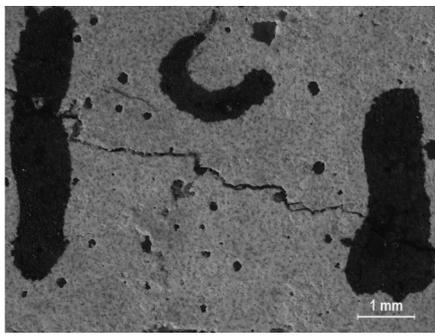
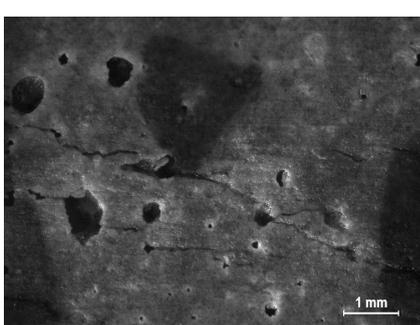
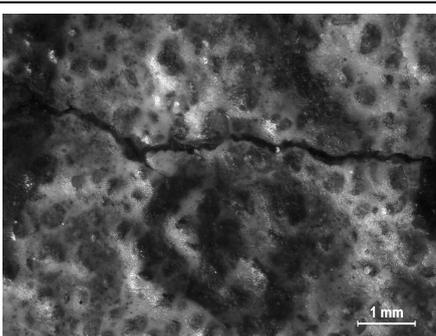
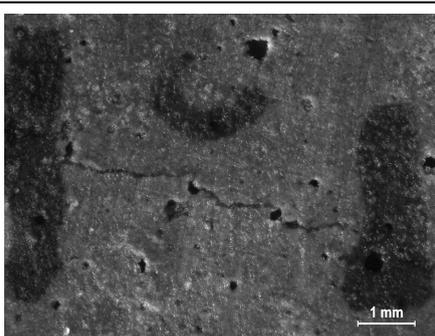
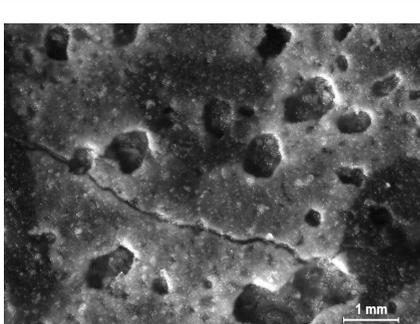
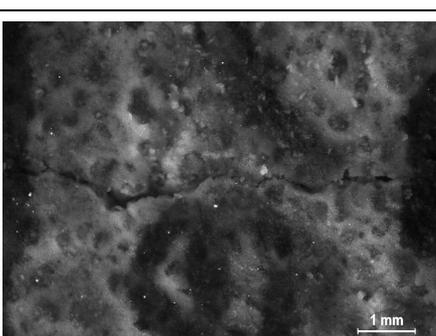
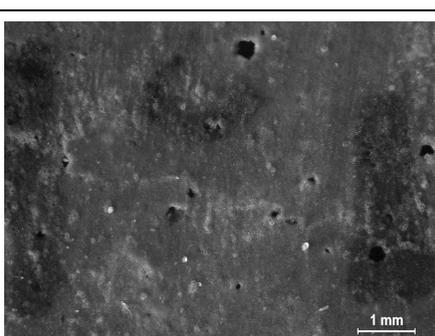
Cuadro 63: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A sin medio Cubo 2

Cubo	2		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

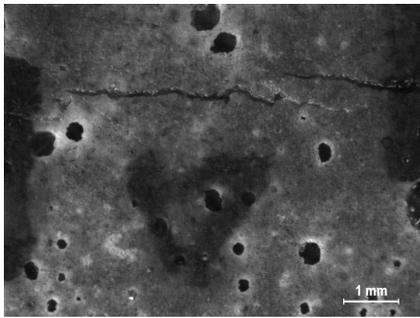
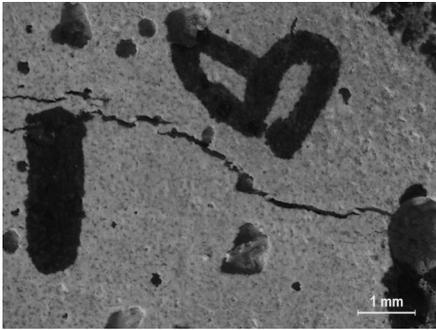
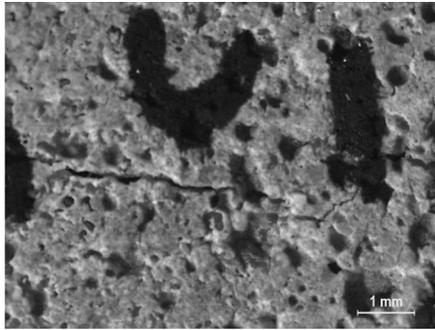
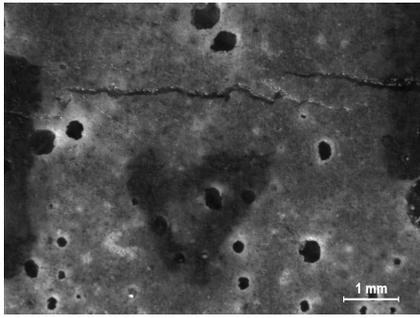
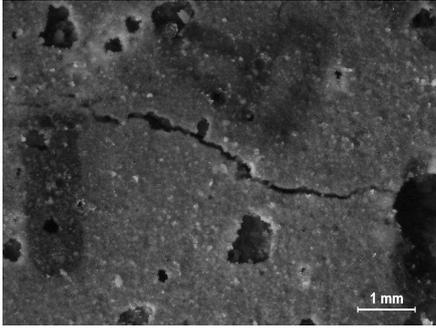
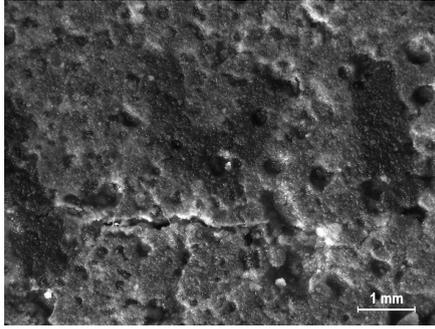
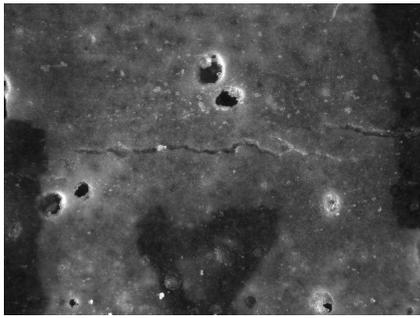
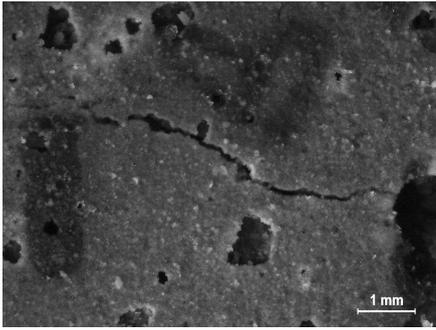
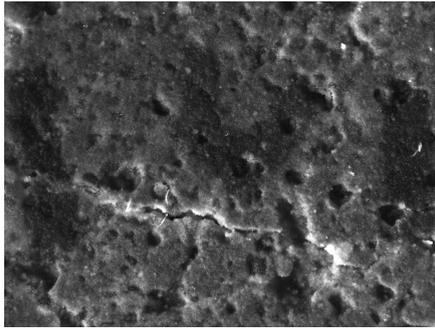
Cuadro 64: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.2.A sin medio Cubo 3

Cubo	3		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

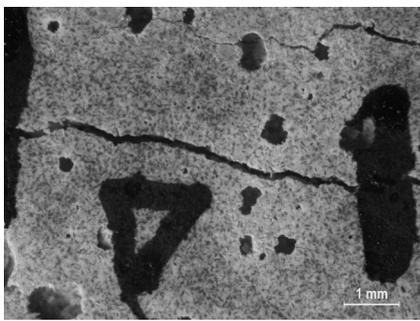
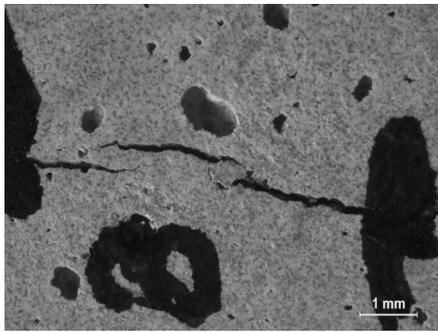
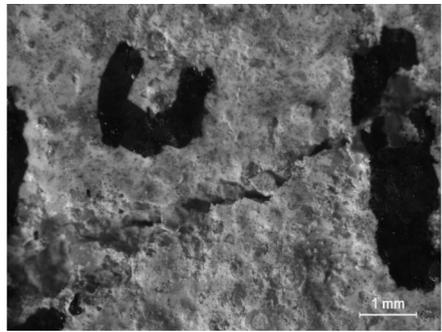
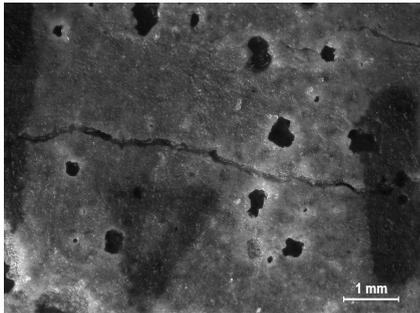
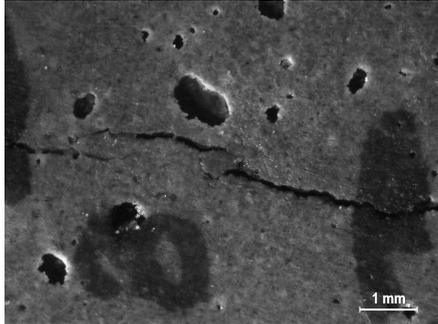
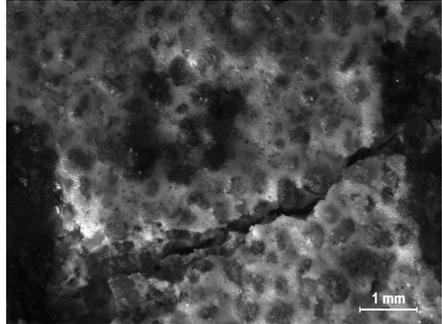
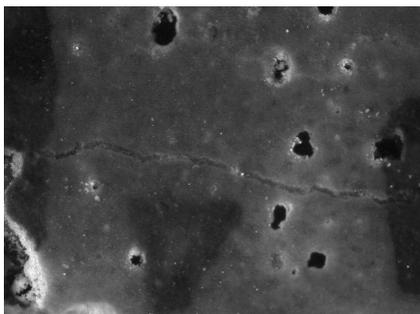
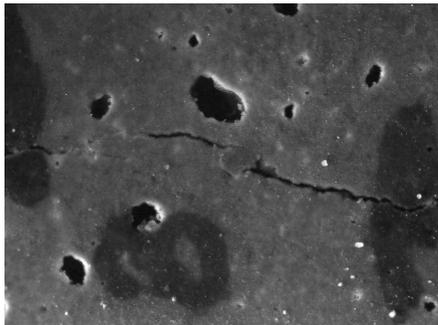
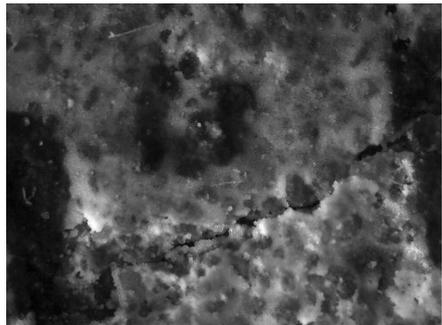
Cuadro 65: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A sin medio Cubo 1

