



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS:

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS PRECIPITADORAS
DE CARBONATO CÁLCICO AISLADAS DE SUELOS UREICOS Y CALCÁREOS
DE LA PROVINCIA DE CAJAMARCA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

PRESENTADO POR:

Bach. LENIN RAÚL CABRERA YÉPEZ

ASESOR:

Dr. Mblgo. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

CO-ASESOR:

Mto. Mblgo. OMAR DANIEL PAIRAZAMÁN QUIROZ

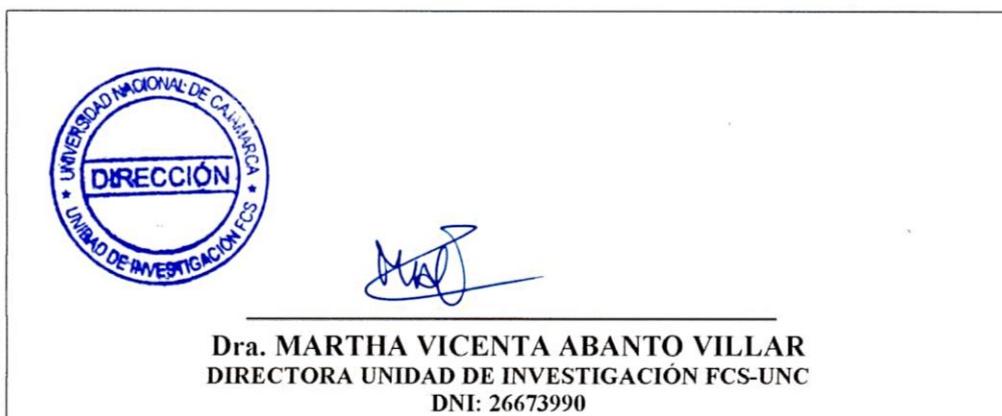
CAJAMARCA – PERÚ

2025

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador: **Lenin Raúl Cabrera Yépez**
DNI: 74022442
Escuela Profesional: Biología y Biotecnología
2. Asesor: **Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto**
Facultad: Ciencias de la Salud
3. Grado académico o título profesional
 Bachiller **Título profesional** Segunda especialidad
 Maestro Doctor
4. Tipo de Investigación:
Tesis Trabajo de investigación Trabajo de suficiencia profesional
 Trabajo académico
5. Título de Trabajo de Investigación: "CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS PRECIPITADORAS DE CARBONATO CÁLCICO AISLADAS DE SUELOS UREICOS Y CALCÁREOS DE LA PROVINCIA DE CAJAMARCA"
6. Fecha de evaluación: 06/02/2025
7. Software antiplagio: **TURNITIN** URKUND (OURIGINAL) (*)
8. Porcentaje de Informe de Similitud: 16 %
9. Código Documento: Identificador de reporte de similitud: oid:::3117:427192435
10. Resultado de la Evaluación de Similitud:
 APROBADO **PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO**

Cajamarca, 06 de febrero del 2025



* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

Copyright ©

CABRERA YÉPEZ LENIN RAÚL

Todos los derechos reservados

iii

FICHA CATALOGRÁFICA

Cabrera, L. 2024. **Caracterización microbiológica de bacterias precipitadoras de carbonato cálcico aisladas de suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca** / Cabrera Yépez, Lenin Raúl.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-Asesor: Mto. Mblgo. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo UNC - 2024

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS
PRECIPITADORAS DE CARBONATO CÁLCICO AISLADAS DE SUELOS
UREICOS Y CALCÁREOS DE LA PROVINCIA DE CAJAMARCA**

AUTOR: Bachiller Lenin Raúl Cabrera Yépez

ASESOR: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

CO-ASESOR: Mto. Mblgo. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

Tesis evaluada y aprobada para la obtención de título profesional de Biólogo Biotecnólogo en la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados:

JURADO EVALUADOR



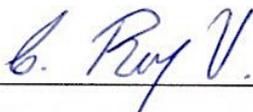
Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado

Presidente



Dr. Ronald Fernando Zelada Mazmela

Secretario



Dra. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Vocal

Cajamarca, 2025 - Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 04:08 pm del 04 de febrero del 2025, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente II-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS PRECIPITADORAS DE CARBONATO CÁLCICO DISLAPAS DE SUELOS UREICOS Y CALCÁREOS DE LA PROVINCIA DE CAJAMARCA

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Lenin Raúl Cabrera Yépez

Siendo las 05:46 pm del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: MUY BUENO, con el calificativo de 18, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra APTO para la obtención del Título Profesional de: BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.

Table with 2 columns: Miembros Jurado Evaluador (Nombres y Apellidos) and Firma. Rows include Presidente (Dra. Consuelo Belarica Plasencia Alvarado), Secretario(a) (Dr. Ronald Fernando Zelada Yáñez), Vocal (Dra. Claudia Carolina Rodríguez Vilca), Accesitaria, Asesor (a) (Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto), and Asesor (a) (Mtro. Omar Daniel Panopuón Quing).

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

MUY BUENO (17-18)

BUENO (14-16)

REGULAR (12-13)

REGULAR BAJO (11)

DESAPROBADO (10 a menos)

A:

Dios por brindarme sabiduría e inteligencia, y darme a conocer el camino que debo seguir. A mis padres y abuelos por su amor incondicional y el apoyo que me brindaron para seguir luchando por mis metas.

“La poca ciencia te aleja de Dios, pero mucha ciencia te acerca a Él”

- Louis Pasteur -

Agradecimiento:

Agradezco a Dios por guiarme en cada momento de mi vida, por darme la fortaleza necesaria para afrontar cada desafío superado, y así lograr culminar esta etapa importante de mi vida. A la Universidad Nacional de Cajamarca por brindarme la oportunidad de participar en mi formación académica y proporcionarme las herramientas necesarias para desarrollar mis habilidades a lo largo de la carrera profesional.

Dios en su misericordioso amor me sigue mostrando que emplea a las personas como instrumentos para contribuir en mi formación personal en todo aspecto; como a mis padres, abuelos y mi familia, a quienes agradezco por brindarme su apoyo en todo momento, a mi compañera de vida por el apoyo brindado y formar parte de mi vida; y a cada persona que se involucró en el desarrollo personal de mi vida.

Al Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto, mi asesor de tesis, y co-asesor Mto.Mblgo Omar Pairazamán Quiroz, por su paciencia, su invaluable apoyo, orientación y guiarme con sus comentarios constructivos, que han sido fundamentales para la realización y el éxito de este trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
Lista de abreviaciones	xv
Glosario	xvi
Resumen	xviii
Abstract.....	xix
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes:	3
2.2. Bases teóricas:	6
2.2.1. Bacterias de suelo que precipitan CaCO ₃	6
2.2.2. Biomineralización	11
2.2.3. Mecanismos en la precipitación de CaCO ₃	11
2.2.4. Mecanismos en la precipitación de CaCO ₃ por bacterias no ureolíticas	15
2.2.5. Nucleación.....	17
2.2.6. Fuentes de calcio	17
2.2.7. Mineral que permite el sellamiento	18
2.2.8. Factores que afectan la eficiencia de MICP	19
2.2.9. Materias primas de concreto	24
2.2.10. Determinación de la precipitación de CaCO ₃	26
2.2.11. Solución bacteriana	27
2.2.12. Prueba de precipitación de CaCO ₃	29
2.2.13. Extracción y cuantificación de CaCO ₃	30
2.2.14. Métodos y pruebas de identificación bioquímica de bacterias precipitadoras de CaCO ₃	30
CAPÍTULO III.....	33

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	33
3.1. Nivel de investigación	33
3.2. Tipo y diseño de estudio	33
3.3. Material biológico	34
3.4. Área de estudio o lugar de muestreo	34
3.5. Colecta de muestras	35
3.6. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	36
3.7. Técnicas de Procesamiento y análisis de datos	42
CAPÍTULO IV	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
CAPÍTULO V.....	67
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
Referencias Bibliográficas	69
Apéndices	83
Apéndice N° 1. Ficha de toma de muestra del Suelo agrícola de la Universidad Nacional de Cajamarca.....	83
Apéndice N° 2. Ficha de toma de muestra del Suelo agrícola del Jardín Las Hortensias.....	84
Apéndice N° 3. Ficha de toma de muestra del Suelo calcáreo de la Cantera de Namora.	85
Apéndice N° 4. Cubos de láminas cubreobjetos para su uso en cubos de concreto.	85
Apéndice N° 5. Metodología para el aislamiento, caracterización y aplicación de bacterias precipitadoras de CaCO ₃ en el sellado de fisuras de concreto.	86
Apéndice N° 6. Visualización de esporas durante la preparación de la solución de esporas de bacterias esporuladas.	87
Apéndice N° 7. Resultados de identificación bioquímica en el ABIS online.....	88
Apéndice N° 8. Medición de fisuras de concreto con fisurómetro.....	89
Margen de error (± 0.05)	89
Apéndice N° 9. Comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé entre las especies en el tratamiento con solución vegetativa.....	90
Apéndice N° 10. Comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé entre las especies	

en el tratamiento con solución de esporas.....	91
Apéndice N° 11. Comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé entre los grupos experimentales en el tratamiento con solución vegetativas.....	92
Apéndice N° 12. Comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé entre los grupos experimentales en el tratamiento con solución de esporas.....	93
Apéndice N° 13. Prueba de muestras emparejadas en los grupos experimentales en el tratamiento con solución vegetativa de bacterias precipitadoras de CaCO ₃	94
Apéndice N° 14. Prueba de muestras emparejadas en los grupos experimentales en el tratamiento con solución de esporas de bacterias precipitadoras de CaCO ₃	95
Anexos.....	96
Anexo N° 1. Aspectos más comunes de las diversas colonias microbianas en medio sólido (Fernández Rosas et al. 2013).....	96
Anexo N° 2. Procedimiento de la coloración Gram.....	97
Anexo N° 3. Procedimiento de la coloración de esporas.....	98

Lista de Tablas:

