

[VOLVER AL ÍNDICE](#)

PRECIPITACIÓN DE CARBONATO DE CALCIO INDUCIDA POR MICROORGANISMOS. EVALUACIÓN DE SU UTILIDAD EN LA REPARACIÓN DE FISURAS EN MORTEROS DE EXPERIMENTACIÓN.

Dianela Gonzalez (gonzalezdianelag@gmail.com); Anabela Guillarducci (aguilard@frsf.utn.edu.ar); Rudy Grether (rogrethe@frsf.utn.edu.ar); Sergio Guerrero (saguerrero@gmail.com); Federico Andrés (fandres@frsf.utn.edu.ar)

Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Santa Fe (UTN-FRSF), Centro de Investigación y Desarrollo para la Construcción y la Vivienda (CECOVI). - Arg.

Palabras clave: biohormigón - precipitación - carbonato - bacteria - fisura

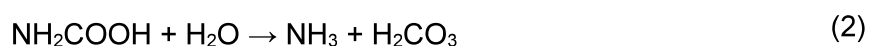
En las estructuras de hormigón armado se pueden producir fisuras en diferentes etapas de la vida en servicio, estas pueden solo afectar la apariencia, pero también pueden comprometer la resistencia y la durabilidad de la estructura. Por lo tanto, la reparación de las mismas atiende a motivos estéticos y funcionales, pero sobre todo de durabilidad ya que las fisuras son una vía por la cual ingresan con mayor facilidad agentes agresivos de tipo químico, que favorecen la aparición de otras patologías como la corrosión.

Como se mencionó anteriormente la presencia de fisuras no siempre reviste un problema significativo del tipo estructural, ya que se presentan de forma tal que no sobrepasan determinados espesores de recubrimiento. En dicha instancia es cuando es oportuno repararlas para detener su propagación evitando condiciones críticas. En este sentido, la precipitación de carbonato de calcio (CaCO₃) inducida por microorganismos es un fenómeno utilizado en el desarrollo de materiales cementicios auto-reparantes que sellan las fisuras desde el mismo momento de su generación, permitiendo preservar la integridad de las estructuras y protegerlas de otras patologías.

*Dado a que la incorporación de la masa biológica al hormigón se realiza a través del agua de amasado, se pretenden definir las variables que permitan el desarrollo de la bacteria *Lysinibacillus sphaericus* 2362 y que a su vez se ajusten a los requisitos para el agua de amasado establecidos en la norma IRAM 1601:2012.*

1. INTRODUCCIÓN

Teniendo en cuenta que las fisuras pueden causar diferentes problemas dependiendo de su tamaño (donde las de mayor tamaño afectan la resistencia del material y de los elementos estructurales y por lo tanto deben ser reparadas), se desarrolla la idea de un material cementicio capaz de auto-repararse [1][2][3]. Dicho material contará con la habilidad de conseguir una reparación que nacerá del interior de la patología que produce la fisura en él. Esta tecnología que se está comenzando a hacer más conocida con el nombre de selfhealing o auto-reparación, tiene su basamento teórico en la precipitación de carbonato de calcio, dentro de sus grietas, inducida por microorganismos con alta actividad ureolítica [4][5][6][7][8]. Así, mediante la actividad ureasa microbiana, 1 mol de urea se hidroliza a 1 mol de amoníaco y 1 mol de carbamato (ecuación 1), el carbamato se hidroliza espontáneamente para formar 1 mol adicional de amoníaco y ácido carbónico (ecuación 2) como sigue:



Estos productos se equilibran en agua para formar carbonato (ecuación 3), iones de amonio e hidróxido (ecuación 4) que dan lugar a un aumento del pH. El carbonato así generado se combina con los iones de Ca^{2+} presentes en la solución de poros formando carbonato de calcio (ecuación 5).



La reparación de una fisura desde el mismo momento de su generación será de gran ayuda para preservar la integridad de las estructuras y protegerlas de otras patologías [2]. Es importante mencionar que este tipo de tecnología, si bien se conoce a nivel mundial, no es utilizada por ningún grupo de investigación a nivel regional o nacional.

