

# Consolidación de Material de Construcción por Proceso de Biomineralización

## Consolidation of a building material with a biomineralization process

Pilar García<sup>1\*</sup>, Raquel Barrionuevo<sup>2</sup>, Carlos Villegas<sup>3</sup>, Isabel Moromi<sup>3</sup>, Guy Carvajal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias, <sup>2</sup>Facultad de Arquitectura, <sup>3</sup>Facultad de Ingeniería Civil  
Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210. Rímac. Lima. Perú

Recibido : 01/12/2017 Aceptado: 22/04/2018

### RESUMEN

En este estudio se realizó el trabajo de inducción de la carbonatogénesis microbiana con la finalidad de obtener una mejora en la consolidación de los materiales utilizados en construcción como morteros y adoquines, para conferirles una mayor resistencia y conservación. Como resultado de los ensayos realizados se pudo comprobar que la inclusión, de un cultivo de biomasa bacteriana conformada por bacterias del género *Bacillus* sp., en la formulación del mortero y adoquines, ayudó a aumentar la resistencia a la compresión con valores de  $F_c$  266.3 kg/cm<sup>2</sup> mayor en comparación con el control de  $F_c$  261.0 kg/cm<sup>2</sup>. Asimismo, el estado de agregación de las partículas mejoró notablemente, observamos que en los ensayos de fragmentación las estructuras mostraban una red geométrica más homogénea, comparada con los adoquines del ensayo control. En cuanto a los aspectos de textura y rugosidad, se comprobó que los adoquines curados con cultivos bacterianos mejoraron notablemente estas características, además de evidenciar una coloración más blanquecina, con poros con partículas de color claro y homogéneo, de mejor apariencia que el control. Sin embargo, en los ensayos realizados cambiando la formulación de la preparación de morteros y adoquines con la inclusión de cascarilla de arroz, los resultados de curado con bacterias no mostraron ninguna mejora en el proceso de consolidación por medio de la carbonatogénesis.

**Palabras clave:** *Bacillus* sp., bacterias ureolíticas, carbonatogénesis, biocementación, hormigón, cascarilla de arroz.

### ABSTRACT

The present work studied the application of microbially-induced carbonate precipitation to improve the consolidation of construction materials, such as mortars and paving stones, by improving their resistance and conservation properties. Results have shown that incorporating a biomass culture formed by *Bacillus* sp. bacteria, into the formulation of the mortars and paving stones, increased the compressive strength to  $F_c$  values of 266.3 kg/cm<sup>2</sup>, compared to control  $F_c$  values of 261.0 kg/cm<sup>2</sup>. The aggregation of the particles improved remarkably, as the structures observed after the fragmentation tests showed a more homogeneous grid, compared with that of the control test. The paving stones containing bacterial cultures showed a remarkable improvement in texture and roughness, with a whitish color and pores with light-colored particles, and in general, a better appearance than that of the control. However, when the formulations of the mortars and paving stones included rice husk, curing with bacteria did not bring any improvement of the consolidation process by means of carbonate precipitation.

**Keywords:** *Bacillus* sp., ureolytic bacteria, carbonate precipitation, biocementation, concrete, rice husk.

---

\* Correspondencia:  
E-mail: pagarcia@uni.edu.pe

## 1. INTRODUCCIÓN

Existen diversos estudios que han mostrado la formación bacteriana de cristales de calcita que ayudan en el mejoramiento de las propiedades hidráulicas [1] como mecánicas del suelo [2, 3-6], empleo en biorremediación [3-5], tratamiento de aguas residuales [7], y sellado selectivo para la recuperación de petróleo [8]. En el caso de construcción se ha conseguido con ello, el refuerzo y reparación de grietas de hormigón [9, 10] restauración de rocas [11, 12] así como la elaboración de concreto biológico [9, 10].