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para cada especie bacteriana en el aislamiento de bacterias precipitadoras de CaCO ₃	21
Tabla 2. Tiempo de regeneración en cada especie bacteriana y tipo de concreto utilizado.....	21
Tabla 3. Descripción de los suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca.....	34
Tabla 4. Distribución de los grupos control con sus materiales requeridos tanto para la preparación de la mezcla de concreto como para el tratamiento de fisuras.....	40
Tabla 5. Pruebas estadísticas realizadas en el programa IBM SPSS Statistics versión 25 para análisis de datos.....	43
Tabla 6. Características de los suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca de donde se obtuvieron las muestras.....	44
Tabla 7. Medias de las fisuras en el pretratamiento (día 1) y postratamiento (día 45) en concreto por bacterias precipitadoras de CaCO ₃	47
Tabla 8. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de bacterias	

precipitadoras de CaCO ₃	52
Tabla 9. Características microscópicas y bioquímicas de bacterias precipitadoras de CaCO ₃	52
Tabla 10. Identificación de bacterias precipitadoras de CaCO ₃ en el software ABIS online (Apéndice N° 7).....	53
Tabla 11. Pruebas de efectos inter-sujetos, con variable dependiente el sellamiento (mm), en tratamiento con solución vegetativa/esporas	55
Tabla 12. Comparación del control negativo con las especies mediante la prueba de T de Dunnett (bilateral) ^a con variable dependiente el sellamiento (mm), en tratamiento con solución vegetativa/esporas.....	56
Tabla 13. Resumen de comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé* entre las especies y el control negativo con tratamiento de solución vegetativa y solución de esporas.	56
Tabla 14. Resumen de comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé entre los grupos experimentales con tratamiento de solución vegetativa (Apéndice N° 11) y solución de esporas (Apéndice N° 12).....	57
Tabla 15. Resumen de prueba de muestras emparejadas en los grupos experimentales en el tratamiento con solución vegetativa de bacterias precipitadoras de CaCO ₃	58
Tabla 16. Resumen de prueba de muestras emparejadas en los grupos experimentales en el tratamiento con solución de esporas de bacterias precipitadoras de CaCO ₃	59
Lista de figuras:	
Figura 1. Generación de CaCO ₃ en suelos calcáreos (Comadran <i>et al.</i> , 2022)	9
Figura 2. Clasificación de los procesos de biomineralización de CaCO ₃ encontrados en bacterias. Los hexágonos grises representan los precipitados de CaCO ₃ (Görge <i>et al.</i> , 2020).....	13
Figura 3. Estructuras polimorfas del CaCO ₃ (Rojas, 2008).....	18
Figura 4. Autorreparación después de 100 días de inmersión en agua a) Cubo con un ancho de grieta de 0,1 mm antes del curado b) Curación completa de un ancho de grieta de 0,1 mm después de 100 días de curado (Lakshmi <i>et al.</i> , 2016).....	23
Figura 5. Ubicación geográfica de los 3 puntos de muestreo de los suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca, de los cuales se obtuvieron las bacterias precipitadoras de CaCO ₃ ..	35

Figura 6. Evaluación de la precipitación de CaCO ₃ de bacterias en medio sólido B4 a nivel macroscópico.	45
Figura 7. Producción de CaCO ₃ por las especies bacterianas en medio líquido B4.	46
Figura 8. Sellamiento de fisuras en concreto por bacterias precipitadoras de CaCO ₃	47
Figura 9. Porcentajes de sellamiento de fisuras en concreto por bacterias precipitadoras de CaCO ₃ . *SV: Solución de células vegetativas, SE: Solución de esporas.....	48
Figura 10. Porcentajes de sellamiento de fisuras en bioconcreto 1 por bacterias precipitadoras de CaCO ₃ . *SV: Solución de células vegetativas, SE: Solución de esporas.....	48
Figura 11. Porcentajes de sellamiento de fisuras en bioconcreto 2 por bacterias precipitadoras de CaCO ₃ . *SV: Solución de células vegetativas, SE: Solución de esporas.....	49
Figura 12. Porcentajes de sellamiento de fisuras en bioconcreto 3 por bacterias precipitadoras de CaCO ₃ *SV: Solución de células vegetativas, SE: Solución de esporas.....	50
Figura 13. Características macroscópicas y microscópicas de bacterias precipitadoras de CaCO ₃ provenientes de suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca	51
Figura 14. Diagrama de cajas agrupado de sellamiento de fisuras por especie por grupo experimental – Tratamiento con solución vegetativa	53
Figura 15. Diagrama de cajas agrupado de sellamiento de fisuras por especie por grupo experimental – Tratamiento con solución de esporas	54

Lista de abreviaciones

HCl _(aq)	: Ácido clorhídrico
ABIS	: Advanced Bacterial Identification Software (Software avanzado de identificación bacteriana)
NH ₃	: Amoníaco
NH ₄	: Amonio
CA	: Anhidrasa carbónica
UPB	: Bacterias productoras de ureasa
CaCO ₃	: Carbonato cálcico
DIC	: Carbono inorgánico disuelto
CaCl ₂	: Cloruro de calcio
NaCl	: Cloruro de sodio
NaOH	: Hidróxido de sodio
IBM SPSS Statistics:	Statistical Package for the Social Sciences (Paquete estadístico para las ciencias sociales)
Ca ²⁺	: Ion calcio
CO ₃ ²⁻	: Ion carbonato
HCO ₃ ⁻	: Ion carbonato de hidrógeno
OH ⁻	: Ion hidróxido
LB	: Luria Bertani
MnSO ₄ H ₂ O	: Monohidrato de sulfato de manganeso
MICP	: Precipitación microbiológicamente inducida
rpm	: Revoluciones por minuto
SV	: Solución de células vegetativas
SE	: Solución de esporas
LPS	: Sustancias poliméricas extracelulares

Glosario

Bioconcreto: Compuesto que se produce a partir de una mezcla del concreto convencional con un cierto porcentaje de alguna especie bacteriana en forma de solución bacteriana. Esta especie bacteriana de alguna forma modifica las propiedades mecánicas del material, al aumentar o disminuir en cierta proporción estas propiedades; en efecto esta variación dependerá de la especie bacteriana y la concentración de la misma en la mezcla del material (Hernández *et al.*, 2022)

Polimorfismo del CaCO_3 : Propiedad de la materia donde la estructura cristalina del CaCO_3 le permite cambiar de más de una forma o estructura cristalina, sin variar su naturaleza, simultáneamente manteniéndose así la misma fórmula molecular (Di Salvo y Suárez 2020). En este contexto, el CaCO_3 posee tres fases polimórficas: la calcita, la aragonita y la vaterita; ordenados de esta manera dado su estabilidad termodinámica (Rojas, 2008).

Sitio de nucleación: Lugar donde se comienza a formar un cristal, como es el CaCO_3 (Stuckrath *et al.*, 2017).

Sobresaturación: Estado termodinámico que ilustra la concentración de solutos en una solución que supera el límite de equilibrio, del mismo modo permite la estabilidad de la fase disuelta. En la precipitación de CaCO_3 , la sobresaturación muestra que la cantidad de iones Ca^{2+} y CO_3^{2-} supera a la concentración que se necesita para mantenerlos disueltos, de esta forma favorece así la formación de CaCO_3 (Ruíz, 2020).

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE BACTERIAS
PRECIPITADORAS DE CARBONATO CÁLCICO AISLADAS DE SUELOS
UREICOS Y CALCÁREOS DE LA PROVINCIA DE CAJAMARCA**

Resumen

En esta investigación se caracterizó microbiológicamente a bacterias precipitadoras de carbonato cálcico (CaCO_3) aisladas de suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca. Se obtuvo 28 aislamientos provenientes de 5 puntos de muestreo previstos, evaluados en medio sólido Luria Bertani alcalino y en medio sólido B4, se observó que 5 aislamientos de los 28 obtenidos, lograron precipitar CaCO_3 en medio B4, confirmándose la presencia de CaCO_3 mediante su efervescencia al reaccionar con $\text{HCl}_{(aq)}$. Los 5 aislados provinieron del suelo agrícola de la UNC, del jardín de Las Hortensias, además del suelo y roca calcáreos de la cantera de Namora; se caracterizaron a nivel macroscópico y microscópico mediante las técnicas de microbiología, identificándose a las especies como *Bacillus thuringiensis* (96,20 %), *Bacillus acididcele* (86,40 %), *Bacillus subtilis* (75,40 %), *Bacillus simplex* (79,90 %) y *Bacillus gelatini* (82,7 %) en ABIS online con estos porcentajes de similitud. Durante 15 días se cuantificó el CaCO_3 producido por las 5 bacterias en medio líquido B4, donde *B. thuringiensis* produjo 0,047 g/2 mL de CaCO_3 , destacándose de entre las demás bacterias. Se diseñó 4 grupos experimentales tales como concreto, bioconcreto 1, bioconcreto 2 y bioconcreto 3 incluyéndose también el control negativo, con el objetivo de comparar el sellamiento producido en los diferentes grupos experimentales durante 45 días de tratamiento. Este tratamiento se realizó a la fisura de los cubos de concreto con solución vegetativa para cada una de las 5 especies bacterianas, y con solución de esporas para *B. thuringiensis* y *B. gelatini*, *B. thuringiensis* se destacó en ambos tratamientos, donde en el grupo experimental de concreto fue más significativo el tratamiento con solución vegetativa, mientras que para el tratamiento con solución de esporas resaltó más el grupo experimental de bioconcreto 3 ($p < 0,05$). Concluyéndose que *B. thuringiensis* tiene un mejor rendimiento en el sellamiento de fisuras en concreto.

Palabras clave: Bioprecipitación, carbonato cálcico, bioconcreto, *Bacillus*.