Cubo	1		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

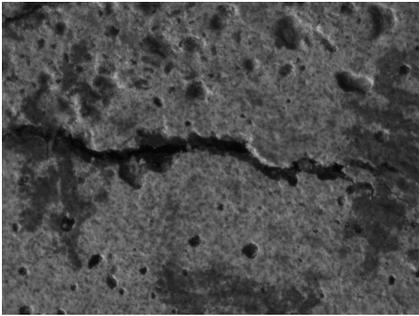
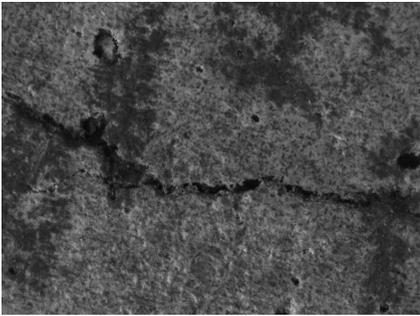
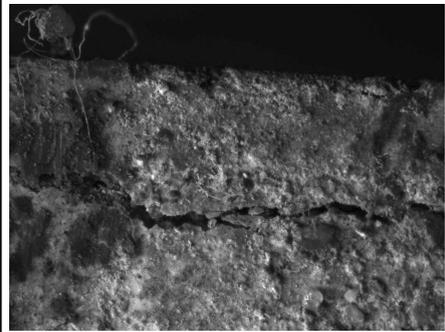
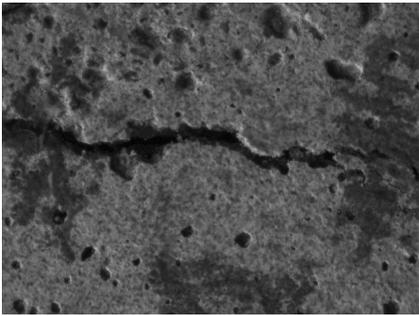
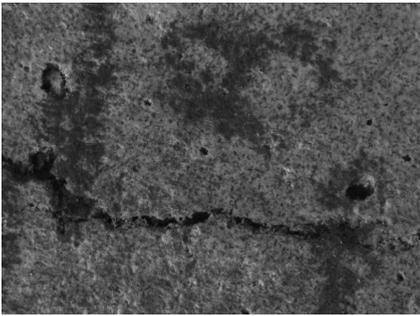
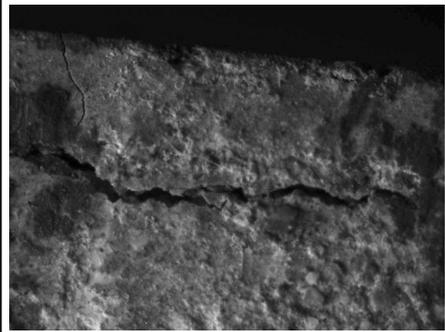
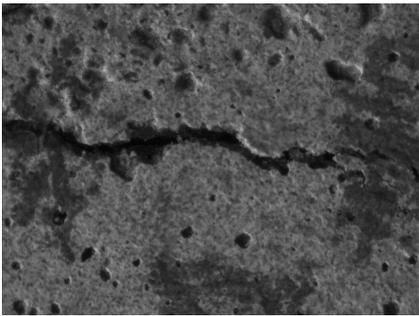
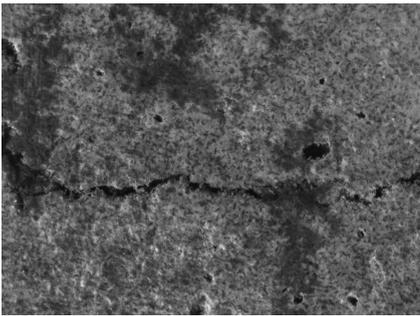
Cuadro 66: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A sin medio Cubo 2

Cubo	2		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

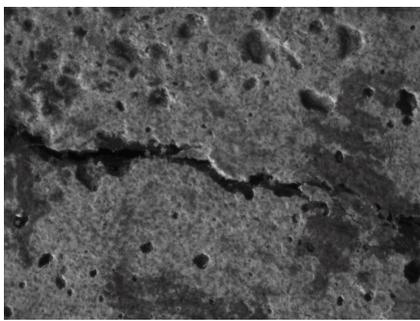
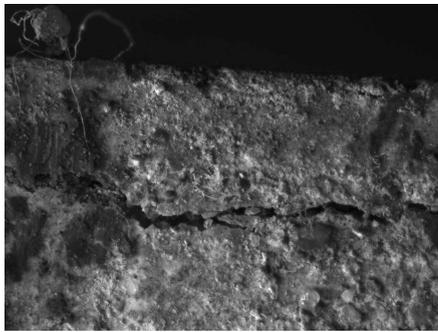
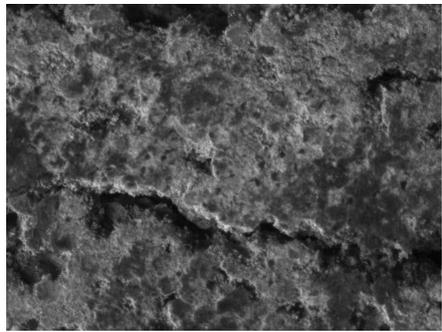
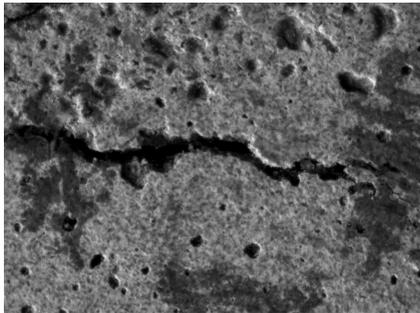
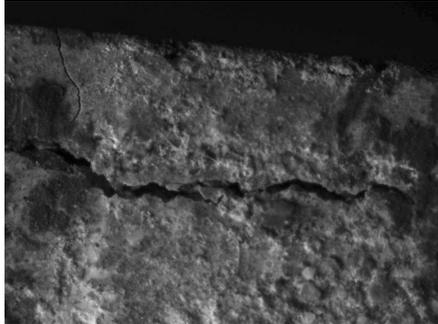
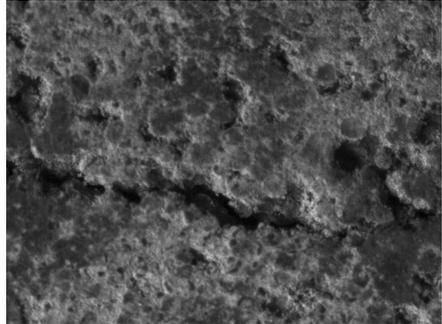
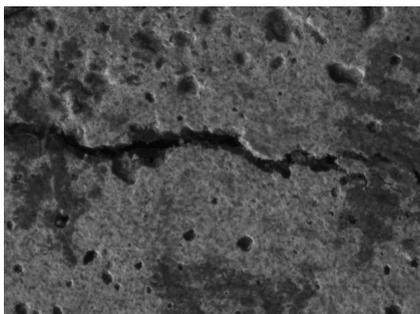
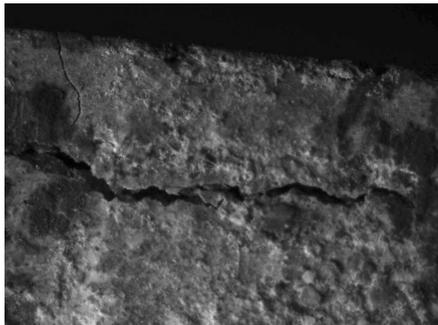
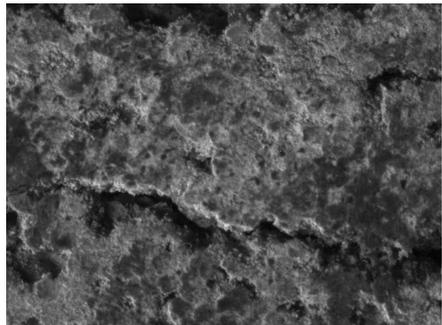
Cuadro 67: Monitoreo de reparación de grietas cepa P.5.3.A sin medio Cubo 3