La precipitación del  $\text{CaCO}_3$  es un fenómeno común, forma la roca natural y se da en entornos tales como el agua del mar, agua dulce, y los suelos. El aumento en la concentración o disminución en la solubilidad del calcio o carbonato en solución provoca la precipitación natural de  $\text{CaCO}_3$  [3]. La tasa de precipitación del  $\text{CaCO}_3$  microbiológicamente esta correlacionada con el crecimiento celular, esta tasa de precipitación microbiana es significativamente más rápida que la precipitación química [9].

La urea es un compuesto químico cristalino bipolar e incoloro, de fórmula  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  que es degradada por una enzima bacteriana o ureasa que es una proteína localizada en el citoplasma o membrana periplasmática [4]. Cuando la urea se libera al medio ambiente como resultado de la acción biológica, esta enzima cataliza la hidrólisis de urea a amoníaco y carbamato [5].

El carbamato espontáneamente se descompone para producir otra molécula de amoníaco y ácido carbónico. Las dos moléculas de amoníaco y ácido carbónico posteriormente se equilibran en el agua en sus formas desprotonadas y protonadas, resultando en un cambio en el pH [5].

Una de las bacterias ureolíticas alcalófilas es *Sporosarcina pasteurii* (antes conocido como *Bacillus pasteurii*) la cual es aeróbica, formadora de esporas y en forma de varilla, utiliza la urea como fuente de energía y produce amoníaco, aumentando el pH del ambiente y genera carbonato, produciendo  $\text{Ca}_2^+$  y  $\text{CO}_3^{2-}$  que se precipitan como  $\text{CaCO}_3$  [3].

En el curso de los últimos años se han realizado trabajos en la Universidad Nacional de Ingeniería, con el objetivo de utilizar materiales desechables que pudieran ser utilizados en técnicas constructivas que fueran resistentes y de bajo costo. Generalmente se parte del conocimiento de las formulaciones de morteros (cemento, agregado fino y agua) y otros componentes prefabricados de concreto, utilizando también un residuo agroindustrial como la cascarilla de arroz. Posteriormente se mezclaron con cemento, arena gruesa y confitillo o piedra triturada pequeña, para ser usados en techos y paredes, empleando además, carrizo y bambú. Finalmente se realizó estudios de resistencia de materiales demostrando la importancia de utilizar estos componentes en futuras estructuras con el fin de otorgarle una mayor

resistencia. El desarrollo de estas estructuras si bien resuelven los aspectos de costo y facilidad de construcción, pretendimos mejorarlos con tratamientos biológicos que permitan una mayor consolidación de la estructura, incrementar la durabilidad y favorecer un proceso de cementación para utilizarlos en techos y muros de casas. Esto ayudaría a desarrollar nuevos biomateriales para un desarrollo ambiental sostenible sin incremento del costo.

Existen diversos microorganismos en el suelo y agua que son capaces de generar carbonatos. La investigación consistió en trabajar con suelos de diversas procedencias y aislar un grupo de bacterias, para que trabajen en consorcio, que en condiciones óptimas produjeran carbonato de calcio necesario para ensayarlos con materiales de construcción Este biomaterial se acondicionó eficientemente a los materiales de construcción (cenizas de cascarilla de arroz, cemento, arena) con el fin de mejorar las propiedades físicas y mecánicas de los productos constructivos como el mortero y los adoquines preparados con los materiales mencionados

Los objetivos de este trabajo fueron:

- (a) Aislar, seleccionar e identificar bacterias nativas procedentes suelos, que posean actividad ureasa para la constitución del consorcio bacteriano.
- (b) Determinar la capacidad de los microorganismos capaces de generar una matriz coherente de carbonato que sirva de protección y consolidación en la estructura porosa de adoquines de hormigón.
- (c) Evaluar si la mezcla utilizada para la fabricación de los adoquines que incluye la cascarilla de arroz, incinerada y molida en condiciones óptimas (ratio superficie/volumen) pudiera ser mejorada mediante la carbonatogénesis bacteriana.

La relevancia de este trabajo residió en el enfoque innovador que fue conseguir que los materiales de construcción se mejoren incluyendo un proceso de biomineralización bacteriana, para una aplicación sostenible en el rubro de la construcción.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Obtención del consorcio bacteriano.