Abstract

In this research, calcium carbonate (CaCO_3) precipitating bacteria isolated from urea and calcareous soils in the province of Cajamarca were microbiologically characterized. 28 isolates were obtained from 5 planned sampling points, evaluated in alkaline Luria Bertani solid medium and in B4 solid medium. It was observed that 5 of the 28 isolates obtained were able to precipitate CaCO_3 in B4 medium, confirming the presence of CaCO_3 by its effervescence when reacting with $\text{HCl}_{(aq)}$. The 5 isolates came from the agricultural soil of the UNC, from the Las Hortensias garden, in addition to the calcareous soil and rock of the Namora quarry; They were characterized at macroscopic and microscopic level using microbiology techniques, identifying the species as *Bacillus thuringiensis* (96,20 %), *Bacillus acidicele* (86,40 %), *Bacillus subtilis* (75,40 %), *Bacillus simplex* (79,90 %) and *Bacillus gelatini* (82,7 %) in ABIS online with these similarity percentages. For 15 days the CaCO_3 produced by the 5 bacteria was quantified in liquid medium B4, where *B. thuringiensis* produced 0,047 g/2 mL of CaCO_3 , standing out among the other bacteria. 4 experimental groups were designed such as concrete, bioconcrete 1, bioconcrete 2 and bioconcrete 3 also including the negative control, with the aim of comparing the sealing produced in the different experimental groups during 45 days of treatment. This treatment was carried out on the fissure of the concrete cubes with a vegetative solution for each of the 5 bacterial species, and with a spore solution for *B. thuringiensis* and *B. gelatini*. *B. thuringiensis* stood out in both treatments, where in the experimental group of concrete the treatment with a vegetative solution was more significant, while for the treatment with a spore solution the experimental group of bioconcrete 3 stood out more ($p < 0,05$). Concluding that *B. thuringiensis* has a better performance in sealing cracks in concrete.

Keywords: Bioprecipitation, calcium carbonate, bioconcrete, *Bacillus*.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la industria de la construcción enfrenta múltiples desafíos debido al tipo de materiales utilizados. Materiales como el concreto son susceptibles a la formación de fisuras que dificultan su vida útil y su resistencia estructural (Chen *et al.*, 2019). Muchos de los métodos tradicionales utilizados para la reparación de las fisuras en concreto incluyen el uso de resinas epoxi además de otros químicos, los cuales generan daño tanto al medio ambiente por sus emisiones de gases de efecto invernadero, como a la salud de las personas que están en contacto con estos materiales de construcción sin las precauciones debidas (Valderrama *et al.*, 2019).

En los últimos años, se ha buscado soluciones innovadoras para estos problemas que se presentan a diario. Gracias a la biotecnología se han estudiado y evaluado diversas alternativas, como la precipitación microbiológicamente inducida (MICP), donde los microorganismos precipitan CaCO_3 como producto de la relación entre el metabolismo microbiano y su entorno (Hammes & Verstraete, 2002); aquel proceso es aprovechado para sellar las fisuras en concreto, considerándose una solución autorreparable capaz de reducir tanto los costos de mantenimiento como la emisión de los gases de efecto invernadero (Chaparro *et al.*, 2018).

Aquellos microorganismos partícipes de la MICP, como *Bacillus megaterium* y *Bacillus sphaericus* (Whitaker *et al.*, 2018), son conocidos por su capacidad de precipitar CaCO_3 , además de poseer una naturaleza no patógena, convivir en entornos alcalinos y formar esporas (Agereh *et al.*, 2019). Estos atributos permiten a estas bacterias sobrevivir por

periodos prolongados en el concreto, considerándose aptas para el tratamiento de fisuras en concreto y proponerse como alternativas ecológicas (Águila, 2023).

En este ámbito, la región de Cajamarca presenta una gran diversidad de suelos, que se consideran como el hábitat ideal para bacterias con potencial biotecnológico. Sin embargo, se cuenta con información limitada sobre estas comunidades microbianas y, por ende, no se logra aprovechar su potencial en la biomineralización. Por ello, en el presente estudio se ha tenido en consideración la importancia del uso de estas bacterias en la biomineralización, al tener como objetivo principal la caracterización microbiológica de bacterias precipitadoras de CaCO_3 aisladas de suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca. Los resultados contribuirán al desarrollo de materiales de construcción más ecológicos y duraderos, mediante la aplicación de los procesos microbiológicos implicados en la biomineralización, de esta manera se fortalecería la integración entre la microbiología, la biotecnología y la ingeniería civil.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes:

En Malasia, Ahmad *et al.* (2023) realizaron un estudio donde utilizaron muestras de suelo del Zoológico de Johor para aislar bacterias ureolíticas. Para ello se disolvió 1 g de suelo en 10 mL de agua destilada, y 1 mL de dicha disolución se inoculó en caldo nutritivo suplementado con concentraciones de urea entre 0-20 %. Luego se incubó a 37 °C durante 24 horas, y se sembró en placas de agar nutritivo para su posterior análisis. Para determinar la actividad ureolítica, ellos utilizaron el medio de Christensen suplementado con urea en un rango de concentraciones de 0 a 40 %. Finalmente se logró aislar la cepa Ball19 identificada como *Kurthia zopfii*, la cual precipitó 1,23 g de biocemento (vaterita con tamaños que varían de 5 a 15 µm) cuando se complementó con el agua de mar como fuente de calcio.

En Hungría, Enyedi *et al.* (2020) realizaron un estudio en el cual se aislaron tres bacterias heterótrofas cultivables de muestras de agua de los espeleotemas de la cueva de Baradla. Se utilizó el medio B4, el cual tiene en su composición acetato de calcio (2,5 g/L), glucosa (5 g/L), extracto de levadura (4 g/L) y agar-agar (20 g/L); el pH del medio fue ajustado a 7,5 y la temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias fue de 21 °C. Las muestras se inocularon de 3 formas cruzadas paralelas y las placas se sellaron con parafilm para evitar la deshidratación rápida. Las bacterias aisladas se inocularon por triplicado en 5 mL de medio B4 líquido y se incubó por un tiempo determinado; finalmente, se examinó por microscopía óptica la presencia de precipitados. Se obtuvo tres bacterias que precipitaron CaCO₃, éstas fueron *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhodococcus*

degradans y *Bacillus simplex*, las cuales formaron precipitados visibles de 200 a 500 μm de diámetro a lo largo de los bordes y dentro de las colonias. En el caso de *S. maltophilia* y *R. degradans*, las colonias enteras se calcificaron después de 26 semanas de incubación cuando se desecaron por completo. Sin embargo, en *B. simplex* BaSD-223 los cristales aparecieron sólo en la parte central de las colonias.

En Malasia, Amer *et al.* (2020) evaluaron la función del CaCO_3 microbiano y los factores implicados en la autocuración del hormigón; para ello utilizaron muestras de suelo de la Universiti Teknologi Malaysia, de donde se aisló *Lysinibacillus sphaericus*. Utilizaron 25 mL del medio de enriquecimiento LB/g de muestra, evaluaron el crecimiento bacteriano y los factores que influyen en la evolución de la hidrólisis de la urea. Los resultados mostraron que las bacterias sobreviven en estado latente sin reproducción alguna a un pH de 12 a 13, sin embargo, el crecimiento óptimo se desarrolla en un pH de 9, concentración de iones calcio no superior a 150 mM, concentración de urea de 333 mM y concentración celular de 2×10^8 células/mL. Esto demuestra la capacidad de las bacterias ureolíticas para curar fisuras de hasta 0,97 mm en 8 semanas de inmersión en agua.

En Pakistán, Khan *et al.* (2020) obtuvieron muestras de rocas carbonatadas y de naturaleza sedimentaria de Murree Hills, en la cordillera del Himalaya; suspendieron las muestras en solución salina estéril, diluyeron e inocularon en medio de precipitación de CaCO_3 (PCC) que contenía 20 g/L de urea, 2,12 g/L de NaHCO_3 , 10 g/L de NH_4Cl , 3 g/L de caldo nutritivo, 30 mM CaCl_2 , pH 8,5 y 20 g/L de agar, posteriormente se incubó a 28 °C durante 7 días. Finalmente identificaron 4 bacterias, dos *Acinetobacter* sp., *Bordetella* sp. y *Brevundimonas* sp. Estas bacterias presentaron actividad ureolítica favoreciéndose la precipitación CaCO_3 en un entorno alcalino. Cabe indicar que *Brevundimonas* sp. resaltó

por un rápido crecimiento bacteriano, formación de cristales de carbonato y mayor actividad de ureasa que las otras cepas.

En Guatemala, Heredia (2019), a partir de muestras de suelo extraídas de la cantera de Cementos Progreso ubicada en Sanarate, inoculó 10 g de muestra en 90 mL de caldo tripticasa soya con 1 % de urea (600 mL de caldo tripticasa soya fue suplementado con 1 % de urea), luego se diluyó en 9 mL del mismo caldo a pH de 8, después se incubó en agitación leve a 37 °C durante 24 horas. Para evaluar la precipitación de CaCO₃ se añadió 9 mL de caldo nutritivo con 2 % de urea y CaCl₂ en tubos cónicos de 15 mL. Finalmente se lograron identificar 11 cepas bacterianas, de las cuales 8 pertenecieron al género *Bacillus* con capacidad de producir CaCO₃ y se comparó la productividad que tiene cada una de ellas, tanto en un medio comercial, como en un medio formulado a base de desechos industriales para tratar microgrietas de concreto en un medio controlado.

En Noruega, Røyne *et al.* (2019) plantearon un nuevo proceso en el cual el CaCO₃ en forma de piedra caliza en polvo se transforma en un material aglutinante, llamado BioZement, mediante disolución microbiana y recristalización. Para la disolución, se aisló *Bacillus pumilus* del suelo de una cantera abierta de CaCO₃ en Tromsdalen, y se cultivó tanto en medio líquido y sólido, el pH del medio fue 9,5 y contenía 1,0 g/L de extracto de levadura, 3,0 g/L de peptona, 7,5 g/L de glucosa, 5,0 g/L de NaCl, 10,0 g/L de polvo de piedra caliza y 1,2 g/L de Na₂CO₃ y en medio sólido se utilizó 15 g/L de agar; también se añadió una solución de azul de timol de 2,5 mL/L. La evaluación de la producción de ácido microbiano se determinó por el cambio de color de azul a amarillo, eso indicó que la bacteria produjo ácidos orgánicos a partir de glucosa e indujo la disolución del CaCO₃ en la suspensión acuosa de piedra caliza en polvo. Tanto las

cantidades de ácido producido y CaCO_3 disuelto dependen de la cantidad de oxígeno disponible, así como del grado de mezcla. Asimismo, la precipitación se indujo mediante el aumento del pH provocado por la hidrólisis de la urea, mediada por la enzima ureasa.