Cubo	3		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

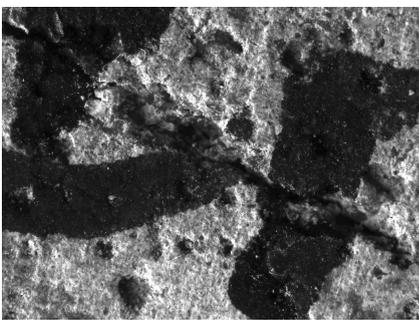
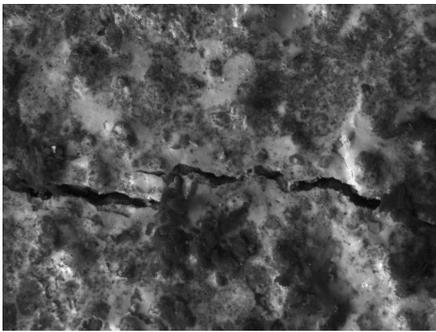
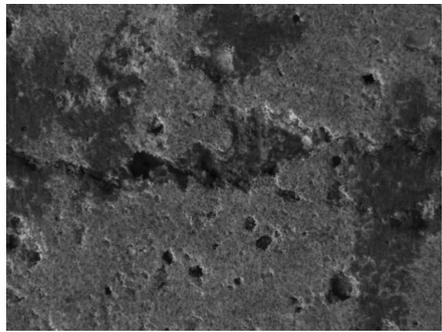
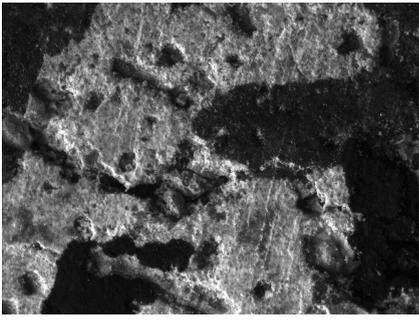
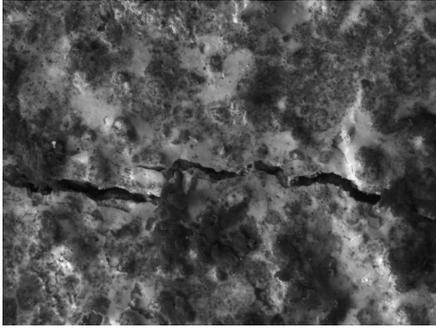
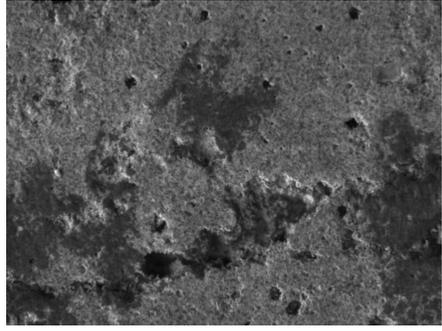
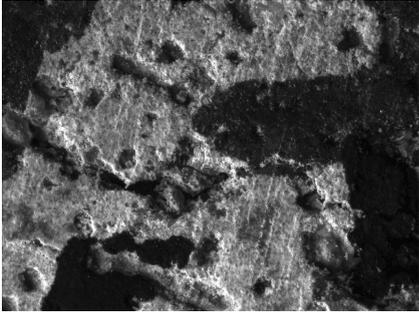
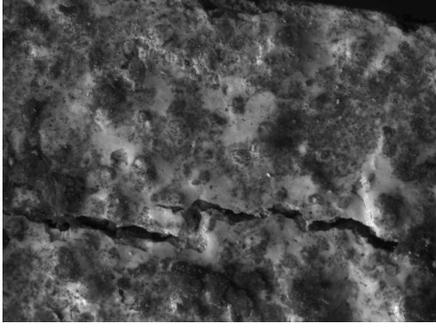
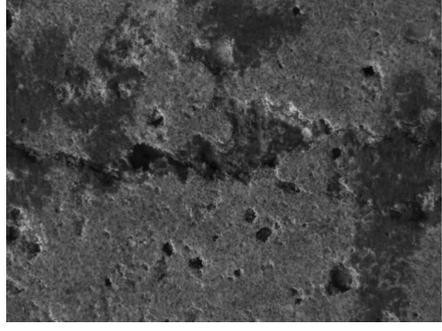
Cuadro 68: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A sin medio Cubo 1

Cubo	1		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			La grieta se desintegró por completo

Cuadro 69: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A sin medio Cubo 2

Cubo	1		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

Cuadro 70: Monitoreo de reparación de grietas cepa N/A sin medio Cubo 3

Cubo	I		
Grieta	A	B	C
Día 0			
Día 18			
Día 30			

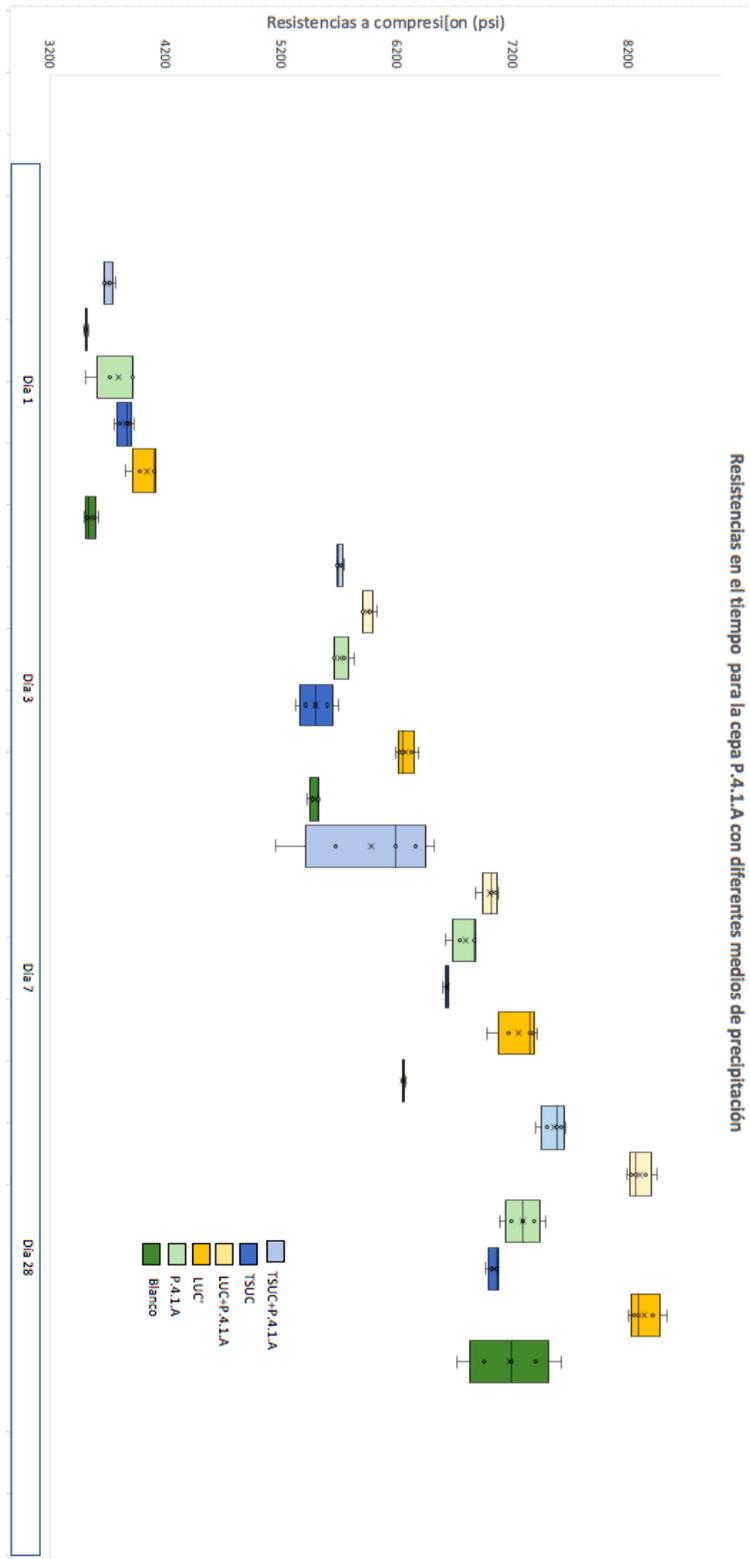


Figura 28: Resistencias a compresión a distintas edades para cepa P.4.1.A con medios TSUC, LUC y control

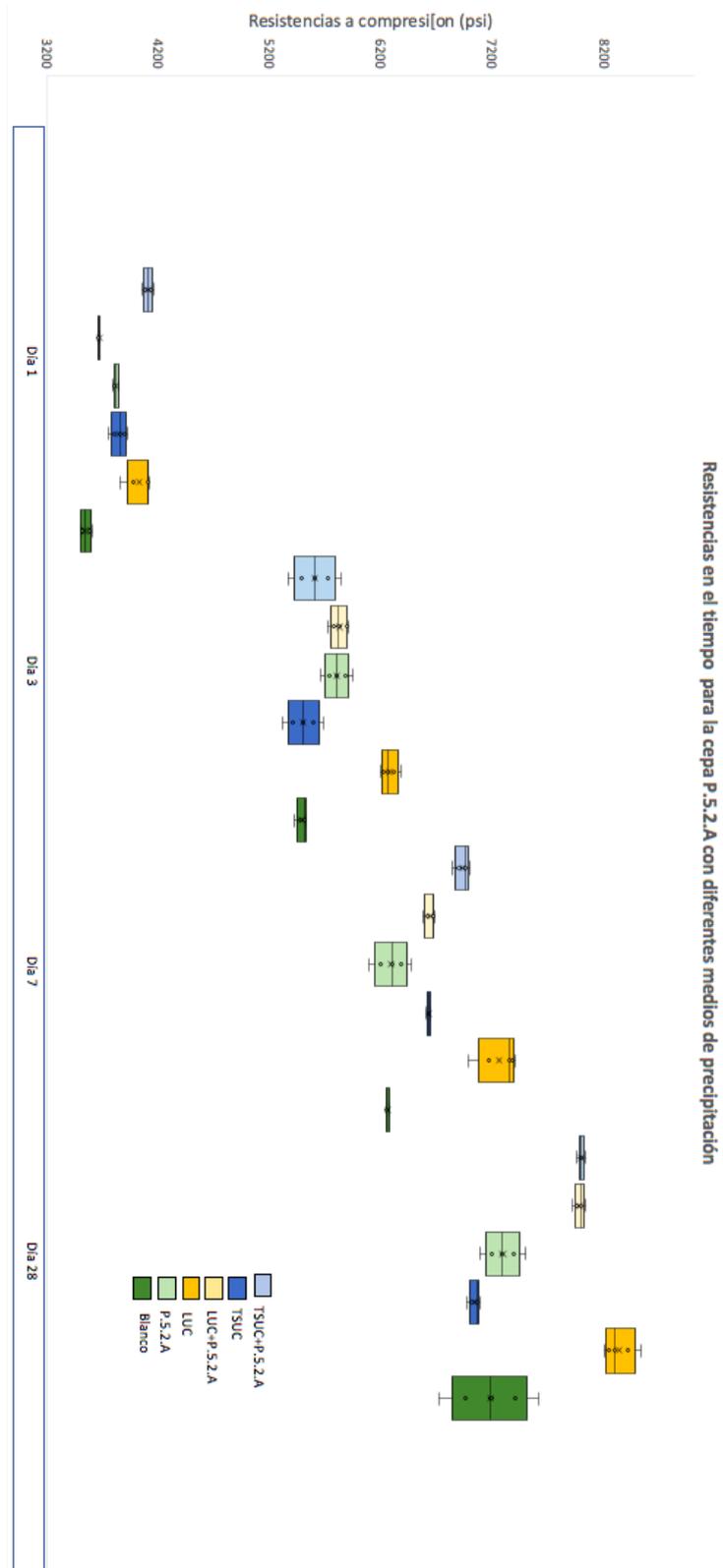


Figura 29: Resistencias a compresión a distintas edades para cepa P.5.2.A con medios TSUC, LUC y control