Se tomaron 5 muestras de diferentes puntos de los jardines de la universidad. Se vertió 1 gramo de muestra de tierra/suelo/lodo, en matraces conteniendo 50 ml de medio de enriquecimiento (ME): 10 g/L extracto de levadura, 1 M de urea, 152 mM de sulfato de amonio, 100 mM acetato de sodio, a pH 9.0 [2], dejándose a temperatura ambiente 25°C, en agitación a 100 rpm, por 48 horas.

## 2.2 Aislamiento

Se tomó 20  $\mu$ L de cada muestra, después de 48 horas de incubación, sembrándose en placas con agar nutritivo (AN) mediante la técnica de estrías, dejándose incubar por 24 horas a temperatura ambiente.

## 2.3 Identificación

Se caracterizó macroscópicamente la morfología de las diferentes colonias crecidas en la superficie del agar, seguidamente se realizó la tinción de Gram para diferenciar la morfología de las bacterias [15]. Asimismo se realizó la prueba de la actividad ureasa sobre placas con agar urea [16] y algunas pruebas bioquímicas para especies de *Bacillus*.

## 2.4 Prueba de biomineralización

Para esta prueba, las bacterias seleccionadas se cultivaron en 5 ml de medio líquido M-3: 10 g/L de bacto casitone, 10 g/L acetato de calcio, 2 g/L de carbonato de potasio, 10 mM buffer fosfato, pH: 8.0. Para el cultivo en placas se utilizaron los medios M-3 y M-3P con adición de 15 gramos de agar [2].

## 2.5 Producción de cristales de carbonato

Las bacterias seleccionadas se cultivaron en matraces conteniendo 50 ml del medio B4: 5 g/L acetato de calcio, 1 g/L extracto de levadura, 1 g/L de glucosa, pH: 8.0, a temperatura ambiente por 3 semanas [17].

## 2.6 Colección de cristales de carbonato

Una vez formados los cristales se colectaron en papel filtro Whatman N°1 [17]. Se lavaron con agua destilada estéril y se secaron a 37° por 48 horas.

## 2.7 Condiciones óptimas de crecimiento del consorcio bacteriano.

El consorcio seleccionado fue cultivado en 100 ml de medio B4 contenido dentro de matraces puestos en agitación a 100 rpm, por 48 horas a 25°C. Luego se midió la densidad óptima.

## 2.8 Elaboración de adoquines y curado

Se elaboraron los adoquines control con los siguientes materiales: cemento 2 Kg, arena 6 Kg confitillo 3,5 Kg y agua 6,35 L. Los adoquines experimentales se prepararon de la misma manera pero sustituyendo el agua por el cultivo de bacterias con un crecimiento de  $1 \times 10^6$  ufc/mL.

Los moldes de madera utilizados fueron de las siguientes dimensiones: 24,5 x 12,5 x 7,5 cm. Antes del vaciado, se untó toda la superficie interna con petróleo para facilitar el desmoldamiento. El vaciado se efectuó encima de una mesa vibradora, para tener la mezcla uniformemente dispuesta en cada molde. Se llenó hasta el tope de cada molde

Transcurrida una semana de la elaboración de los adoquines se procedió al curado de éstos, con la solución de bacterias y realizando un control curado solo con agua. Se optimizó la cantidad de solución bacteriana a 50 ml debido a la porosidad de los adoquines. Encontrada la medida adecuada se barnizaron los adoquines experimentales con la misma cantidad de solución. Este curado se realizó diariamente por un período de 28 días a temperatura ambiental de 24°C.

## 2.9 Elaboración de morteros

Son cuatro series de la preparación del mortero

**Los morteros controles**, se elaboraron de acuerdo a la norma técnica 334.051-2005. Se mezcló cemento portland tipo I y arena gruesa (en proporción 1: 2.75), agua potable 350 ml (relación a:c de 0.70) con una fluidez de 112.4.

**Los morteros curados**, se elaboraron de la misma manera que los morteros controles, pero se curaron sumergiéndolos en una solución de bacterias (caldo de cultivo).