En Lima - Perú, Santos (2021) evaluó la formación de bioconcreto para reparar agrietamientos en los decantadores de la planta de tratamiento de agua con la bacteria *Bacillus subtilis*. El escalamiento se realizó con un medio de cultivo de producción, en un matraz de 1 L se agregó 500 mL de caldo nutritivo, luego se inoculó la bacteria, se incubó a 30 °C en agitación a 200 rpm durante 18 horas. Este producto fue el inóculo para 5 L de caldo de producción, el cual fue utilizado para la parte experimental en el estudio de concreto y se demostró que el bioconcreto autorrepara las fisuras y las grietas eficazmente, disminuyéndose el ancho en 0,20 mm por mes; en tanto que 10^9 cel/mL de *B. subtilis* es el concentrado óptimo para que las bacterias produzcan CaCO_3 y reparen las fisuras.

2.2. Bases teóricas:

2.2.1. Bacterias de suelo que precipitan CaCO_3

Las bacterias pertenecen a un grupo importante de organismos vivos unicelulares de los procariotas, los cuales son omnipresentes en el suelo y agua, además de ser simbioses con otros organismos. Habitualmente existen 40 millones de células bacterianas en un gramo de suelo (Wong, 2015).

En tanto así que de toda la diversidad que hay en el suelo hay ciertas bacterias que pueden precipitar CaCO_3 , forman precipitados minerales cristalinos o amorfos (polimorfismo del CaCO_3) como resultado del metabolismo microbiano en ciertas condiciones ambientales, a este proceso se llama bioprecipitación. Por ende, este proceso es objeto de estudio en

relación con su mecanismo y aplicaciones, por ello, diversos estudios demostraron que las bacterias nativas del suelo, con un pH alcalino y con disponibilidad de calcio en el ambiente, tienen la capacidad de inducir la precipitación de minerales de CaCO_3 (Valencia *et al.*, 2014).

A. Hábitat

El hábitat de las bacterias precipitadoras CaCO_3 engloba a una variedad de diversos tipos de suelos, donde su presencia y las actividades varían por las condiciones específicas de cada tipo de suelo, entre estos tenemos:

– Suelos ureicos

Se hace referencia al tipo de suelo caracterizado por un alto contenido de urea, debido a factores ambientales que se determinan alrededor del hábitat. La presencia de urea en el suelo agrícola, se debe en su mayoría a la utilización de fertilizantes nitrogenados y a la descomposición de la materia orgánica; la materia orgánica descompuesta por acción microbiana resulta en aminoácidos mediante la aminización, a partir de ahí se desarrolla la amonificación al convertirse los aminoácidos en amoníaco y amonio, estos productos posteriormente se convierten en urea mediante el metabolismo microbiano (Shaheen *et al.*, 2021). En cuanto a los suelos con estiércol considerados para nuestro estudio, se caracteriza por el metabolismo del nitrógeno en las vacas, al excretar urea mediante las heces (Agroenlace 2024).

Asimismo, las bacterias ureolíticas precipitan CaCO_3 por presentar entre sus características la producción de ureasas, gracias a la presencia de la urea (fuente de carbono y nitrógeno) y calcio (formación de los cristales de CaCO_3) en el suelo, lo cual favorece que las bacterias participen en la precipitación de

CaCO_3 (Cui *et al.*, 2022). Las bacterias utilizan la urea en el ciclo del nitrógeno mediante las ureasas, la ureasa es una enzima diníquel, es decir, que esta enzima se activa con la interacción de dos átomos de níquel; se encuentra comúnmente en numerosos organismos y cataliza la hidrólisis de la urea en amoníaco (NH_3) y dióxido de carbono (CO_2). Esta enzima es esencial en el metabolismo del nitrógeno y su actividad puede ser bloqueada en ausencia de níquel. El proceso MICP mediado por bacterias productoras de ureasa (UPB) se puede utilizar para muchas aplicaciones, incluida la biorremediación ambiental, la mejora del suelo, la curación de grietas en el hormigón y el sellado de juntas de rocas (Cui *et al.*, 2022).

– **Suelos calcáreos**

Las bacterias que habitan en este tipo de suelos pueden estar implicados en la precipitación de CaCO_3 , porque los suelos calcáreos están compuestos principalmente por un alto contenido de CaCO_3 . El CaCO_3 es el principal componente de cada tipo de suelo, por eso su denominación como calcáreos, además llegan a tener pH alcalino por la presencia de CaCO_3 , esto repercute en la disponibilidad de algunos nutrientes indispensables para el crecimiento y desarrollo de plantas (Imbellone *et al.*, 2014).

Además de la acumulación secundaria de carbonatos, los suelos calcáreos contienen limo, por ende, se clasifican como calcisoles. Pese a su pH alcalino, estos suelos son aptos para las actividades agrícolas, especialmente en zonas áridas o semiáridas (Gómez, 2023). Generalmente, la generación de CaCO_3 puede estar relacionada con procesos como la neutralización, la reacción con ácido, la influencia de las prácticas agrícolas y la interacción con otras sustancias presentes en los suelos; además, la actividad de los

microorganismos ureolíticos puede tener un impacto significativo en la dinámica CaCO_3 en suelos calcáreos, tal como se describe en la figura 1 (Comadran *et al.*, 2022).

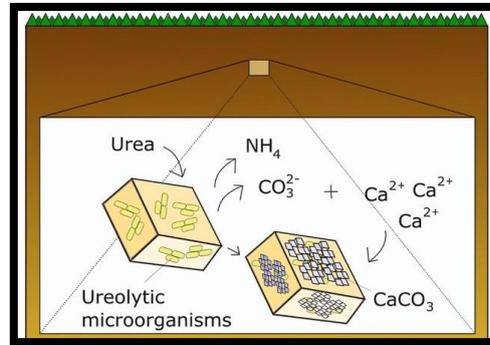


Figura 1. Generación de CaCO_3 en suelos calcáreos (Comadran *et al.*, 2022)

B. Características estructurales

Las bacterias actúan como sitios de nucleación para los cristales de CaCO_3 , porque en su pared contienen moléculas con polaridad negativa, lo cual atrae a los iones de Ca^{2+} . (Stuckrath *et al.*, 2017). Las células bacterianas desempeñan dos funciones principales en la formación de cristales de CaCO_3 , en primer lugar, actúan principalmente como sitios de nucleación en la formación de CaCO_3 ; y al descomponer la urea en la solución liberan NH_3 y OH^- , al proporcionar los componentes iónicos necesarios y el ambiente alcalino para la formación de CaCO_3 . En segundo lugar, las sustancias poliméricas extracelulares (LPS) y los grupos de iones negativos en las superficies de las células bacterianas también podrían actuar como sitios de nucleación para CaCO_3 , ya que debido a las características viscosas y de carga negativa de los LPS, pueden incorporar cationes metálicos cercanos como Mg^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} , e inducir la precipitación de CaCO_3 extracelular mediado por microorganismos, y por ende, pueden acelerar la agregación de bacterias y CaCO_3 (Chen *et al.*, 2019).

El papel fundamental de las bacterias es que su pared celular sirve como plantilla para la

precipitación inducida por el CaCO_3 , lo que enfatiza que el MICP está estrechamente relacionada con la estructura de la superficie y la composición química de la pared celular bacteriana. Cuando los componentes de las paredes celulares de las gram positivas (ácido teicoico) y de las gram negativas (lipopolisacáridos), están cargados negativamente, se da una fuerte interacción entre la pared celular bacteriana y los iones metálicos, lo que resulta en la precipitación mineral. Cabe resaltar la diferencia entre las gram positivas y gram negativas, por ejemplo, *B. subtilis* presenta una pared celular que está compuesta principalmente por peptidoglicano y ácido teicoico, esto proporciona más sitios de unión de Ca^{2+} , y por lo tanto facilita la mayor formación de precipitados de CaCO_3 ; a diferencia de las gram negativas como *E. coli*, que presenta una pared celular más delgada, contiene menos peptidoglicano y carece de ácido teicoico, por lo que su composición desfavorece la precipitación de CaCO_3 . Por este motivo, las bacterias gram positivas son las más propicias para los procesos de biomineralización (Li *et al.*, 2023).

C. Bacterias precipitadoras de CaCO_3

La precipitación de cristales de CaCO_3 se da por la nucleación heterogénea de la pared celular bacteriana cuando se logra la sobresaturación. Asimismo, los cristales de CaCO_3 precipitados obtenidos como consecuencia del proceso de precipitación microbiana, actúan como aglutinante microbiológico de materiales a base de cemento en el proceso de la hidratación de la misma (Wong, 2015).

Algunas bacterias, como *B. megaterium* y *B. sphaericus*, son capaces de precipitar CaCO_3 . Por causa del uso de la CA, una enzima que es producida por estas bacterias y catalizan eficientemente la hidratación de CO_2 en presencia de calcio para formar CaCO_3 (Bansal *et al.*, 2016).

2.2.2. Biomineralización

Es aquel proceso donde los minerales se producen biológicamente a partir de células vivas, en este ámbito son los microorganismos; donde los minerales son producto del metabolismo microbiano en entornos favorables de interacción con cationes selectivos. Es también una de las interacciones minerales-microbios más importantes (Wong, 2015).

La biomineralización consta de dos categorías principales como la precipitación de carbonatos y también la de fosfatos (Zhang *et al.*, 2020). Este proceso conlleva a la formación de minerales biológicos extracelulares e intracelulares. Existen tres tipos de mineralización: mineralización influenciada biológicamente, mineralización inducida biológicamente y mineralización biológicamente controlada, tal como se esquematiza en la figura 2 (Chaparro *et al.*, 2018).

El proceso de precipitación de CaCO_3 está influenciado por cuatro factores indispensables: la concentración de Ca^{2+} , la concentración de carbono inorgánico disuelto (DIC), la disponibilidad de sitios de nucleación y el pH (Hammes y Verstraete, 2002).