En el presente trabajo se aborda la optimización de procedimientos y tecnologías para producir agua de amasado con contenido de bacterias ureolíticas, con el objetivo de que la misma cumpla los requisitos definidos en la norma IRAM 1601:2012 [9]. Esto permitirá en un futuro poder obtener morteros experimentales, potencialmente, auto – reparantes, basándose en el fenómeno antes descrito (reacción 5).

2. METODOLOGÍA

Con el objetivo de definir un medio de cultivo que permita el desarrollo del microorganismo de interés y cumpla con los requisitos de agua de amasado, se realizaron las siguientes evaluaciones.

2.1. Caracterización fenotípica de la cepa bacteriana

La bacteria que se utiliza en el proyecto de investigación, dentro del cual se enmarca el presente trabajo, se denomina *Lysinibacillus sphaericus* 2362, cepa original del instituto Pasteur de Paris, aislada de la tierra, cedida a nuestro grupo por la Dra. Mariana Allievi (CONICET y Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA). Con el objetivo de confirmar la cepa bacteriana, se procedió a determinar las características físicas, fisiológicas, y de comportamiento (caracterización fenotípica) de la misma.

2.2. Evaluación de la actividad ureasa

El medio Urea de Christensen es un medio de cultivo con tripteína y glucosa, que aportan nutrientes para el desarrollo de microorganismos. Tiene también cloruro de sodio para regular el equilibrio osmótico, y rojo fenol. Este último es un indicador de pH. Si la bacteria tiene la capacidad de desdoblar urea (presente en el medio) se generará dióxido de carbono y amoníaco. El amoníaco alcaliniza el medio y hace virar de color al indicador. De esta manera el medio se torna rojo.

Para determinar si la bacteria *Lysinibacillus sphaericus* manifiesta actividad ureasa, se utilizó el crecimiento del microorganismo en medio Urea de Christensen agarizado (en pico de flauta) y se realizó la titulación.

2.3. Evaluación de la formación de cristales de CaCO_3

Se realizó una prueba cualitativa simple para ver la capacidad de las bacterias para inducir formación de cristales de calcita. Para ello se incubó in vitro, una alícuota de biomasa bacteriana en un medio de precipitación (0,4 % extracto de levadura, 0,5 % glucosa, 1 % urea, 0,25 % acetato de calcio, 1,5 % agar si el medio es sólido), a pH 6, a una temperatura de 34 °C durante 15 días, para luego examinar macroscópicamente si existe formación de cristales sobre la superficie del medio de cultivo [3].

2.4. Ensayos de crecimiento en distintos medios

Se utilizaron distintos medios de cultivos para evaluar el crecimiento de la bacteria: lysogeny broth (LB) [10]; medio urea-extracto de levadura (UYE), medio urea-extracto de carne (UME) [11]; medio UYE modificado (dilución 1/5 del UYE) y medio mínimo suplementado también con urea (UM9) [12]. A continuación, se detalla la composición de los medios a evaluar.

Tabla 3. Medios de cultivo y su composición

MEDIO DE CULTIVO					
REACTIVO	LB	UYE	UYE MODIF.	UME	UM9
EXTRACTO DE LEVADURA	5 g/L	20g/L	5 g/L	20 g/L	
CLORURO DE SODIO	10g/L				8.55 mM
TRIS-BASE		0.13M	0.13 M	0.13 M	
EXTRACTO DE CARNE					
PEPTONA	10 g/L				
CLORURO DE AMONIO					9.35 mM
UREA		10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L
FOSFATO ÁCIDO SODIO					33.7 mM
FOSFATO DIÁCIDO POTASIO					22.0 mM
GLUCOSA					0.4 %
SULFATO DE MAGNESIO					1 mM
CLORURO DE CALCIO					0.3 mM
BIOTIN					0.001 mg/L

Las bacterias se incubaron a una temperatura de 27°C en agitación a 130 rpm (se utiliza un agitador magnético como medio de agitación) y se toman alícuotas cada hora durante 24 horas y, en cada caso, se determina su densidad óptica a 600 nm en espectrofotómetro.

Ensayos fisicoquímicos de los distintos medios de cultivos utilizados

Se sometieron los distintos medios a análisis de concentraciones de iones con el objetivo de determinar el medio óptimo para utilizar en el cultivo de la bacteria, el cual no debe interferir en las propiedades del hormigón.