**Los morteros de cascarilla**, se elaboraron de la misma manera que los morteros controles, con la variante de agregar 10 g de cascarilla de arroz.

**Los morteros de cascarilla y solución bacteriana**, se elaboraron de la misma manera que los morteros de cascarilla pero se reemplazó el agua de la mezcla con solución de bacterias (caldo de cultivo).

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y las mediciones de compresión se realizaron a los 7, 14, 21, 28 y 45 días de elaborados.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Aislamiento, identificación de bacterias pruebas de biomineralización

Se realizaron continuos aislamientos de las bacterias del suelo y lodos que mostraron diversas morfologías en las colonias, al realizarse la tinción Gram, se seleccionaron cinco cepas, bacilos gram positivos (Figura 1), ureasas positivos, con diferentes grados de producción de calcita de morfología irregular.

Las pruebas bioquímicas nos indicaron que las cinco cepas que conformaron el consorcio eran del genero *Bacillus* sp, la mayoría de la especie *Bacillus pasteurii*, 80% y en menor medida, *B. cereus* 5%, *B. subtilis* 5% y otros *bacillus* sin identificar 10%.

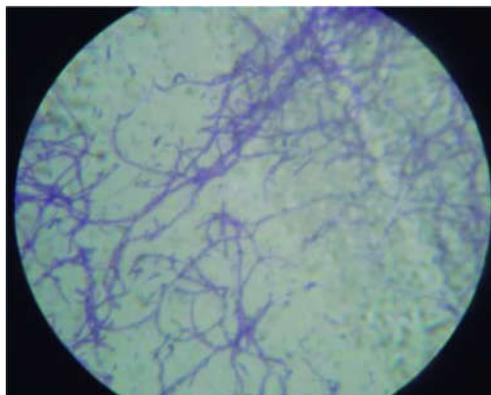


Figura 1. Imagen microscópica de *Bacillus* sp.

### 3.2 Prueba de biomineralización, producción y colección de cristales.

Luego de los ensayos de biomineralización, donde la cantidad de cristales producidos eran variables según cada cepa empleada, estos cristales fueron observados al microscopio óptico, como se muestra en la Figura 2.

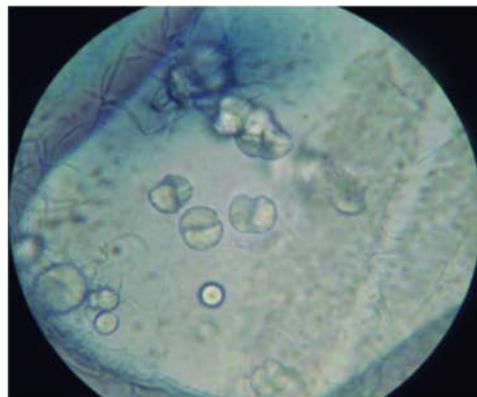


Figura 2. Imagen microscópica de una formación de calcita producida por una cepa de *Bacillus* sp. De forma bi-esférica.

Tabla 1. Ensayo de resistencia a la compresión

DESCRIPCIÓN Y COMPARACIÓN						
PROTOTIPO	CURADO	DIMENSIONES (cm)			CARGA DE ROTURA (Kg)	F <sub>C</sub> , kg/cm <sup>2</sup>
		LARGO	ANCHO	ALTO		
Experimento 1	Bacterias	24.3	12.3	7.3	79600	266.3
Experimento 2	Bacterias	23.9	12.1	7.1	76000	262.8
Control	Agua	22.6	11.8	7.2	69800	261.7

### 3.3 Resultados de los ensayos con adoquines

En este estado de la investigación se sometieron los adoquines a pruebas de resistencia o compresión, realizados en el laboratorio de materiales de la Facultad de Ingeniería Civil, cuyos resultados se muestran a continuación.

#### 3.4 Resistencia a la compresión

Luego de realizar los ensayos de compresión se observó un incremento de la resistencia a la compresión de 266.3 kg/cm<sup>2</sup> en el primer prototipo experimental comparado con el control cuyo valor fue 4.6 kg/cm<sup>2</sup> menor (Tabla 1).