2.2.3. Mecanismos en la precipitación de CaCO_3

Estos mecanismos se describen mediante una secuencia de reacción en presencia de bacterias ureolíticas, el cual incluye tres etapas distintas: desarrollo de una solución sobresaturada, nucleación en el punto de saturación crítica, y crecimiento espontáneo de cristales en los núcleos estables. La sobresaturación se produce cuando la concentración de soluto en la solución es mayor que la concentración que podría existir en equilibrio con el sólido; la nucleación en el punto de saturación crítica se refiere al proceso en el cual se forma un nuevo cristal a partir de una solución sobresaturada; y la nucleación ocurre cuando la solución alcanza un punto de saturación crítica, donde las condiciones son

propicias para la formación de un núcleo de cristal. Entonces, el proceso de biocementación se inicia con el crecimiento espontáneo de cristales en los núcleos estables de las bacterias ureolíticas (Wong, 2015).

Cabe resaltar que es importante que las bacterias sean capaces de generar suficiente enzima ureasa a través de su actividad microbiana para la precipitación de CaCO_3 . La precipitación de cristales de CaCO_3 se inicia con la hidrólisis de la urea, donde la urea se descompone por acción de la enzima ureasa, el cual llega a ser catalizador para producir NH_4 e iones CO_3^{2-} . En consecuencia, la precipitación de cristales de CaCO_3 se produce como producto de la reacción, además de los iones CO_3^{2-} liberados de la hidrólisis de la urea y los iones calcio (Ca^{2+}) liberado de una fuente de calcio, como el CaCl_2 , acetato de calcio y nitrato de calcio en calidad de las fuentes típicas de calcio (Wong, 2015).

Estas reacciones se dan bajo la influencia de factores ambientales naturales que controlan la actividad de la enzima ureasa. Porque como resultado de la función de las bacterias ureolíticas para crear un ambiente alcalino y sitios de nucleación, se activa la precipitación de CaCO_3 , permitiéndose así que los Ca^{2+} sean atraídos por los iones que están cargados negativamente en las paredes celulares bacterianas. Por consiguiente, la hidrólisis de la urea es un paso importante para promover actividad ureolítica y dar inicio a la calcificación entre las bacterias ureolíticas (Wong, 2015).

Los procesos de biomineralización de CaCO_3 observados en bacterias pueden clasificarse en tres categorías principales, descritas en la figura 2, y basadas en el grado de control biológico que los microorganismos ejercen sobre la formación mineral:

a. **Mineralización influenciada biológicamente**

Se lleva a cabo cuando las bacterias secretan de uno a más productos metabólicos, al reaccionar con los iones o compuestos del entorno, y como resultado de esta reacción se

forma el mineral como un subproducto metabólico (Chaparro *et al.*, 2018).

En este mecanismo los minerales se precipitan debido a la interacción entre el metabolismo celular bacteriano y biológico del entorno; de esta manera la producción de minerales es generado por el metabolismo de las bacterias, este proceso va a depender de las condiciones ambientales que haya en el suelo (Hituyan y Valencia, 2020).

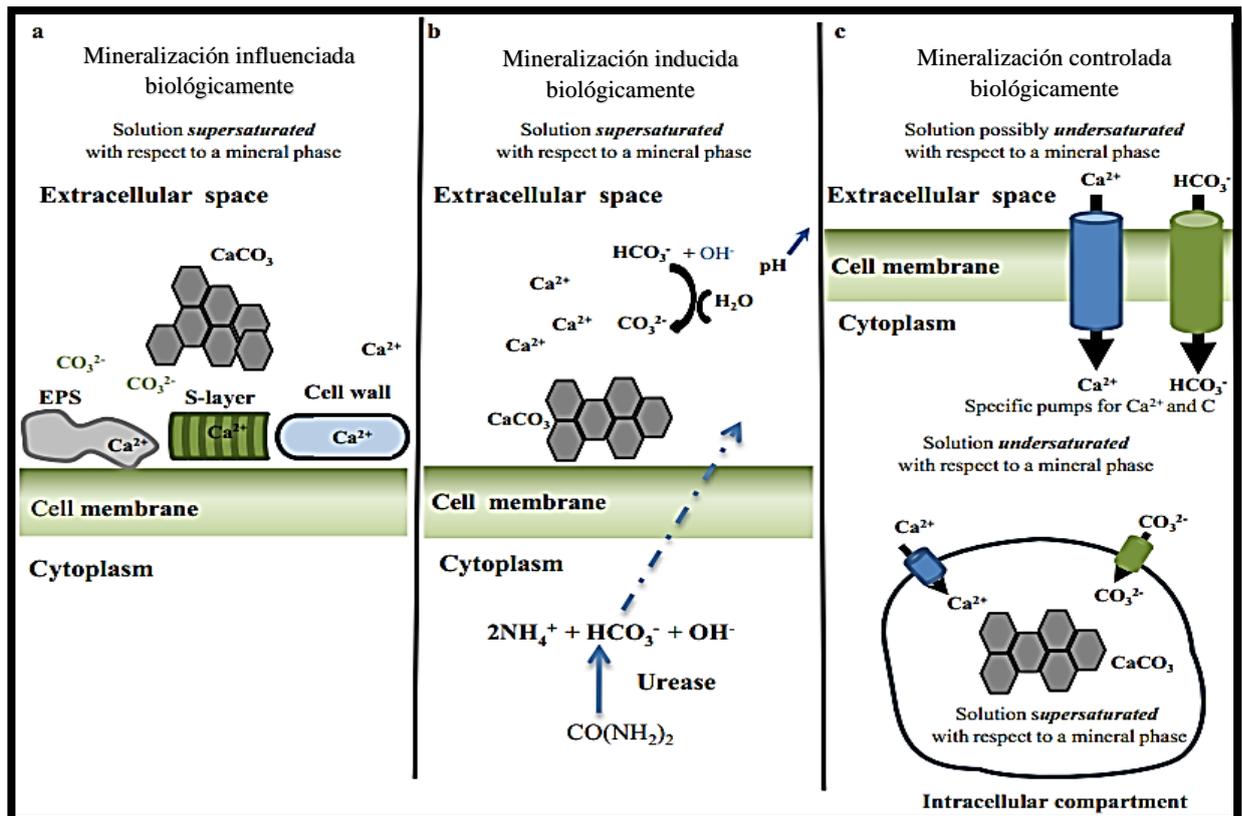
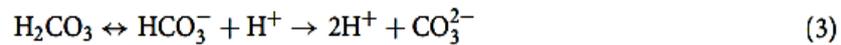
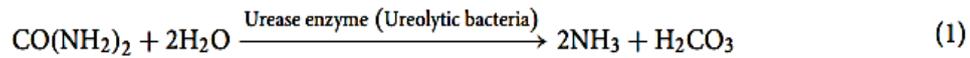


Figura 2. Clasificación de los procesos de biomineralización de CaCO_3 encontrados en bacterias. Los hexágonos grises representan los precipitados de CaCO_3 (Görgen *et al.*, 2020).

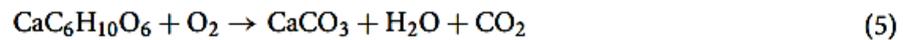
b. Mineralización inducida microbiológicamente (MICP)

Esta mineralización incluye el metabolismo microbiano y las reacciones químicas, para un proceso biológico donde reaccionan los iones CO_3^{2-} y los iones Ca^{2+} presentes en el medio externo de las bacterias, produciéndose así la precipitación de CaCO_3 , de forma simultánea también se lleva a cabo el ciclo de nitrógeno, donde se degrada la urea por la acción de la ureasa, enzima que producen las bacterias al catalizar la hidrólisis de la urea.

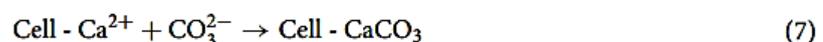
A continuación, se describen las reacciones para la formación de CaCO_3 (Hemayati *et al.*, 2023):



En MICP no ureolitica, en el interior de las bacterias, durante la respiración aeróbica o anaeróbica, los compuestos intermediarios de la oxidación completa del carbono como acetato, lactato, citrato, succinato, oxalato, malato y glioxilato; se asocian al calcio y son fundamentales para el proceso de nucleación favoreciéndose la disociación del calcio y formándose las sales de CaCO_3 , en presencia de lactato de calcio como fuente de carbono e iones calcio, este proceso se presenta en esta ecuación:



En el proceso MICP, las bacterias proporcionan sitios de nucleación que son importantes para la precipitación del CaCO_3 ; debido a que la superficie de las bacterias está cargada negativamente, al actuar como adsorbentes de cationes divalentes como los iones de calcio. Este mecanismo de adsorber iones de calcio a una concentración necesaria de iones CO_3^{2-} se realiza la reacción entre el catión y el anión, como el Ca^{2+} y el CO_3^{2-} teniéndose como producto el CaCO_3 precipitándose en la superficie de las bacterias. Esta reacción se realiza de la siguiente manera:



Existen tres tipos de polimorfismos de CaCO_3 los cuales son: calcita, vaterita y aragonito, donde las bacterias mayormente producen la calcita y la vaterita. La calcita es el polimorfo más estable termodinámicamente, sin embargo, la vaterita posee una mayor densidad por su forma hexagonal y su capacidad de llenar poros mejor que los otros polimorfismos debido a su gran volumen (Hemayati *et al.*, 2023).

c. Mineralización biológicamente controlada

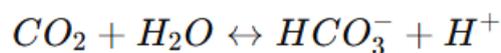
En este proceso los minerales se depositan dentro de las matrices orgánicas o vesículas en células vivas, de esta forma facilita a los microorganismos a ejercer un control sobre el proceso de nucleación y crecimiento del mineral (Chaparro *et al.*, 2018).