Se determinó el pH y el contenido de cloruros, sulfatos, residuos insolubles y materia orgánica de cada medio, siguiendo la metodología especificada en la norma IRAM 1601:2012 [9], para luego comparar los valores obtenidos con los mínimos y máximos de concentraciones permitidas en agua de amasado definidos en la norma mencionada anteriormente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización fenotípica de la cepa bacteriana

Mediante estudios microbiológicos y bioquímicos se logra confirmar la identidad de la cepa bacteriana, un bacilo Gram positivo, esporulado. El microorganismo es catalasa positivo, ureasa positivo, no fermentador de glucosa, no productor de gas a partir de glucosa, no crece en anaerobiosis, no reduce nitrato a nitrito. En base a especificaciones que definen distintos manuales de sistemática en bacteriología se realizó la identificación de *Lysinibacillus sphaericus* (servicio de identificación de microorganismos de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL, Santa Fe).

3.2. Evaluación de la actividad ureasa

Como se puede observar en la Figura 1 (izquierda de la imagen), *Lysinibacillus sphaericus* libera ureasa que desdobla la urea para generar amonio en el medio. Esto aumenta el pH y hace virar el indicador rojo fenol.

En paralelo, para visualizar un control negativo, se siembra en otro pico de flauta del mismo medio una bacteria no productora de ureasa (*Escherichia coli*). *Escherichia coli* crece en el medio, pero no produce ningún cambio en el color del medio, como se observa a la derecha de la imagen.

De esta forma queda demostrada la capacidad de *Lysinibacillus sphaericus* de producir la enzima ureasa.



Figura 1: (a) Cultivo *Lysinibacillus sphaericus*. (b) Control.

3.3. Evaluación de la formación de cristales de CaCO_3

Siguiendo la metodología descrita en la sección 2.3, se logra obtener cristales compatibles con carbonato de calcio. La reacción frente a HCl diluido genera efervescencia por formación y liberación de CO_2 . En la figura 2 se puede observar una imagen de cristales de carbonato de calcio obtenida en un microscopio óptico de baja resolución.

Actualmente se está trabajando en la optimización de la obtención de muestras de los cristales para analizarlas por microscopía electrónica.



Figura 2: Cristales de CaCO_3 . Microscopio óptico. Objetivo de 20X

3.4. Ensayos de crecimiento en distintos medios

La evaluación del crecimiento de *Lysinibacillus sphaericus* en distintos medios se realiza con el objeto de identificar aquél que produce mayor cantidad de biomasa.

A partir de los resultados obtenidos se puede establecer que la bacteria crece con mayor eficiencia en tres medios UYE, UME y LB. En la Figura 3 se presentan los datos de densidades ópticas determinados para los medios UYE, UYE modificado, UME, UME9 y LB.

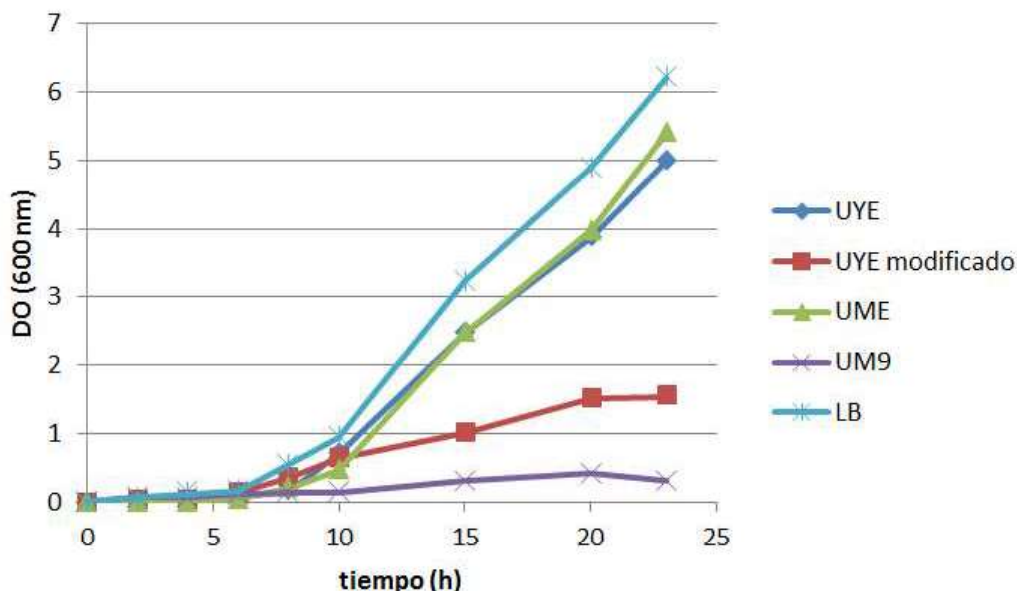


Figura 3: Curvas de crecimiento bacteriano en función del tiempo.