#### 3.5 Fragmentación de las muestras

En los ensayos de fragmentación, se pudo observar que la fragmentación de cada prototipo era diferente. En el caso de los prototipos experimentales P1 y P2, se observaron fragmentos de forma pareja y geométrica. Esto probablemente se deba a la presencia

de una retícula interior. Estos hallazgos demuestran la hipótesis de que estos prototipos al estar curados mediante soluciones de bacterias que liberan cristales de calcita, se produce una retícula o un tipo de sistema cristalino interior, que ocasionaría la fragmentación muy análoga a la que se produce con la ruptura de bloques de sal.

Variación de color y textura. Pasada la etapa de curado (15 días después de la aplicación de la solución líquida de bacterias) se realizó el análisis y comparación de los adoquines. Los adoquines curados con la solución de bacterias produjeron cambios notables en la resistencia del material durante la compresión y fragmentado (Figura 3 A y B). Además, se observó cambios a nivel del color, textura y porosidad como se muestra Figura 4 y en la Tabla 2.

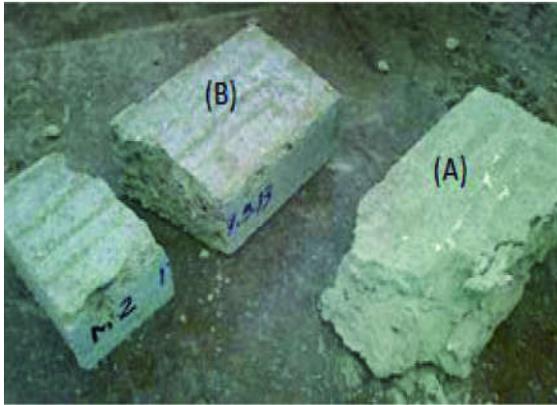


Figura 3. (A) adocn control y (B) adocn experimental. Nótese la diferencia en la forma de la fragmentación entre ambas muestras.

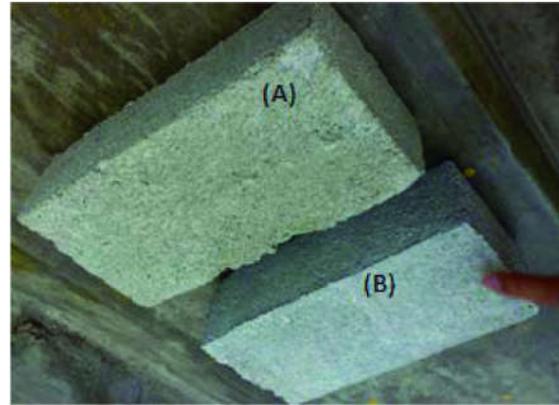


Figura 4. (A) adocn control y (B) adocn experimental. Nótese la diferencia de color y textura en los adocnes experimentales comparados con el control.

**Tabla 2: Cuadro Comparativo: textura y color**

**DESCRIPCIÓN Y COMPARACIÓN**

PROPOTIPO	CURADO	COLOR	TEXTURA	POROSIDAD
Experimento 1	Con Bacterias	Gris claro, debido al llenado de los poros con pigmentación blanquecina.	Suave, con una textura tipo aterciopelada.	La superficie externa mostraba poros llenos de calcita
Experimento 2	Con Bacterias			
Control	Agua	Plomo	spera	Muy poroso

Resultados de los ensayos con morteros. Los ensayos realizados con morteros fabricados con las formulaciones establecidas en el acápite de materiales y métodos se muestran en la Tabla 3 y Figura 5. Se presumía que el uso de microorganismos productores de calcita pudiera tener algún efecto favorable en

morteros elaborados con material orgánico como la cascarilla de arroz. Se realizaron análisis de resistencia o compresión semanalmente hasta 45 días. Los resultados obtenidos se aprecian en la Tabla 3 y la Figura 5.