2.2.4. Mecanismos en la precipitación de CaCO_3 por bacterias no ureolíticas

El mecanismo utilizado por las bacterias no ureolíticas para precipitar CaCO_3 es la ruta metabólica donde interviene la enzima CA. Como procesos principales se tiene a la denitrificación y a la liberación de metabolitos alcalinos.

a. Mecanismo basado en la anhidrasa carbónica (CA)

La función principal de la CA es la conversión reversible del CO_2 en bicarbonato (HCO_3^-), como se describe en la siguiente reacción:

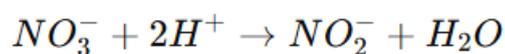


Donde el bicarbonato formado actúa como fuente de carbonato (CO_3^{2-}), luego el pH del medio aumenta a causa de la actividad enzimática y metabólica bacteriana. Este carbonato reacciona con iones de calcio (Ca^{2+}) presentes en el entorno, y precipitan CaCO_3 de acuerdo con la ecuación: $\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{CaCO}_3 \downarrow$

Entre las principales funciones que cumple la CA está el incremento de la concentración de bicarbonato que es precursor del carbonato, favoreciéndose un ambiente alcalino al disminuir los niveles de CO₂ libre en el medio y actúan como catalizador en la nucleación de cristales sobre las superficies bacterianas, promoviéndose así la formación de CaCO₃. Por ejemplo, las bacterias como *Bacillus megaterium* tienen una alta actividad de CA, por ende, tiene una capacidad elevada de precipitación de CaCO₃ (Achal y Pan, 2010; Xu *et al.*, 2014).

b. Denitrificación

Este proceso es fundamental para mantener el equilibrio con el ciclo del nitrógeno, además es anaeróbico, por lo tanto, los microorganismos utilizan el nitrato como fuente de oxígeno y llevan a cabo la reducción de nitratos a nitritos (NO₃⁻ → NO₂⁻), estos nitritos se convierten en óxido nitroso y al final en nitrógeno molecular; el cual es liberado a la atmósfera. Simultáneamente, se consume protones (H⁺), elevan el pH del medio, y al elevarse el pH se facilita la precipitación de carbonato al promover la formación de iones CO₃²⁻. Este proceso se explica en la siguiente reacción:



c. Liberación de metabolitos alcalinos

Durante la fermentación de azúcares, ciertas bacterias producen metabolitos como acetato y lactato, como derivados de ácidos, generan alcalinidad en el medio; estos ácidos son débiles porque tienen una mayor facilidad para formar sales y de esta manera aumentar el pH. Al aumentar el pH del medio, aumenta también la concentración de iones CO₃²⁻, lo que favorece la formación de CaCO₃.

2.2.5. Nucleación

La nucleación es el primer proceso que se da en la precipitación de CaCO_3 , donde una fase sólida se segrega a partir de una disolución multicomponente, el cambio de fase se da mediante la formación y posterior crecimiento de núcleos, los cuales actúan como centros de cristalización. En este sentido, la nucleación es la formación de grupos de átomos, iones o moléculas constituyentes de la nueva fase en pequeñas áreas que se encuentran separadas en el volumen de la antigua fase; estos grupos se conocen como “clusters”, y cuando estos clusters alcanzan una dimensión crítica aumentan su volumen en el sistema sobresaturado, donde con el tiempo se logra ver una dimensión macroscópica; en cambio, cuando los clusters no sobrepasan a la dimensión crítica se disuelven. Para que se dé el cambio de fase, se requiere de una velocidad de fase, el cual dependerá del número de bacterias capaces de crecer, y estas se forman por unidad de volumen del sistema donde ocurre la nucleación, y por unidad de tiempo; a esto le conocemos como la magnitud de la velocidad de nucleación. Existen dos mecanismos de nucleación: nucleación primaria (nucleación homogénea y heterogénea) y nucleación secundaria (Hernández, 2009).

2.2.6. Fuentes de calcio

Existen dos tipos de fuentes de calcio para inducir la precipitación de CaCO_3 , el acetato de calcio y el lactato de calcio, estos componentes permiten la calcificación de las bacterias a un pH de 10. Un estudio demostró que a los 14 días de incubación hay una mayor precipitación, y que casi todas las cepas bacterianas mostraron mayor precipitación de CaCO_3 con lactato de calcio que con acetato de calcio, sin embargo, el lactato de calcio tiene un 13 % de iones de calcio elemental, mientras que el acetato de calcio tiene un 25 % de iones de calcio (Shaheen *et al.*, 2021).

2.2.7. Mineral que permite el sellamiento

A. Carbonato cálcico

Es un mineral común y representa el componente principal de la corteza terrestre, como el mármol y la piedra caliza. La deposición de minerales carbonatados se observa en organismos como perlas, conchas y huesos en rocas y suelo. Muchos microorganismos pueden inducir la mineralización de CaCO_3 , pero principalmente de dos grupos: los microorganismos productores de CA y de urea. La CA cataliza la reacción convirtiéndose el CO_2 en HCO_3^- para mejorar la concentración de CO_3^{2-} y la biomineralización ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$; $\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$) (Pan *et al.*, 2019).

a. Cristales de CaCO_3

Se establece que las fuentes de calcio inducen a la formación de cristales de diferentes tamaños por ejemplo el CaCl_2 induce a la formación de cristales romboédricos, el acetato de calcio induce cristales laminares de vaterita y lactato de calcio induce formas esféricas de vaterita, estas estructuras se muestran en la figura 3 (Chaparro *et al.*, 2018).

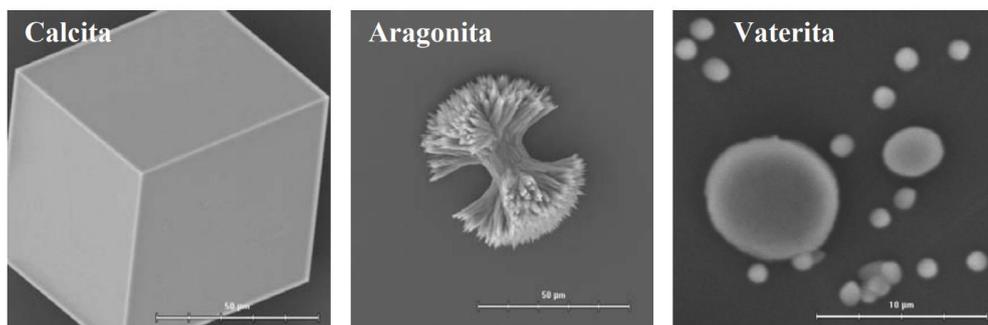


Figura 3. Estructuras polimorfas del CaCO_3 (Rojas, 2008).

2.2.8. Factores que afectan la eficiencia de MICP

Existen varios factores que influyen en la eficiencia de MICP, sobre todo en la actividad de la enzima ureasa y la cantidad de CaCO_3 precipitado; entre ellos tenemos a las especies bacterianas utilizadas en la MICP, la concentración de células bacterianas, el pH, la temperatura y las concentraciones de calcio y urea (Chaparro *et al.*, 2018).

A. Tipos de bacterias utilizadas en la MICP

Hituyan y Valencia, realizaron una revisión sistemática, donde se estudiaron los avances relacionados con la biorreparación bacteriana sobre las patologías del concreto convencional, y se determinó que las especies más predominantes hasta el año 2020 en su capacidad biocementadora son *Sporosarcina pasteurii*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. sphaericus* y *Bacillus* sp. Asimismo las bacterias ureolíticas que precipitan CaCO_3 son *S. pasteurii* CR2 (mina suelo tizón - China), *L. sphaericus* (sitios mineros - Corea), *B. megaterium* ES3 (suelo calcáreo-India), *B. thuringiensis* (suelo calcáreo-India). Entre los principales componentes de los medios de cultivo (líquido y/o sólido) destacan la glucosa, la lactosa, extracto de levadura, peptona de caseína, carbonato de NH_4 , urea, nitrato – acetato – cloruro – lactato de calcio, sulfato - cloruro de magnesio, y otras sales. La capacidad de precipitación de CaCO_3 se evaluó en cubos de mortero, hormigón, cementos de tipo convencional Portland. Finalmente, concluyeron que el proceso de sellado de grieta a partir de precipitación de CaCO_3 mejora significativamente las propiedades mecánicas del concreto, tales como su resistencias y durabilidad en estructuras (Hituyan y Valencia, 2020).

La MICP mediante ureólisis ha sido ampliamente estudiada en los campos de la ingeniería ambiental; sin embargo, existen también bacterias no ureolíticas para la precipitación de CaCO_3 , que inducen un ambiente alcalino de la rizosfera de *Miscanthus sacchariflorus*, y

se demostró que *Lysinibacillus* sp. YS11 tiene la capacidad para precipitar minerales de CaCO_3 con ausencia de urea y en condiciones aeróbicas (Lee *et al.*, 2017).

Se conoce que las bacterias ureolíticas no son omnipresentes y requieren especiales condiciones de cultivo para sobrevivir y funcionar correctamente. Por esta razón se consideran a las vías MICP no ureolíticas como alternativas respetuosas con el medio ambiente en relación a la ureólisis y realizándose estudios para el desarrollo de biohormigón. Los mecanismos en esta vía, como la oxidación de sales de calcio orgánicas, por ejemplo, el lactato de calcio, formiato de calcio, acetato de calcio, cloruro de calcio, glutamato de calcio y nitrato de calcio están muy extendidos entre las bacterias y están libres de subproductos corrosivos o contaminantes (Fahimizadeh *et al.*, 2020).

Un estudio aisló microbios alcalifílicos de diferentes fuentes del suelo para determinar la probable precipitación de CaCO_3 al adoptar la vía no ureolítica (oxidación de carbono orgánico), para la precipitación de calcita y para eliminar la producción de NH_3 tóxico; utilizan lactato de calcio $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$ y acetato de calcio $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ como precursores de precipitación de CaCO_3 . En efecto, los géneros de las cepas biocalcificantes fueron identificados como *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Planococcus*, *Chryseomicrobium*, *Glutamicibacter* y *Corynebacterium* (Shaheen *et al.*, 2021).