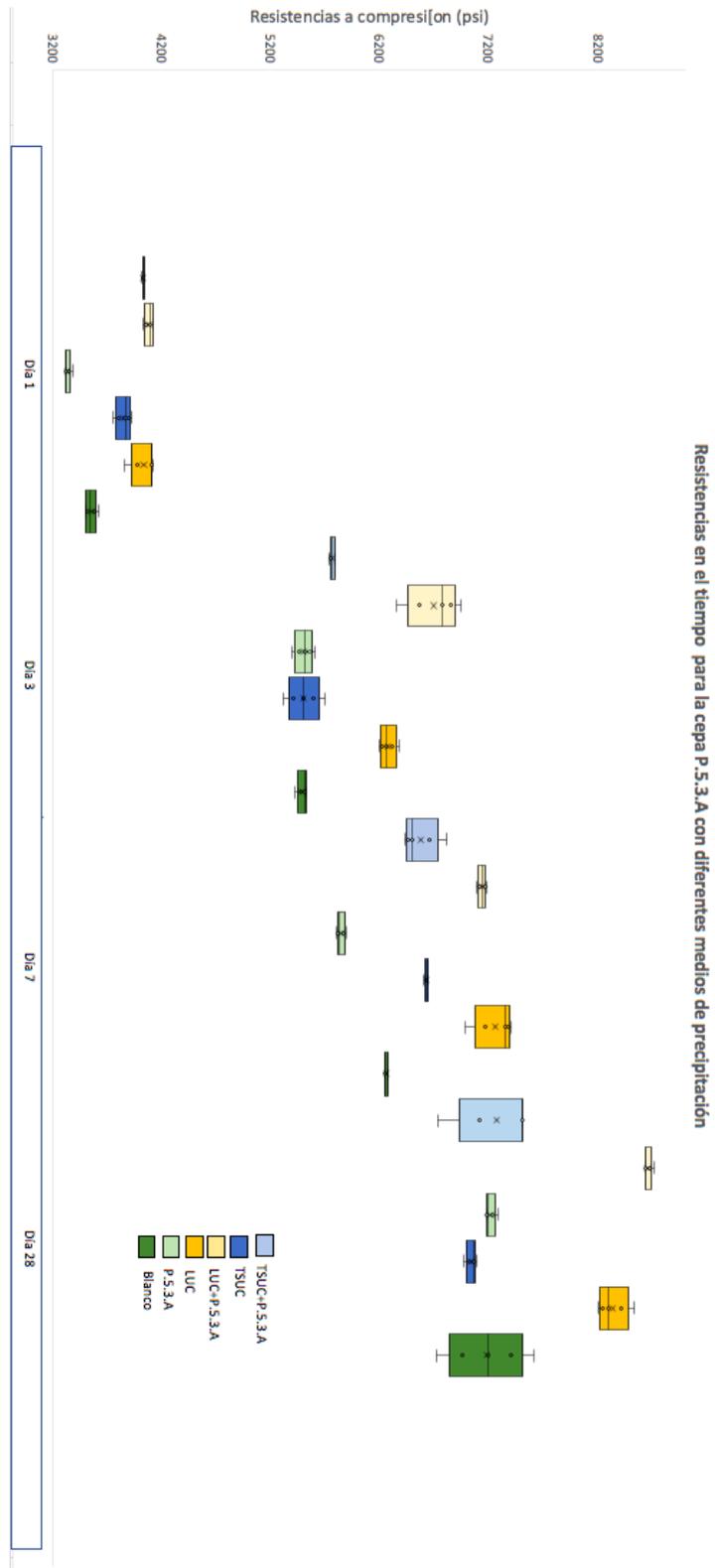


Figura 30: Resistencias a compresión a distintas edades para cepa P.5.3.A con medios TSUC, LUC y control

Figura 31: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento con medio TSUC cepa P.4.1.A