**Tabla 3. Resultados de ensayo de compresión**

EDAD (Días)	RESISTENCIA A LA COMPRESIÓN PROMEDIO Kg/cm <sup>2</sup>			
	Mortero Control	Control Curado	Mortero Cascarilla	Mortero cascarilla y sol. bacterias
7	249	221	156	141
14	271	232		
21	277			
28	317	297	224	188
45	341		275	221

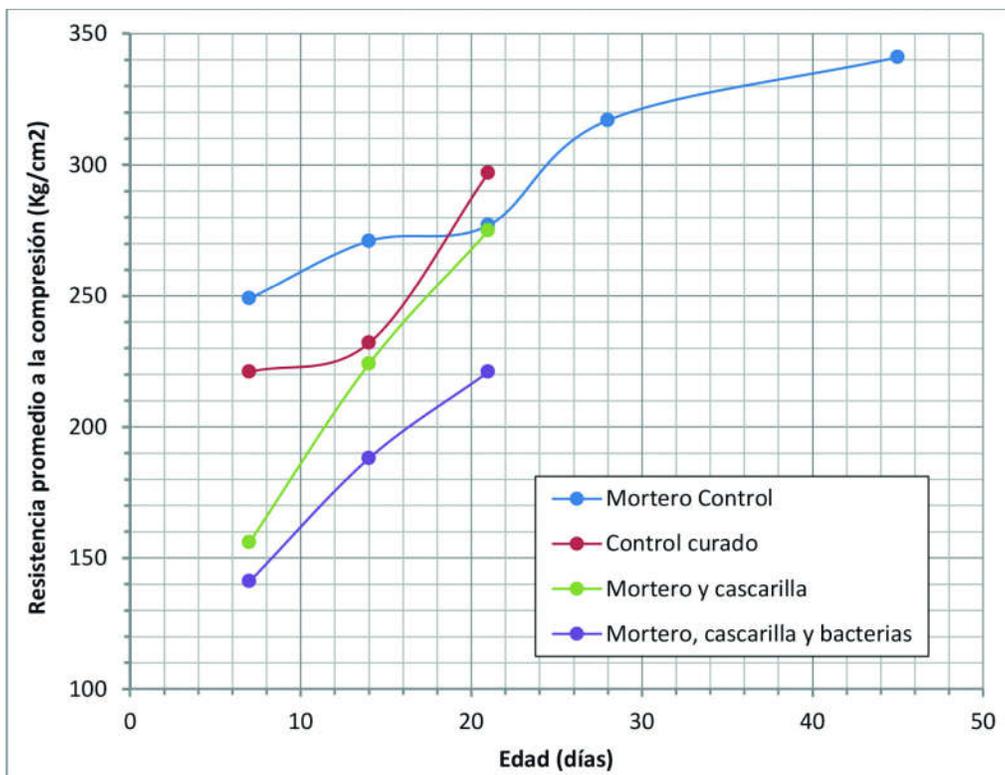


Figura 5. Resistencia promedio a la compresión (Kg/cm<sup>2</sup>)

En general, como todo elemento fabricado con cemento, la resistencia aumenta con la edad de la muestra y se considera como resistencia característica de los fabricados con cemento portland tipo I, la correspondiente a la resistencia a los 28 días. Sin embargo, teniendo presente que el efecto de la adición de las bacterias podría presentarse a un tiempo mayor, se realizaron ensayos hasta edades de 45 días.

Se observa que en todos los casos estudiados la resistencia continua incrementándose hasta los 45 días. Con la adición de cascarilla de arroz, se observa una reducción de la resistencia del orden de 20% respecto al control y el agregado de solución bacteriana a la mezcla muestra el mismo comportamiento, por lo que se presume que no se desarrolla un buen proceso de cimentación o mineralización. En el caso del mortero curado con solución bacteriana sin el agregado de cascarilla se presenta una resistencia cercana al mortero control, tendencia que tiende a incrementarse al transcurso de las semanas, este hecho también se refleja en los ensayos con adoquines.