El medio UME9 no presenta un desarrollo del organismo adecuado para el objetivo del proyecto, razón por la cual se descarta dicho medio.

La Figura 4 muestra extendidos de la bacteria con tinción de Gram y observados en microscopio óptico con aumento de 100X (en inmersión). Es posible identificar la característica forma de bacilos y estreptobacilos (cadenas de bacilos) de este organismo, así como también las formas esporuladas resistentes a condiciones de estrés (forma de punto o círculo).

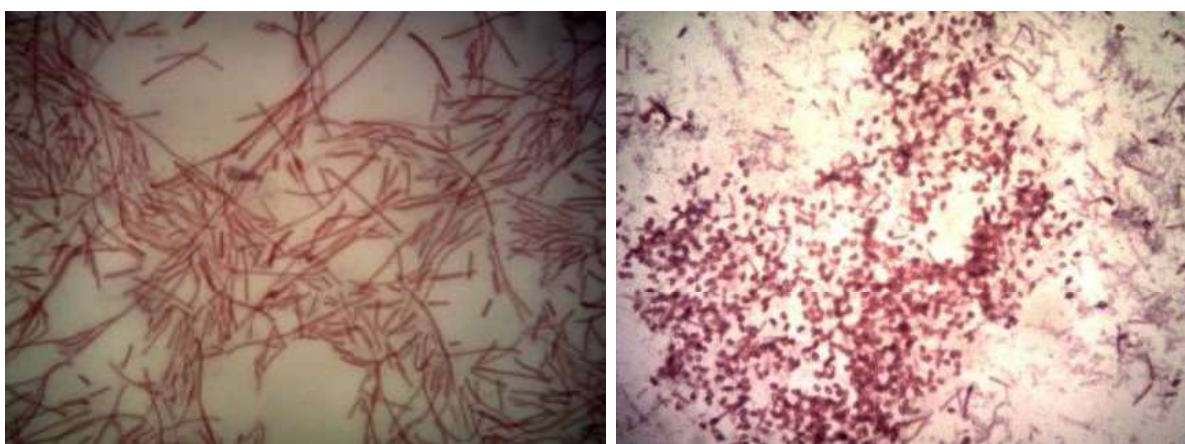


Figura 4: *Lysinibacillus sphaericus*, células vegetativas y células esporuladas

3.5. Análisis químicos y fisicoquímicos de los distintos medios

Dado el elevado nivel de cloruros que posee el medio LB en su composición, el cual supera ampliamente los niveles permitidos por la norma de requisitos de agua de amasado, se lo descarta inicialmente.

En la **Tabla 4** se muestran los valores obtenidos en los ensayos fisicoquímicos para cada medio y se los compara con los valores límites definidos por norma [9].

Tabla 4. Comparativa entre los valores límites y los resultados ensayos fisicoquímicos

	Cloruros	Sulfatos	Residuo sólido	Materia orgánica	pH
UYE	1786,26 mg/L	10,50 mg/L	42510 mg/L	41038,03 mg/L	8,0
UYE MOD.	1466,34 mg/L	5,14 mg/L	27805 mg/L	27805,23 mg/L	8,5
UME	319,93 mg/L	30,46 mg/L	41938 mg/L	39727,33 mg/L	8,5
Mínimo s/ IRAM 1601					4-6
Máximo s/ IRAM 1601	4500 mg/L	2000 mg/L	50000 mg/L	3 mg/L	-

Se pudo identificar al medio de cultivo UME (a base de urea, extracto de carne y tris- base como regulador de pH), por su composición, como el que mejor se ajusta a la norma IRAM 1601 [9].