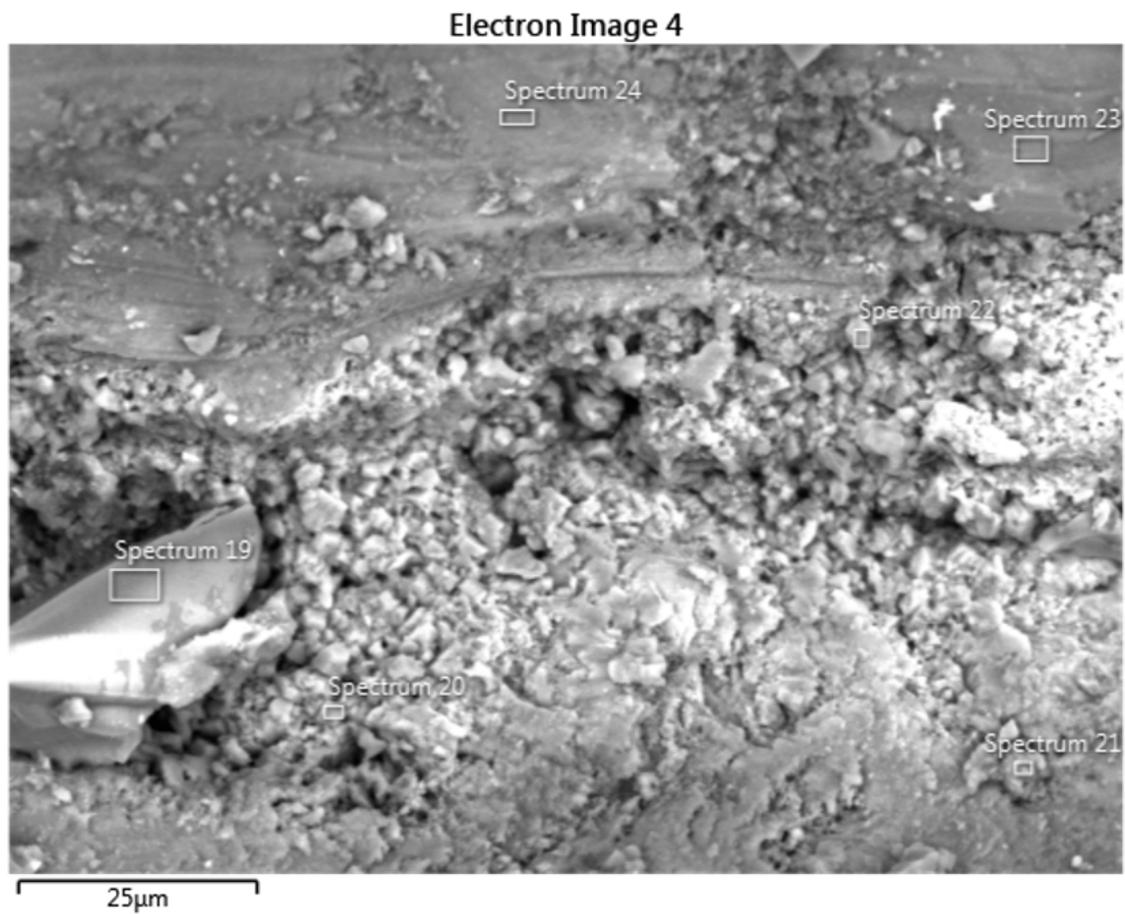


Figura 32: Espectro EDS 1 de la Figura 31

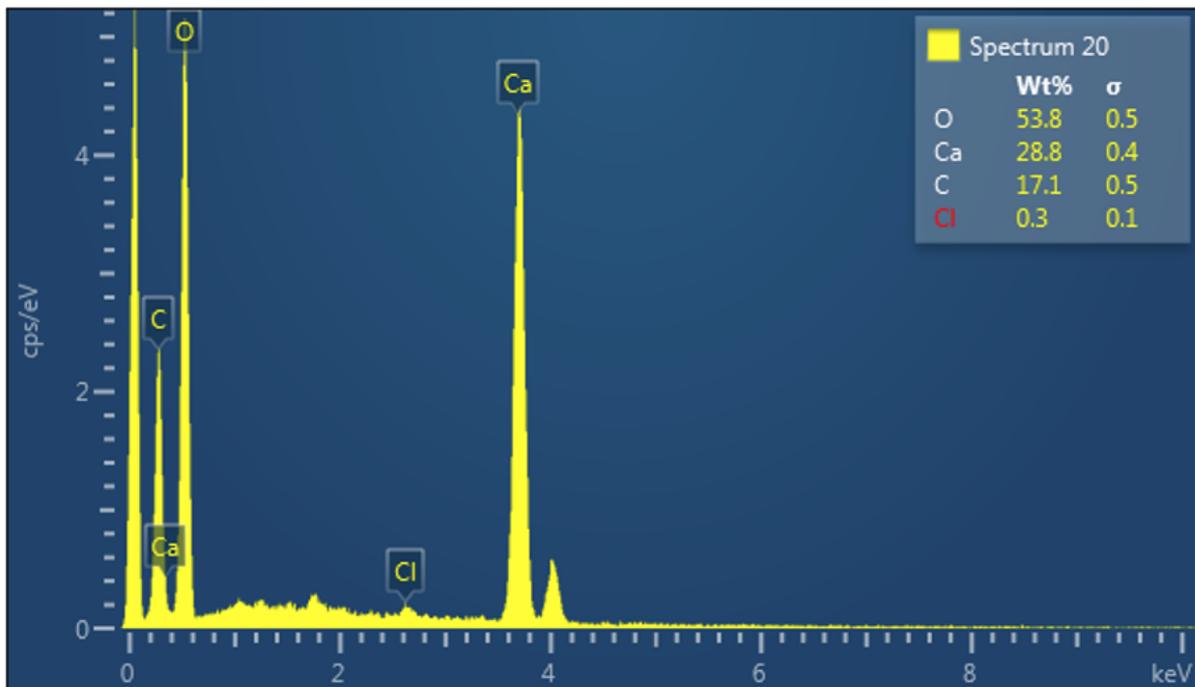


Figura 33: Espectro EDS 2 de la Figura 31

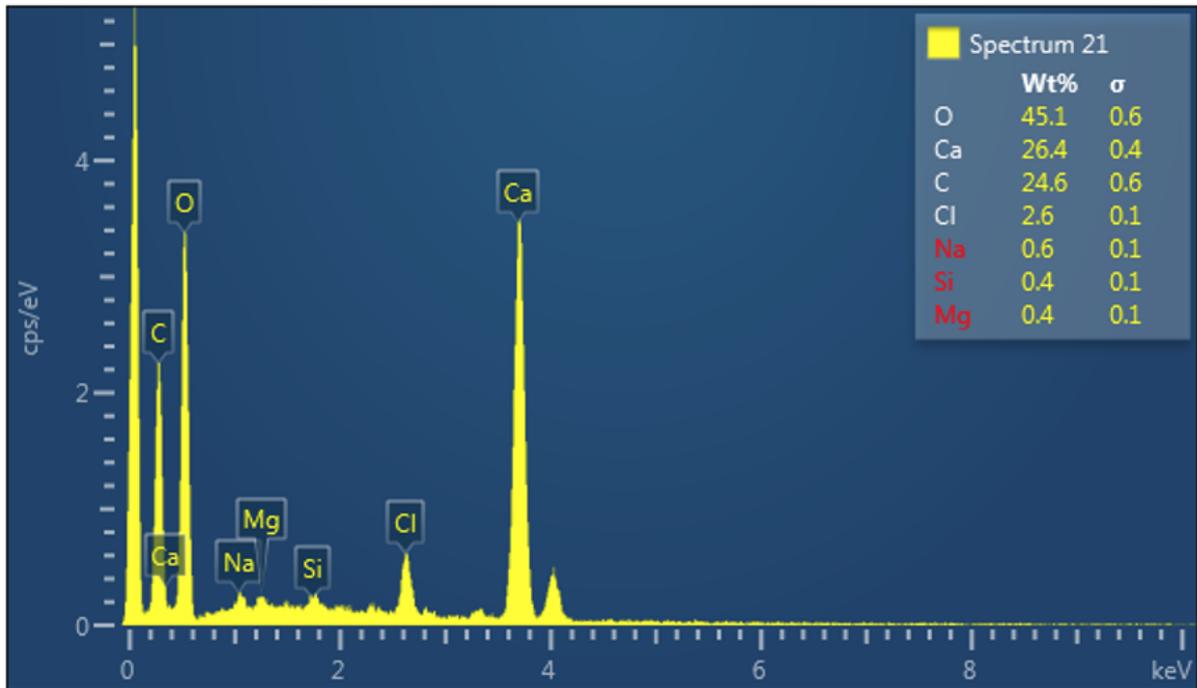


Figura 34: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento con medio TSUC cepa P.5.2.A

Electron Image 6

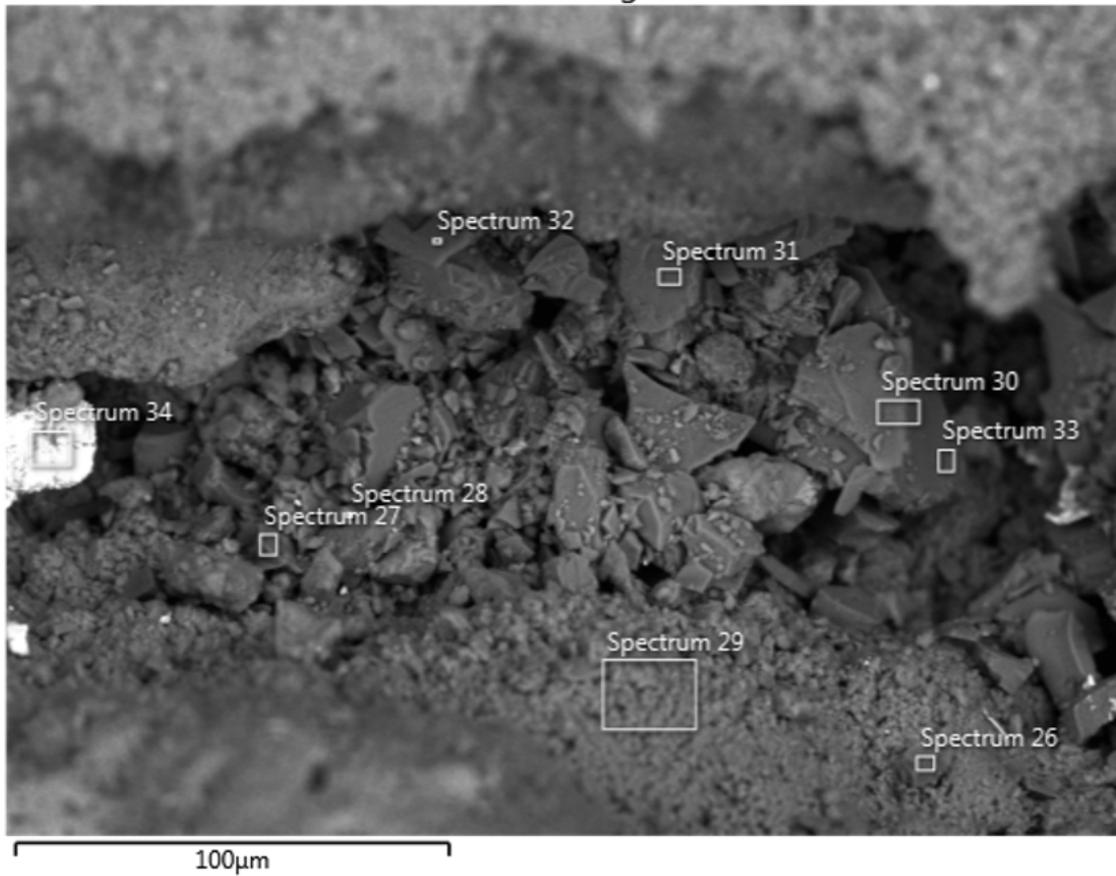


Figura 35: Espectro EDS 1 de la Figura 34

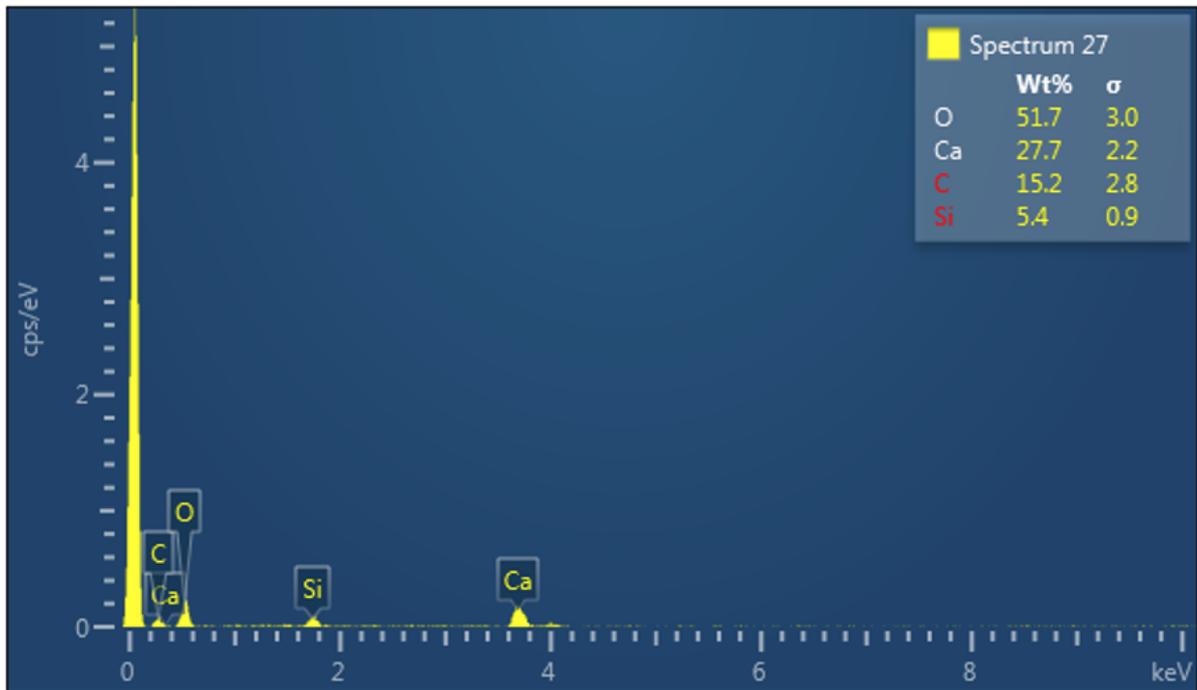


Figura 36: Espectro EDS 2 de la Figura 34

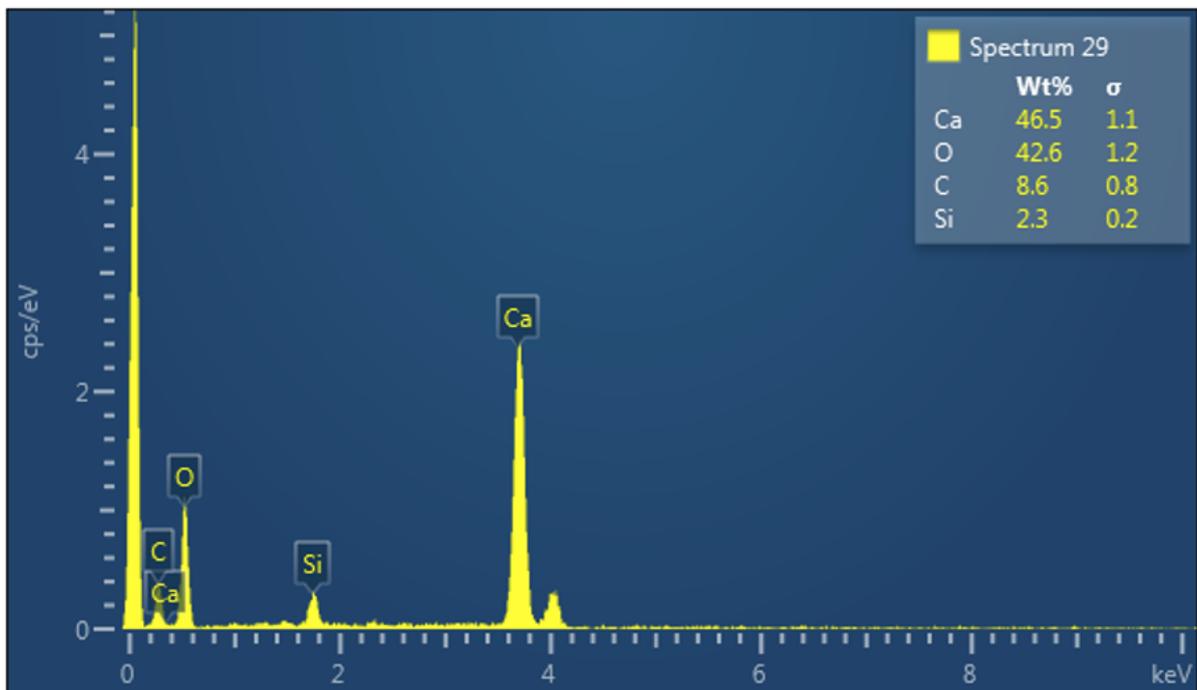


Figura 37: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio TSUC cepa P.5.3.A