#### 4. CONCLUSIONES

Las experiencias obtenidas en el uso de microorganismos productores de calcita (carbonato de calcio) en formulaciones estándar de adoquines y morteros nos permiten concluir que dependiendo del tipo de mezclas utilizadas, aquellas que presentan un agregado que permita una porosidad donde puedan los microorganismos generar la liberación de cristales de calcita se constituirá un material de mayor resistencia así como textura y colores más agradables. Este efecto se consideraría como una propiedad a explotar en construcciones así como en la restauración de superficies de concreto, piedra, sillar, u otros materiales que están expuestos a deterioro ambiental o que requieran un tratamiento externo que mejore la apariencia y conservación.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el financiamiento del Concurso de Proyectos de Investigación Interdisciplinarios, del Instituto General de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería. Se agradece a los estudiantes del curso de Tecnologías de Vivienda de Bajo Costo FAUA, ciclos 2013-I y 2013-II.

## REFERENCIAS

- [1] Dennis ML, Turner JP. 1998. Hydraulic conductivity of compacted soil treated with biofilm. *J. Geotech. Geoenviron. Eng.* 124(2): 120-127.
- [2] Al-Thawadi S. 2008. High strength in-situ biocementation of soil by precipitating locally isolated ureolytic bacteria. Tesis Doctoral. Murdoch University. Australia
- [3] Whiffin V. 2004. Microbial CaCO<sub>3</sub> precipitation for the production of biocement. Ph.D. Dissertation, School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Australia.
- [4] DeJong JT, Fritzsche MB, Nusslein K. 2006. Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. *J. Geotech. Geoenviron. Eng.*, 132(11): 1381-1392.
- [5] DeJong JT, Mortensen BM, Martinez BC, Nelson DC. 2010. Biomediated soil improvement. *Ecol. Eng.* 36: 197-210.
- [6] Van Paassen LA, Whiffin VS & Harkes MP. 2007. Immobilization of bacteria to a geological material. Netherlands. Patentes signed by Stichting Geo Delft. EP1798284-A1; WO2007069884-A1.
- [7] Morales L, López González J, Garzón E, Giménez A y Romero E. 2011. Crecimiento de Cristales de CaCO<sub>3</sub>, como Resultado de la Actividad Microbiológica en Suelos. *Macla* N° 15. septiembre Revista de la Sociedad Española de Mineralogía.
- [8] Gurbuz A, Dursun Y, Nur Z. and Cinar B. 2011. Cementation in a matrix of loose sandy soil using biological treatment method. *African Journal of Biotechnology*, Vol 10(38), pp 7432-7440.
- [9] Ramakrishnan V, Bang SS, Deo KS. 1998. A novel technique for repairing cracks in high performance concrete using bacteria. *Proceeding of the International Conference on HPHSC*, Perth, Australia. pp. 597-618.
- [10] Ramakrishnan V, Ramesh KP, Bang SS. 2001. Bacterial concrete. *Proceeding of SPIE-Int. Soc. Optical Eng.* pp. 168-176.
- [11] Rodríguez-Navarro C, Rodríguez-Gallego M, Chekroun K. and González-Muñoz M. 2003. Conservation of Ornamental Stone by *Myxococcus xanthus*-Induced Carbonate Biomineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(4):2182.
- [12] Tiano P., Biagiotti L. and Mastromei G. 1999 Bacterial Biomediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *Journal of Microbiological Methods* 36:139-145.
- [13] Mastromei G, Marvasi M, Perito B. 2008. Studies on bacterial calcium carbonate precipitation for stone conservation. 1st International Conference on Bio-Geo-Civil Engineering, Netherlands, June 23-25, pp. 103-106.
- [14] Boquet E, A. Boronat, Ramos-Cormenzana A. 1973. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* 248:21-28.
- [15] Bergey, D.H., Holt, J.G. 1997. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (9th Ed.). Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-683-00603-7.
- [16] Shen J, Cheng X. 2008. Laboratory investigation on restoration of Chinese ancient masonry buildings using microbial carbonate precipitation. 1st International Conference on Bio-Geo-Civil Eng., Netherlands, pp. 28-34.
- [17] Zamarreño D, Inkpen R, May E. 2009. Carbonate Crystals Precipitated by Freshwater Bacteria and Their Use as a Limestone Consolidant. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(18):5981.