Es importante indicar que el pH de los medios estudiados está por encima de lo permitido, pero este puede ser ajustado con hidróxido de sodio de ser necesario

4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se indicaron los resultados obtenidos en la primera etapa de una investigación que tiene un abordaje multidisciplinar a una temática claramente dentro del área Ingeniería Civil. Como principales conclusiones obtenidas a partir de dichos resultados se pueden destacar:

1. Se logró realizar una caracterización fenotípica del microorganismo, con el cual se inducirá en morteros experimentales la precipitación de carbonato de calcio.
2. Se comprobó que la bacteria *Lysinibacillus sphaericus* produce ureasa, fundamental en nuestro proyecto para desdoblar urea y generar carbonatos en medio alcalino.
3. Se analizaron distintos medios de cultivos y en base a su composición y a los análisis químicos y fisicoquímicos realizados se puede concluir que:
4. El medio mínimo (UM9) suplementado con urea no presenta un nivel aceptable de desarrollo de la bacteria.
5. La bacteria creció eficientemente en el medio LB, pero este supera los niveles de cloruro permitidos por norma.
6. El medio UME es el óptimo para emplearse como agua de amasado, ya que en dicho medio el microorganismo mejor se desarrolla, cumpliendo a su vez los requisitos de la norma IRAM 1601:2012,, que define la calidad que debe tener el agua de amasado.
7. Se confirmó que el microorganismo en estudio es capaz de inducir la formación de cristales de carbonato de calcio.

Como trabajo a futuro se propone evaluar la influencia del medio UME y la adición de baterías a la pasta de cemento.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Bauerlein, E. *Bio-mineralization of unicellular organisms: an unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures*. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* (2003). 42, 614-641.
- [2] Samani, A.K., Berenjian, A. *Bioconcrete: next generation of self-healing concrete*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2016). 100, 2591-2602.
- [3] Tiano, P., Biagiotti, L., Mastromei, G. *Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation*. *J. Microbiol. Methods.* (1999). 36, 139-145.
- [4] Hammes, F., Boon, N., Verstraete, W., Siciliano, S.D. *Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation*. *Appl. Environ. Microbiol.* (2003). 69, 4901-4909.
- [5] Rivadeneyra, M.A., Ramos-Cormenzana, A., Delgado, G., Delgado, R. *Process of carbonate precipitation by Deleya halophila*. *Curr. Microbiol.* (1996). 32, 308-313.
- [6] Rivadeneyra, M.A., Parraga, J., Delgado, R., Ramos-Cormenzana, A. *Bio-mineralization of carbonates by Halobacillus trueperi in solid and liquid media with different salinities*. *Fems Microbiol Ecol.* (2004). 48, 39-46.
- [7] Rivadeneyra, M.A., Martin-Algarra, A., Sanchez-Roman, M., Sanchez-Navas, A., Martin-Ramos, J.D. *Amorphous Ca-phosphate precursors for Ca-carbonate biominerals mediated by Chromohalobacter marismortui*. *ISME J.* (2010). 4, 922-932.
- [8] Sanchez-Roman, M., Rivadeneyra, M.A., Vasconcelos, C., Mc Kenzie, J.A. *Bio-mineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria*. *FEMS Microbiol, Ecol.* (2007). 61, 273-284.
- [9] Norma IRAM 1601. *Agua para morteros y hormigones de cemento*. Edición 3 del 1/8/2012.
- [10] Ezraty, B., Henry, C., Herisse, M., Denamur, E., Barras, F. *Commercial lysogeny broth culture media and oxidative stress: a cautious tale*. *Free Radic Biol Med.* (2014). 74, 245-251. Seifan, M.,
- [11] Williams, S.L., Kirisits, M.J., Ferron, R.D. *Optimization of growth medium for Sporosarcina pasteurii in bio-based cement pastes to mitigate delay in hydration kinetics*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2016). 43, 567-575.
- [12] Rhee, J.I., Bode, J., Diaz-Ricci, J.C., Poock, D., Weigel, B., Kretzmer, G., Schugler, K. *Influence of the medium composition and plasmid combination on the growth of recombinant Escherichia coli JM109 and on the production of the fusion protein ecori::spa*. *J. Biotechnol.* (1997). 55, 69-83.

6. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Tecnológica Nacional por financiar este proyecto (ECUTIFE0004367TC) y al CECOVI (FRSF-UTN) por brindar los medios tecnológicos para realizar nuestra propuesta.