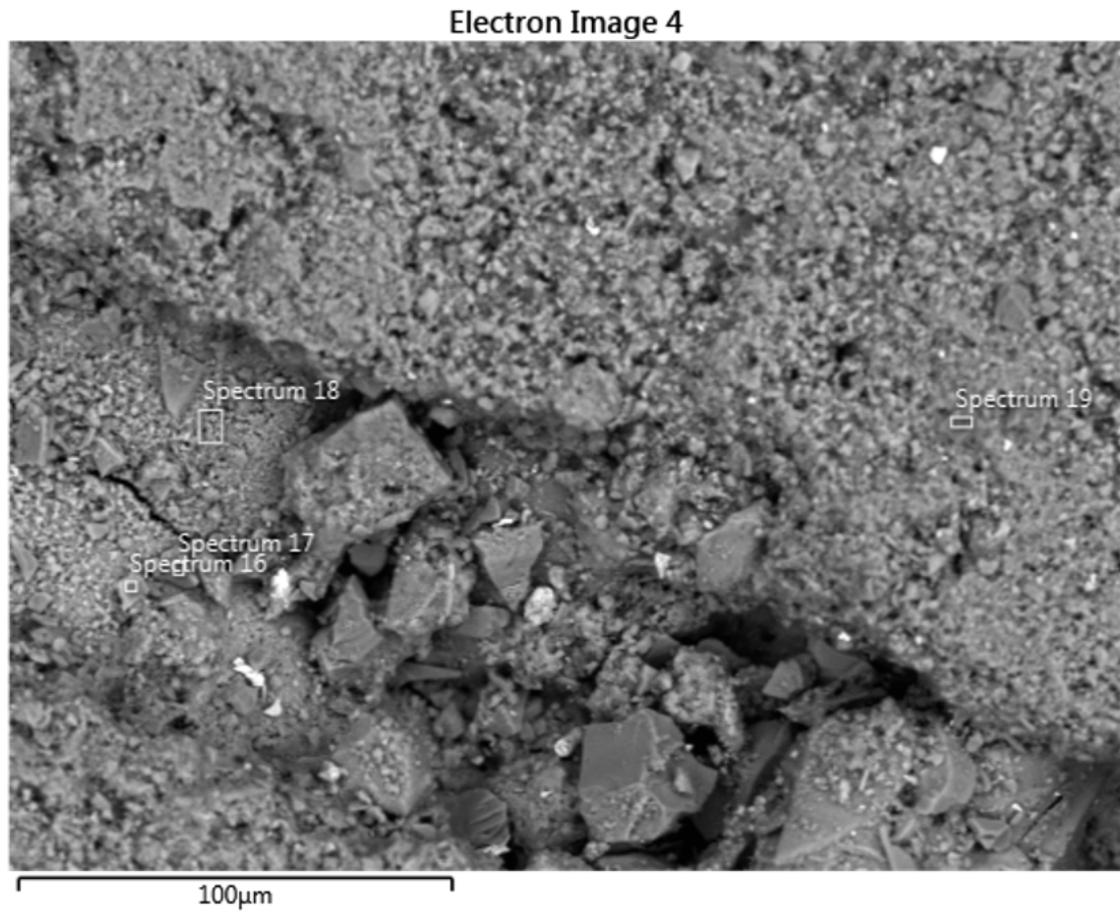


Figura 38: Espectro EDS 1 de la Figura 37

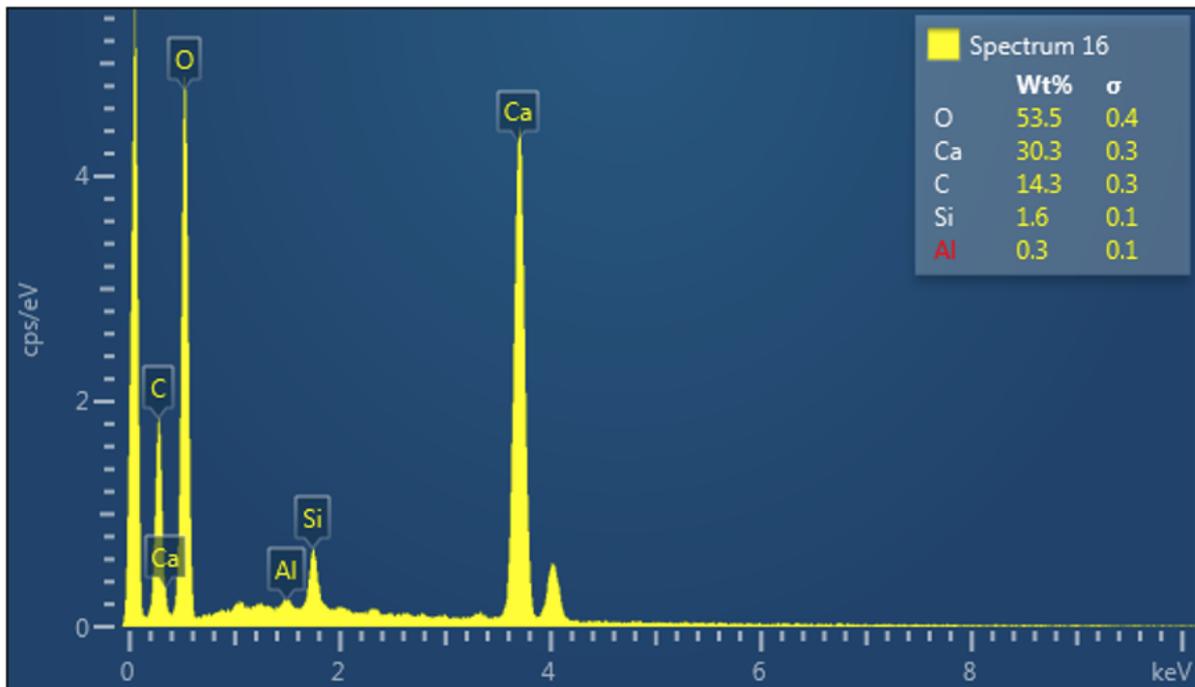


Figura 39: Espectro EDS 2 de la Figura 37

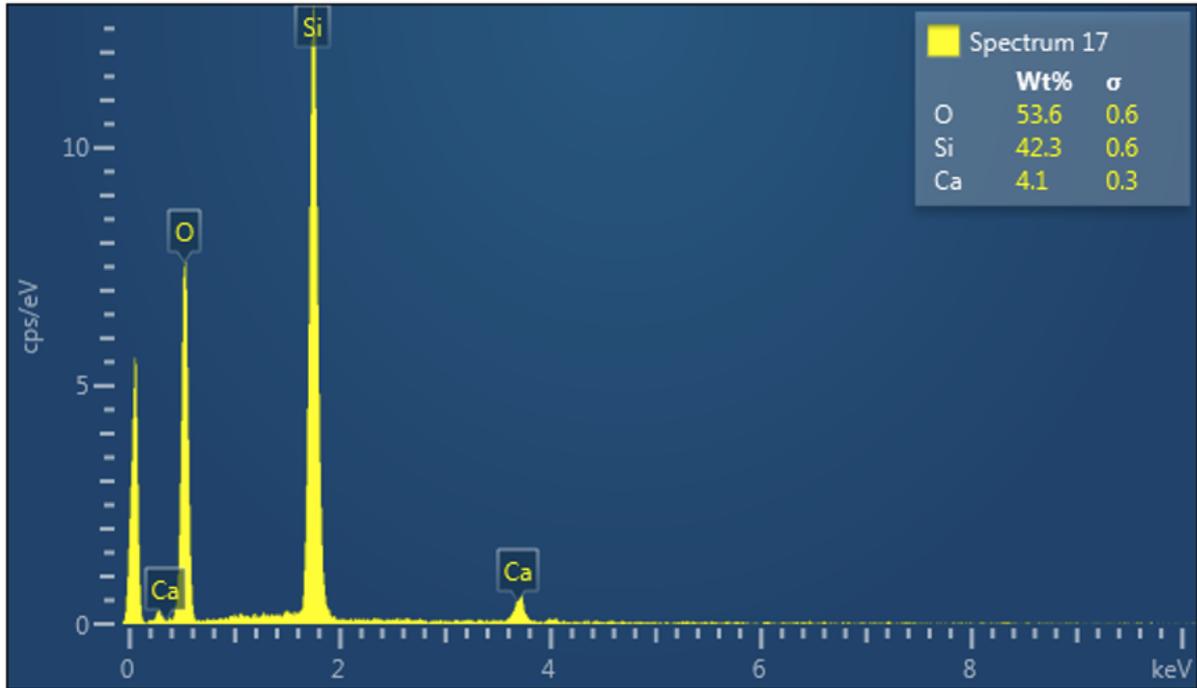


Figura 40: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento medio LUC cepa P.4.1.A