En otro estudio se ha estudiado la vía MICP no ureolítica, donde evalúan el rendimiento de dos fuentes de calcio (formiato de calcio y acetato de calcio). En este caso, utilizaron las dos fuentes de calcio, visto que también utilizaron las cepas de *B. subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* basándose en las enzimas que producen, para que puedan catalizar la oxidación tanto del formiato de calcio como del acetato de calcio, produciéndose así la precipitación de carbonato microbiano (Hemayati *et al.*, 2023).

a. **Medios de cultivo utilizados en el aislamiento de bacterias precipitadoras de CaCO₃**

Los medios de cultivo más utilizados comúnmente en el aislamiento de bacterias precipitadoras de CaCO₃, además de las especies bacterianas y los componentes principales de aquellos medios, se detallan a continuación en la tabla 1:

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para cada especie bacteriana en el aislamiento de bacterias precipitadoras de CaCO₃

Especie bacteriana	Medio de cultivo	Composición del medio
<i>B. subtilis</i> natto	Cultivo propuesto	Lactosa, glucosa, agua (120 rpm durante 12 h.) Agregan urea, NaCl, glucosa a 40 °C
<i>B. subtilis</i> <i>B. sphaericus</i>	Caldo Luria Bertani	Peptona, caseína y extracto de levadura – Agar Incubación a 37 °C durante 12 horas en agitación.
<i>Synechococcus</i> PCC8806	Medio ASN III	Cloruro de sodio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, entre otras sales; además contiene: vitamina B12, agar y agua. Agitación de una barra magnética.
<i>B. sphaericus</i> LMG 22557	Medio líquido de sales basales mínimas (MBS)	Incubación a 28 °C en agitación a 100 rpm durante 28 días. Encapsulación con fines industriales
<i>Bacillus</i> sp. CT-5	Medio de caldo nutritivo-urea (NBU)	8 g de caldo nutritivo, urea al 2 %, CaCl ₂ 225 mM, pH 8,0. Incubación a 37 °C en agitación a 130 rpm durante 120 h.

(Hituyan y Valencia, 2020)

B. Tiempo de regeneración y tipo de concreto utilizado

A continuación, en la tabla 2 se detalla el tiempo de regeneración de las especies bacterias en las fisuras de concreto, como también el tipo de concreto utilizado en los diferentes estudios.

Tabla 2. Tiempo de regeneración en cada especie bacteriana y tipo de concreto utilizado

Tiempo de regeneración	Especies bacterianas	Tipo de concreto utilizado
<i>B. subtilis</i>	Después de 100 días de curado, para el ancho de 0,1 mm obtuvo un porcentaje de 100 % de cicatrización, y para anchos de 0,5 mm se obtuvo un 70 %.	Cemento portland ordinario.

<i>S. pasteurii</i>	El ancho de 0,13 mm cicatrizó a 100 días de la activación de la bacteria con un 30 %.	Concreto convencional (Cemento, agua, agregados finos y gruesos, aditivos).
<i>B. subtilis</i> natto	Después de 7 días tuvo una cicatrización de más del 40 %.	Concreto convencional (Cemento, agua, arena)
<i>B. subtilis</i> y <i>B. sphaericus</i>	Durante 28 días se curó 1 mm, con un porcentaje de 70-80 % de cicatrización	IS 10262: 2009 – Se llevó a cabo una combinación de diseño adecuada para concreto de grado M25.

(Hituyan y Valencia, 2020)

C. Concentración de las células bacterianas

Determinar la concentración celular óptima para un proceso de biocementación es importante en la producción de CaCO_3 , se ha demostrado que las altas concentraciones de células bacterianas que estén en un rango de 10^6 a 10^8 células, aumentan la cantidad de precipitación de CaCO_3 por MICP (Okwadha y Li 2010).

El concentrado de bacteria de *B. subtilis* de 10^9 cel/mL además del lactato de calcio para el diseño de mezcla del bioconcreto, es óptimo para que las bacterias produzcan calcita y reparen los agrietamientos (Santos, 2021). En este sentido, también la hidrólisis de la urea está muy relacionada con la biomasa bacteriana, lo cual tiene una mayor influencia que la concentración inicial de la urea (Chaparro *et al.*, 2018).

En otro estudio para la prueba de autorreparación utilizaron seis cubos de concreto donde se le indujeron fisuras con diferentes anchos como (0,1mm, 0,22mm, 0,3mm, 0,4 mm, 0,45 mm y 0,5 mm) inoculándolo con bacterias de tipo *B. subtilis* a una concentración de 10^5 células/mL, con el fin de identificar la capacidad de cicatrización del concreto (Giraldo, 2017). Asimismo, en otro estudio realizaron una prueba de autorreparación en cubos de concreto donde utilizaron cepas bacterianas de tipo *B. subtilis* jc3 a una concentración de 10^5 células/mL después de 100 días de inmersión en el agua se observó el sellado total de la fisura con un ancho de 0,1 mm, debido a la precipitación de CaCO_3

tal como se describe en la figura 4 (Lakshmi *et al.*, 2016).

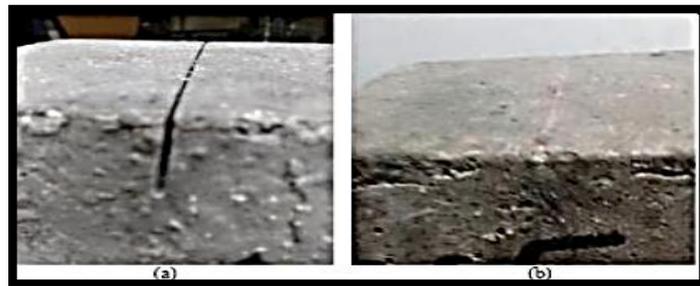


Figura 4. Autorreparación después de 100 días de inmersión en agua a) Cubo con un ancho de grieta de 0,1 mm antes del curado b) Curación completa de un ancho de grieta de 0,1 mm después de 100 días de curado (Lakshmi *et al.*, 2016).

D. pH

El pH tiene influencia en la precipitación de calcita, ya que la ureasa se activa a un pH específico donde se produce la hidrólisis de urea, asimismo, la MICP se realiza a un pH de entre 7,0 y 9,5; sin embargo, es propicio optimizar el rango del pH para MICP para cualquier cepa bacteriana específica que se utilizaría. Estudios demuestran que entre las condiciones para el desarrollo de *S. pasteurii* para generar cristales de CaCO_3 , el pH óptimo es 7,5; sin embargo, otro estudio demostró que el pH óptimo es 8,0. Por ende, se concluye que los niveles de pH no deben ser muy bajos porque el carbonato en estas condiciones tiende a disolverse y no precipitarse (Chaparro *et al.*, 2018).

E. Temperatura

Para que en el proceso MICP se produzca la hidrólisis enzimática, la temperatura debe estar entre 20 y 37 °C, de esta manera la actividad de la ureasa aumenta de 5 a 10 veces más, cuando la temperatura es mayor de 15 a 20 °C, y de 10 a 20 °C respectivamente, de esta manera se concluye que la ureasa es estable a 35 °C, sin embargo, cuando la temperatura aumenta a 55 °C su actividad enzimática se reduce al 47 % (Chaparro *et al.*, 2018). La temperatura óptima del proceso MICP depende principalmente de la

temperatura de crecimiento y metabolismo microbiano, aproximadamente de 20 a 40 °C (Dong *et al.*, 2023).

F. Concentraciones de calcio

Cuando las concentraciones de calcio son altas en un rango mayor a 0,5 M, la precipitación de calcita se reduce; en cambio, si las cantidades de estos compuestos disminuyen en un rango de 0,05 a 0,25 M, esta eficiencia aumenta (Chaparro *et al.*, 2018).

2.2.9. Materias primas de concreto

A. Cemento Portland

Es un material aglomerante con atributos de adherencia y cohesión, por lo que se refiere que al mezclarse con agua u otros aditivos logra formar una masa compacta con propiedades de resistencia, impermeabilidad y durabilidad, además se considera que cumple con las especificaciones técnicas para su uso. De igual modo, se compone de materiales calcáreos, entre los que se encuentran la caliza, la alúmina y el dióxido de silicio que se encuentra presente en la arcilla (Giraldo, 2017).

Igualmente, el cemento Portland es un cemento hidráulico producido mediante la pulverización del clinker, constituidos por silicatos de calcio hidráulico. Es un polvo de color gris, más o menos verdoso, que se vende en bolsas que tienen un peso neto de 42 kg y un pie cúbico de capacidad. Como características físicas tienen la consistencia normal, la densidad, la resistencia a la compresión, la expansión y los tiempos de fraguado y endurecimiento. Y como características químicas se tiene la presencia de óxido de calcio, óxido de silicio, óxido de aluminio y óxido de hierro en su composición (Becosan, 2021).

B. Agregado fino

Esta terminología se refiere a la arena fina o el material fino que se utiliza en la mezcla

del concreto que se prepara para las diversas aplicaciones en construcción; de modo que sus características físicas y químicas son indispensables para la calidad del concreto. Dentro de las propiedades físicas del agregado fino se toma en consideración la granulometría, la forma de las partículas, la densidad, la absorción de agua y también la porosidad. En definitiva, todas estas observaciones se refieren también con las propiedades químicas del agregado fino que incluyen la composición química, la presencia de sustancias nocivas y la reactividad con los materiales del concreto. En particular, cabe señalar que la normativa internacional ASTM C33-01 (Especificación estándar para agregados para concreto) y ASTM C-125-92a (Terminología relacionada con los agregados para concreto) establece las especificaciones para los agregados finos, considerándose sus propiedades físicas y químicas (Sosa *et al.*, 2016).

C. Agua de mezcla

El agua de mezcla en el concreto cumple dos funciones principales: permitir la hidratación del cemento y hacer de la mezcla lo más manejable posible (Osorio, 2018).

a. Características físicas

Una de las características físicas es la granulometría, puesto que la cantidad de agua que se requiere para que el cemento se hidrate, debe encontrarse alrededor del 25 % al 30 % de la masa del cemento, pero para que la mezcla sea manejable, se requiere como mínimo una cantidad de agua del orden del 40 % de la masa del cemento. Otra característica es la densidad del agua de mezcla, cabe señalar que no es un parámetro crítico, sin embargo, se considera que su densidad debe ser similar al del agua potable. Finalmente, la otra característica es la absorción de agua, donde se la capacidad del agregado fino para absorber agua es muy importante, ya que determina la cantidad de agua necesaria para hidratar el cemento y la durabilidad del concreto (Osorio, 2018).

b. Características químicas

Dentro de las características químicas se comprende la composición química, como se mencionó anteriormente el agua de mezcla debe ser potable y libre de sustancias colorantes, aceites y azúcares, dado que estas sustancias pueden afectar de manera negativa el fraguado inicial del cemento y la resistencia última del hormigón (Osorio, 2018). Otra de las características químicas son las impurezas orgánicas, debido a que las sustancias orgánicas contenidas en aguas naturales pueden afectar considerablemente el tiempo de fraguado inicial del cemento y la resistencia última del hormigón. Las aguas con color oscuro, olor pronunciado, o lamas de algas en formación de color verde o café, deben ensayarse. También se toma en consideración la propiedad de la reactividad con materiales del concreto, no solo el agua de mezcla debe ser compatible con los materiales del concreto, como el cemento y el agregado fino, sino que también debe garantizar que se logre una mezcla eficientemente hidratada y una buena resistencia (Osorio, 2018).