Electron Image 1

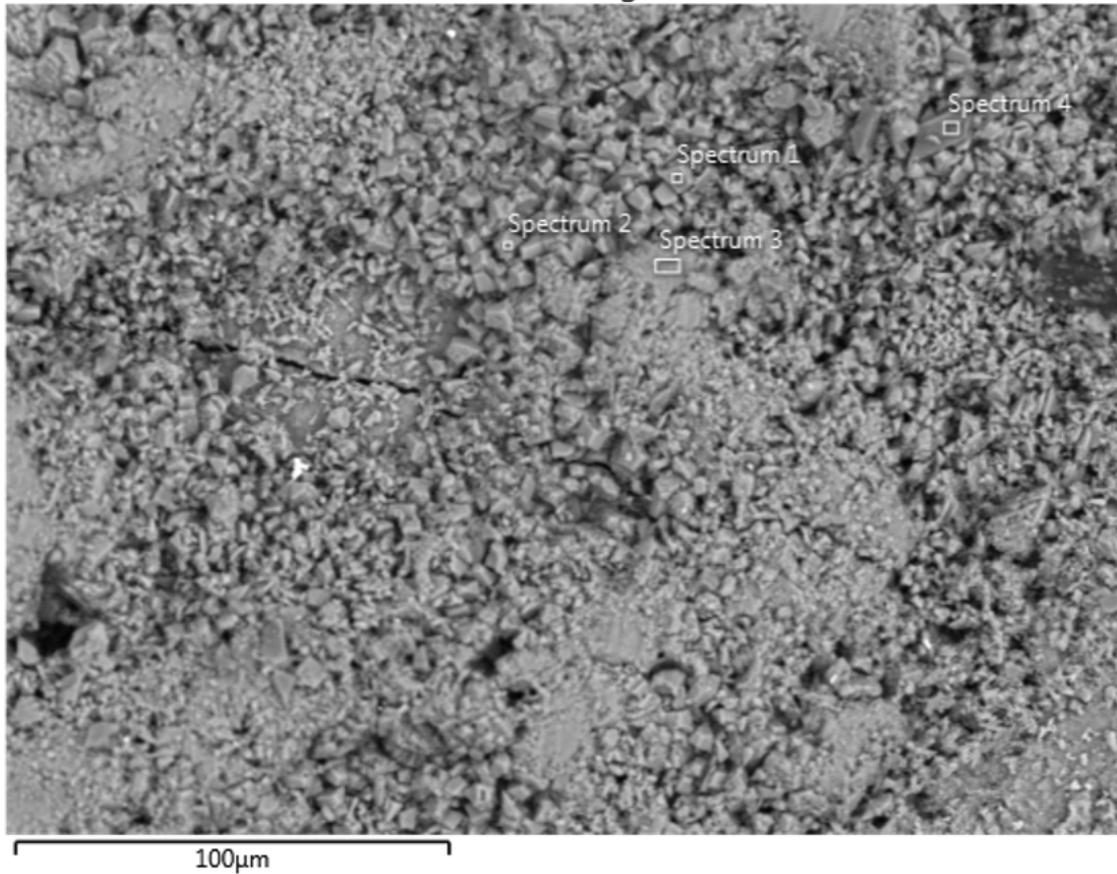


Figura 41: Espectro EDS 1 de la Figura 40

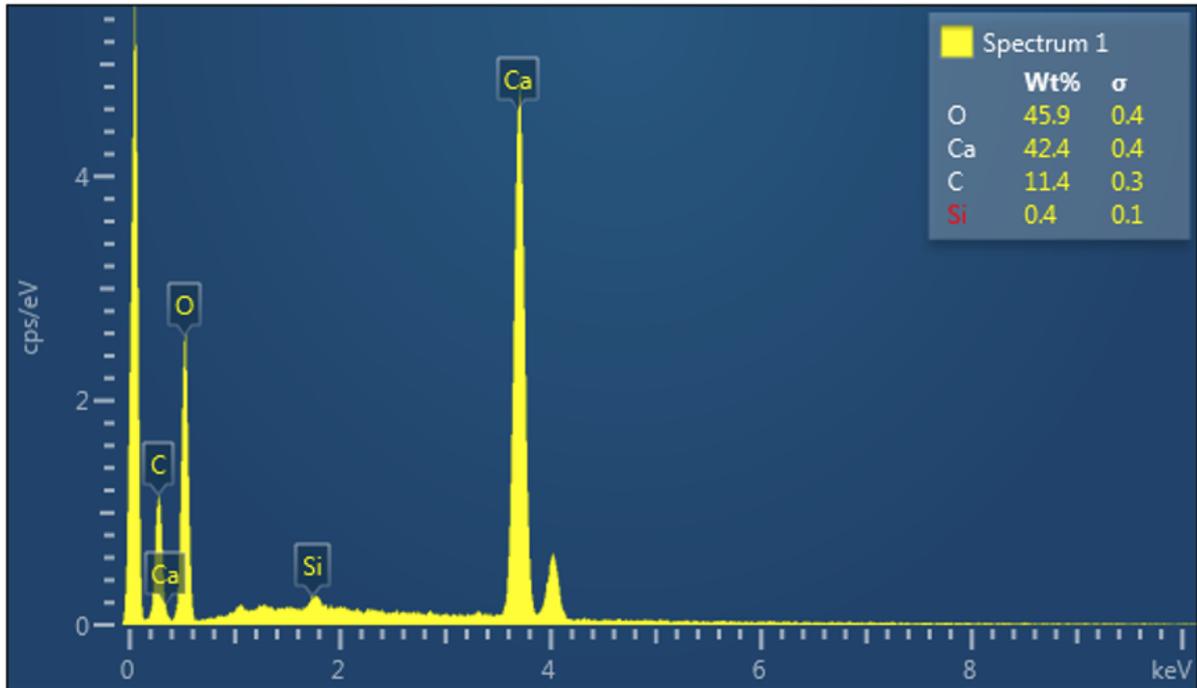


Figura 42: Espectro 2 de la Figura 40

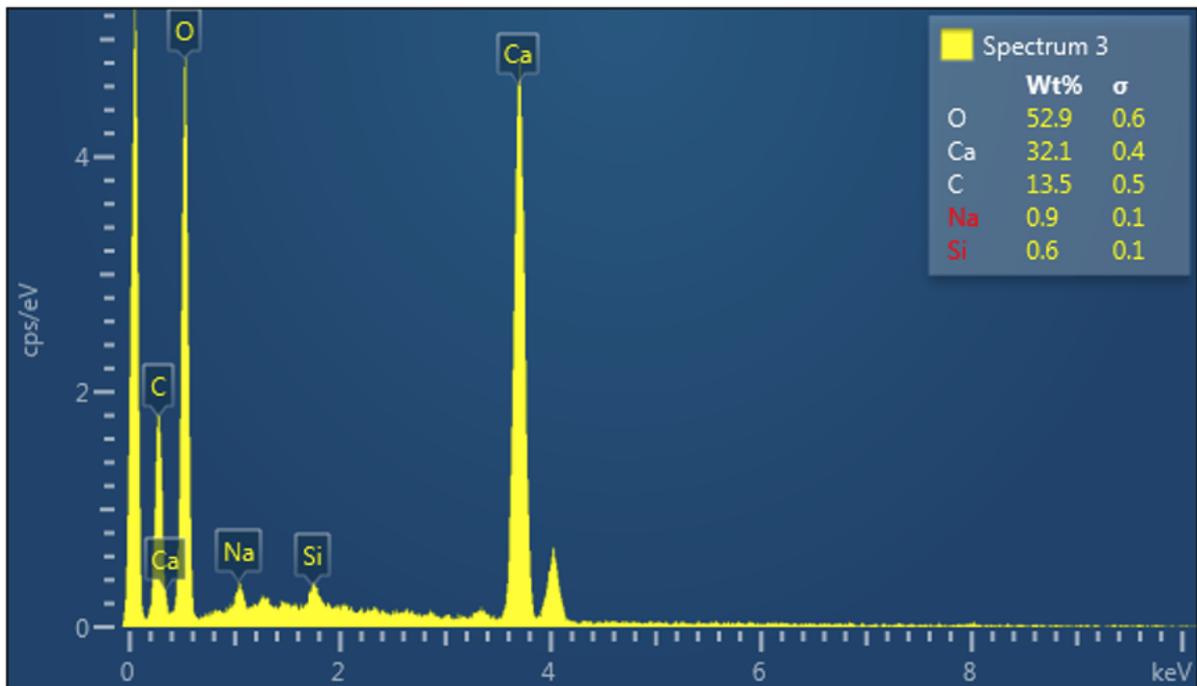


Figura 43: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento con medio LUC cepa P.5.2.A

Electron Image 3

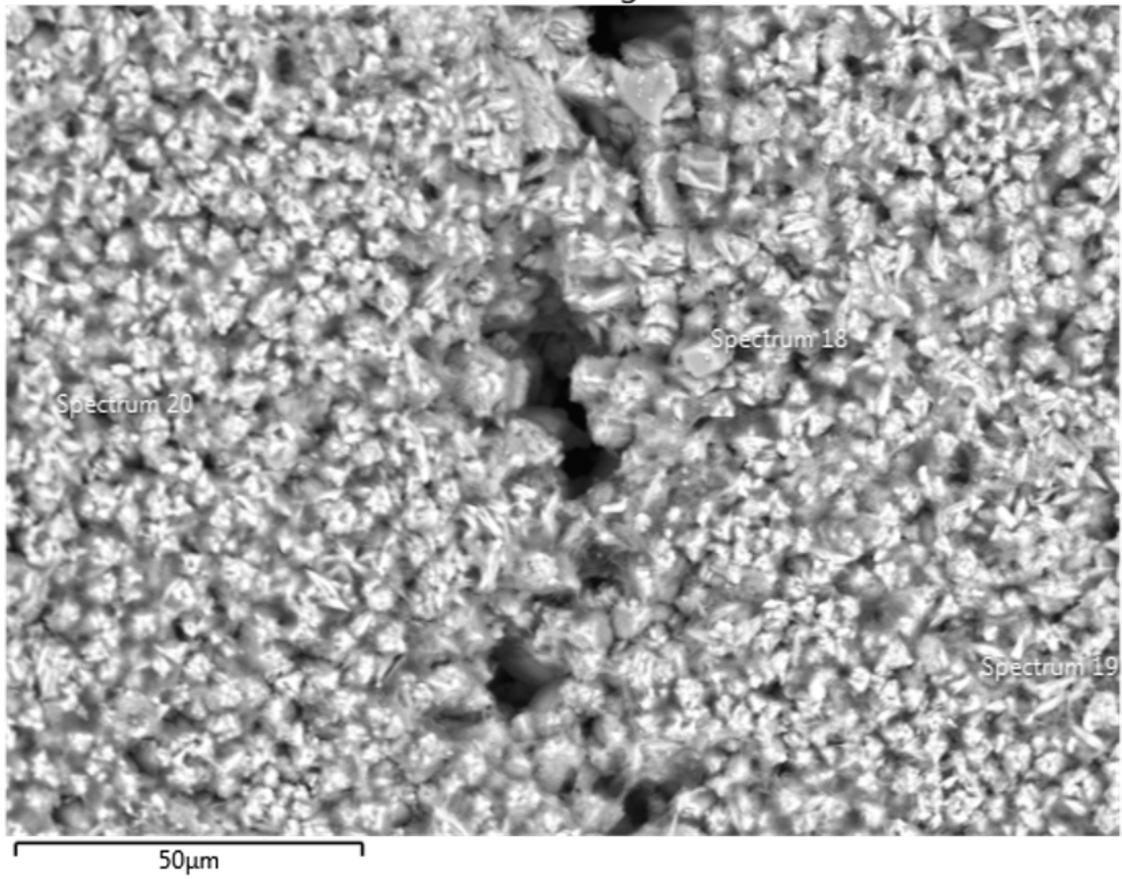


Figura 44: Espectro EDS 1 de la Figura 43

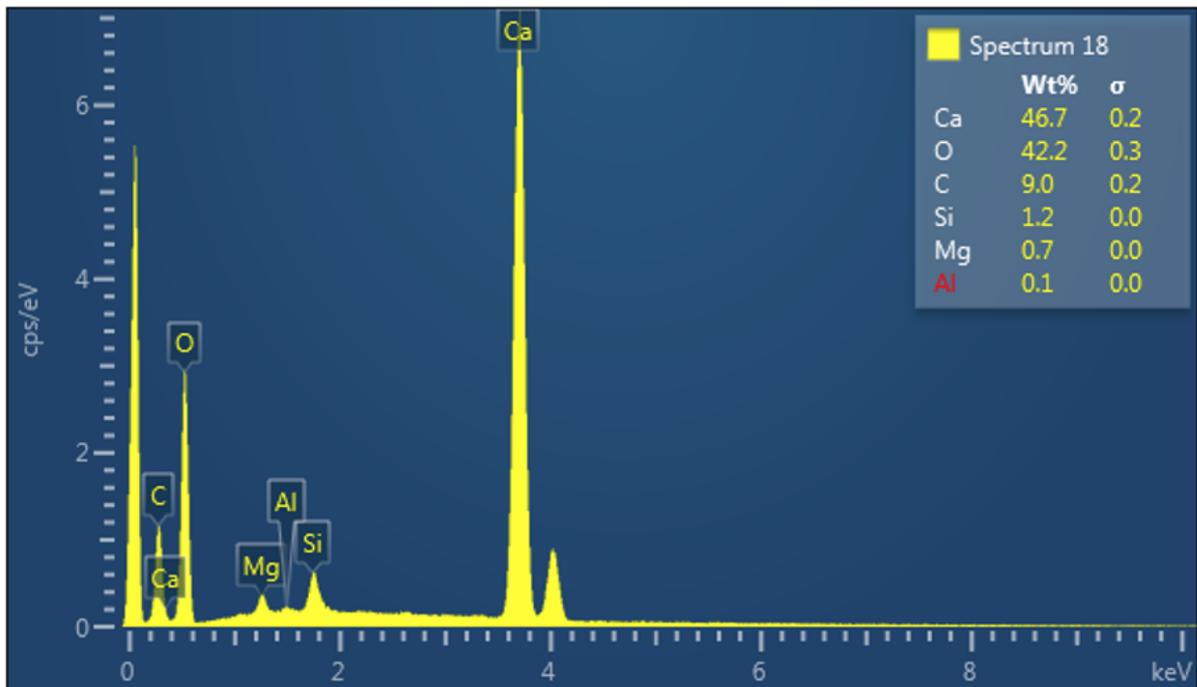


Figura 45: Espectro EDS 2 de la Figura 43

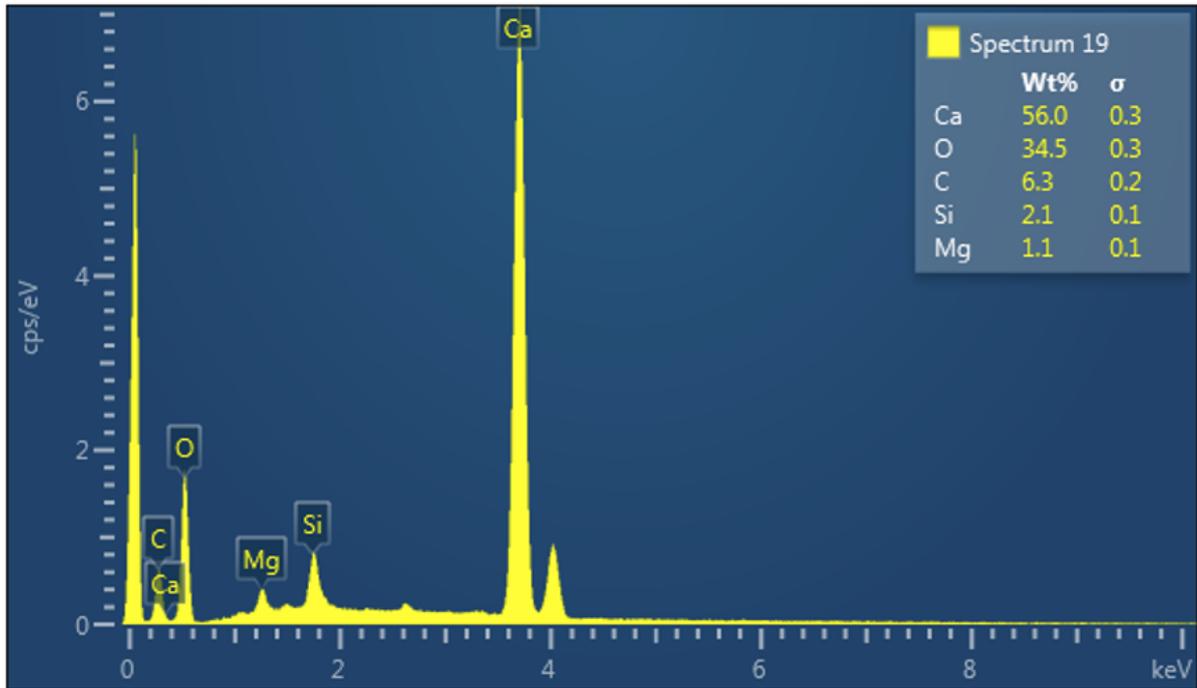


Figura 46: Imagen SEM para grieta representativa de biocemento con medio LUC cepa P.5.3.A

Electron Image 2

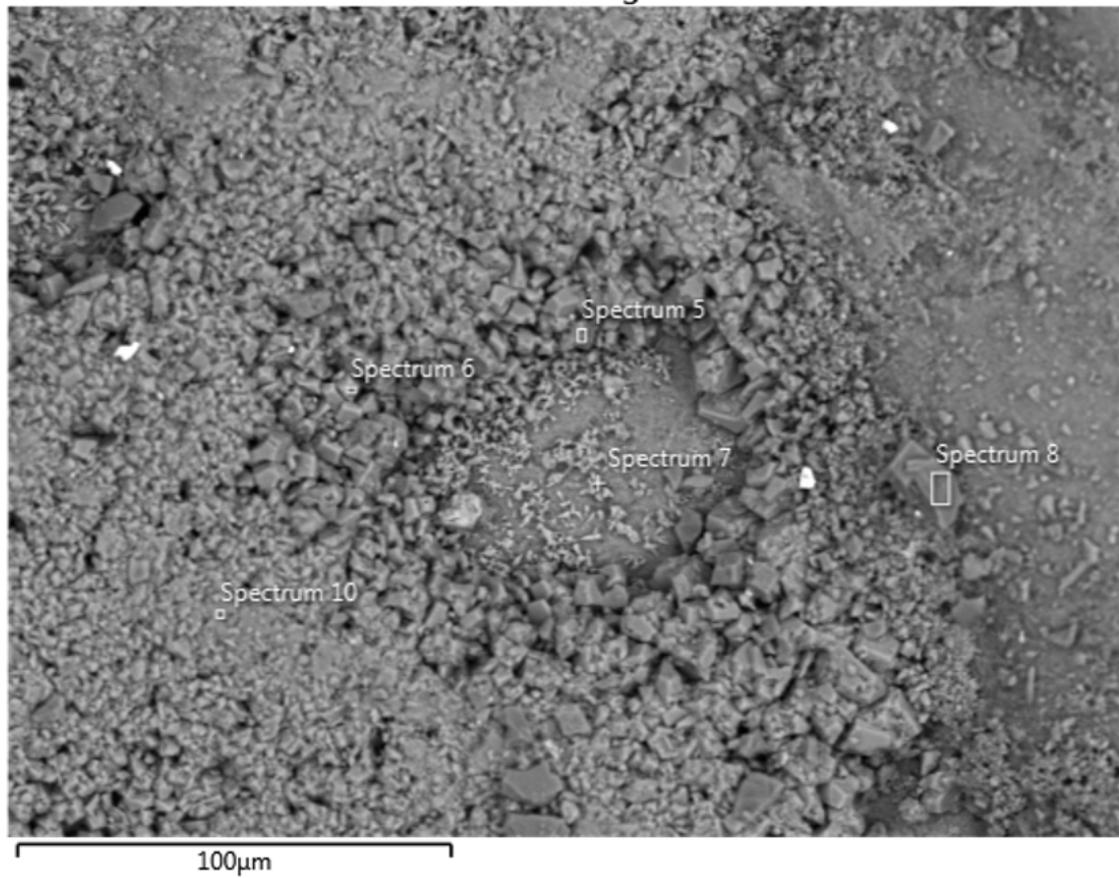


Figura 47: Espectro EDS 1 de la Figura 46

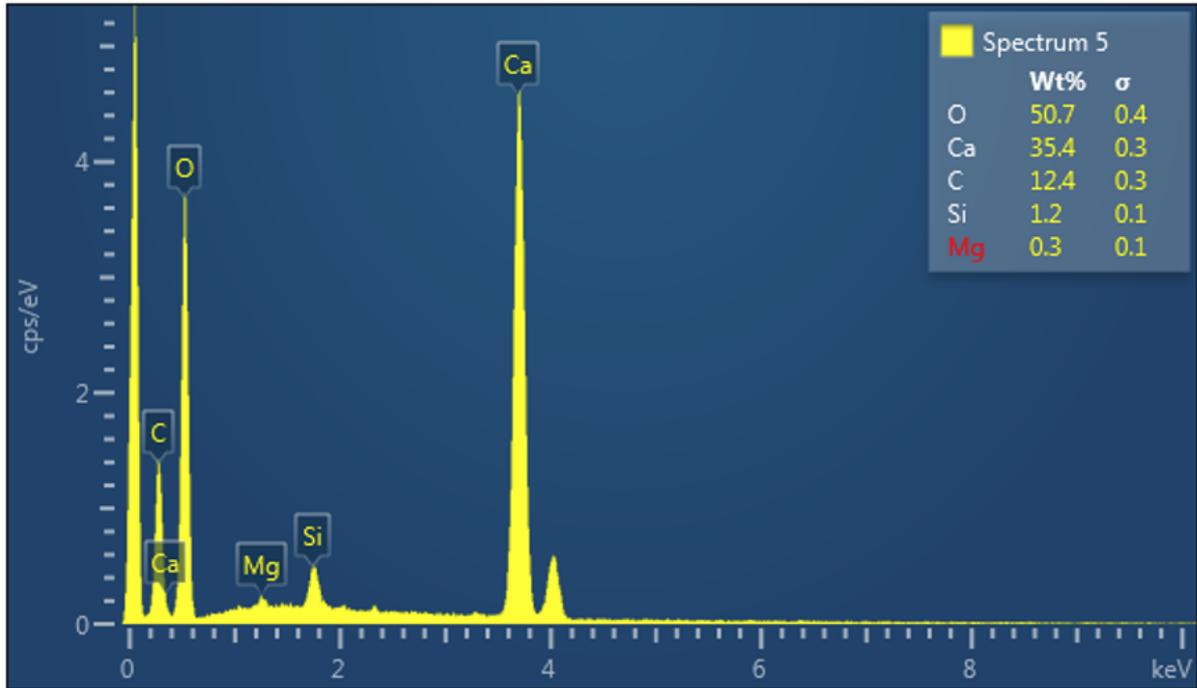


Figura 48: Espectro EDS 2 de la Figura 46