Dicho esto, no está demás mencionar que el agua de mezcla en el concreto es un componente crucial que proporciona las condiciones adecuadas para la hidratación del cemento y la manejabilidad de la mezcla. Debido a que es importante controlar la cantidad y calidad del agua de mezcla para garantizar la correcta elaboración y curación del concreto, y así lograr obtener una estructura resistente y duradera (Osorio, 2018).

2.2.10. Determinación de la precipitación de CaCO_3

Para determinar la presencia de CaCO_3 en las muestras, se debe realizar precisamente una prueba con $\text{HCl}_{(aq)}$ al 10 %. Puesto que el $\text{HCl}_{(aq)}$ se utiliza para determinar la presencia de CaCO_3 , a causa de que este ácido reacciona con el CaCO_3 para producir cloruro de calcio, agua y dióxido de carbono. Esta reacción se logra observar como una efervescencia o burbujeo. Otros reactivos no producen esta reacción característica de la misma forma y,

por lo tanto, no son adecuados para determinar la presencia de CaCO_3 (Rivera, 2015).

2.2.11. Solución bacteriana

Se define una solución bacteriana por sus diferentes formas en cuanto a la forma de las bacterias, ya sea como células vegetativas, esporas y células vegetativas con urea. En definitiva, para la reparación de fisuras de concreto con bacterias precipitadoras de CaCO_3 , es importante la utilización de la solución bacteriana por sus distintas propiedades y capacidades. En primera instancia, las esporas bacterianas son más resistentes que las células vegetativas, motivo que les permite sobrevivir en condiciones adversas y germinar cuando las condiciones son favorables en el concreto, aunque se deben evaluar muchos parámetros para que este proceso se desarrolle correctamente. Asimismo, las células vegetativas con urea pueden ser beneficiosas debido a la capacidad de la urea para estimular la actividad de la ureasa, aquella enzima producida por las bacterias, descompone la urea y obtiene como producto el CaCO_3 , factor que contribuye al proceso de reparación de fractura de concreto. Y en cuanto a las células vegetativas, por estar en viabilidad durante la curación de fisuras, poseen la capacidad de crecimiento y reproducción, características que las hace útiles en la biomineralización del concreto (Amer *et al.*, 2020).

En síntesis, la combinación de estas tres formas bacterianas, puede potenciar el proceso de reparación de fisuras de concreto mediante la precipitación de CaCO_3 , al mostrar diferentes ventajas en la resistencia y su actividad biológica. Una concentración celular óptima es de 10^5 células por mL de agua de mezcla (Krishnapriya *et al.*, 2015); y la solución de cementación es la mezcla de urea y CaCl_2 con una proporción de volumen de 1:1, ya que la urea proporciona la fuente de nitrógeno y energía para el crecimiento de las bacterias y el CaCl_2 proporciona a los iones de calcio para reforzar el concreto. Según el

mecanismo de reacción bioquímica de MICP, el contenido de CaCO_3 aumenta con el aumento de la concentración de la solución de cementación. Por lo tanto, se recomienda que se utilicen cuatro niveles de concentración (0,5 mol/L, 1,0 mol/L, 1,5 mol/L y 2,0 mol/L) para el estudio de la influencia de la concentración de la solución de cementación en el efecto de refuerzo del MICP (Li *et al.*, 2023).

A. Factores de supervivencia de bacterias en concreto

En efecto ciertas bacterias logran sobrevivir luego de 5 días aproximadamente, al haber sido adicionada como solución bacteriana a los diversos materiales de concreto, y en consecuencia aumentan la resistencia en los materiales de construcción acto seguido de la muerte de las bacterias. A causa de las reacciones enzimáticas posteriores a la supervivencia dentro del molde de concreto.

Cabe resaltar que las bacterias no ureolíticas incorporadas en concreto sobreviven bajo condiciones extremas gracias a su capacidad de tolerar pH elevado, la baja disponibilidad de nutrientes y la presión mecánica generada durante el proceso de fraguado del material. Considerar que el tiempo de viabilidad de las bacterias dentro del concreto ha de ser limitado, los productos metabólicos que han sido generados por estas bacterias desempeñan un papel crucial incluso después de su muerte, al promover los procesos como la formación de CaCO_3 (Bhutange y Latkar, 2020).

En síntesis, el tiempo de supervivencia de las bacterias depende de factores como la especie bacteriana, el pH alcalino que causa que las bacterias superen a través de sus mecanismos de resistencia, y la coexistencia de porosidad. Teniéndose en cuenta que los poros en la matriz del concreto pueden servir como refugios para las bacterias, al facilitar la retención del agua y de los nutrientes esenciales para su supervivencia y más aún después de su muerte, debido a los productos metabólicos como la CA (Achal y Pan, 2010; Bhutange y Latkar, 2020; Dhama *et al.*, 2014).

2.2.12. Prueba de precipitación de CaCO₃

La prueba de precipitación de CaCO₃ inducida por bacterias es importante porque nos permite comprender mejor los procesos de la biomineralización, explorar sus diferentes aplicaciones en la restauración de estructuras, ya que se ha demostrado su aplicación como una estrategia potencial en la restauración de estructuras patrimoniales; y también se considera como un potencial en la industria de la construcción, como es en la autorreparación de grietas en materiales como el concreto (Ortega *et al.*, 2022).

Para realizar esta prueba, se requiere que primero se dé la preparación del medio de cultivo líquido y/o sólido, el cual contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano, así como una fuente de carbono y calcio, además del agente gelificante al medio líquido para el medio sólido. Luego se inocula en el medio de cultivo la bacteria deseada y se incuba a la temperatura y condiciones adecuadas para el crecimiento bacteriano. Asimismo, se debe tener en cuenta la adición de fuentes de carbonato y calcio al medio de cultivo para inducir la precipitación de CaCO₃. Después se observa la formación de precipitados de CaCO₃ en el medio de cultivo líquido y sólido de manera visual o mediante técnicas analíticas como la espectroscopia infrarroja o la microscopía electrónica (Ruíz, 2020).

A. Medio B4 y su importancia

En 1973, Boquet y sus colaboradores implementaron el medio B4 para estudiar la precipitación de CaCO₃, desde entonces, se ha utilizado en el estudio diferentes cepas bacterianas para evaluar su capacidad de precipitación de CaCO₃. El medio B4 es un medio de precipitación muy eficaz, y tiene esta propiedad debido al único componente tamponado que es el extracto de levadura, lo cual es rico en proteínas; sin embargo, este componente le confiere un pH de 6,5 a 7,5 al medio, razón por la que el medio debe ser

titulado a un pH alcalino. Ya que se ha determinado que el medio B4 a un pH de 8,2 favorece la precipitación de CaCO_3 ; un pequeño cambio en las condiciones de amortiguación afecta la precipitación. Por ello es importante la alcalinidad del medio antes de la inoculación bacteriana, ya que en un pH ácido la bacteria no precipita CaCO_3 (Marvasi *et al.*, 2012).

Después de la inoculación de las cepas bacterianas en el medio B4, las células bacterianas comienzan a hidrolizar los aminoácidos originados en el extracto de levadura, producen NH_3 , aumentan el pH y unen el Ca^{2+} originado en el medio de cultivo a los grupos funcionales polarizados y cargados negativamente presentes en las superficies bacterianas (Enyedi *et al.*, 2020).

2.2.13. Extracción y cuantificación de CaCO_3

Se realiza un lavado con agua destilada estéril en el medio sólido donde se inoculó la bacteria precipitadora de CaCO_3 para eliminar impurezas y componentes no deseados que puedan interferir con la cuantificación del CaCO_3 . El uso de papel filtro después del lavado permite separar el CaCO_3 del medio (Aristizabal *et al.*, 2017). En el medio líquido B4, se utiliza lisozima para lisar las bacterias y liberar el CaCO_3 , el cual luego se cuantifica con ayuda del papel filtro (Khan *et al.*, 2020).

2.2.14. Métodos y pruebas de identificación bioquímica de bacterias precipitadoras de CaCO_3

A. Aislamiento

En el aislamiento de bacterias precipitadoras de CaCO_3 de diferentes tipos de suelo se puede utilizar el medio de cultivo Luria Bertani (LB) enriquecido con CaCO_3 al 0,2 %.

Algunas de las bacterias reportadas como bioprecipitadoras de CaCO_3 son *Bacillus cereus*, *S. pasteurii*, *B. subtilis* y *Myxococcus xanthus*. La precipitación de CaCO_3 puede ocurrir como producto de un proceso metabólico microbiano, por ejemplo, la fotosíntesis, la hidrólisis de la urea y la reducción de sulfatos. La carga natural negativa y los grupos funcionales de la pared celular favorecen la fijación de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{2+} , haciéndose de los microorganismos sitios de nucleación ideales (Nookala, 2023).

B. Coloración Gram

La coloración Gram es un método que nos permite dividir a los microorganismos en gram positivos y gram negativos, donde las gram positivas son los que resisten la acción colorante del disolvente alcohol acetona, mediante el tratamiento con un colorante básico y lugol, mientras que las gram negativas son decoloradas, luego son teñidas con un colorante de contraste que es la safranina (Sacsquispe *et al.*, 2005).

Su fundamento radica en la estructura y composición de la pared celular de la bacteria, en cuanto a las bacterias gram negativas presentan la capa de peptidoglicano mucho más delgada (3-5 nm) y poseen una membrana externa de estructura compleja en cuya composición intervienen fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos; a diferencia de la pared celular de las bacterias gram positivas, las cuales están constituidas por una gruesa capa de peptidoglicano (20-30 nm) que es un polímero de N- acetil glucosamina y formados por aminoácidos, en arreglos que varían de una especie bacteriana a otra. En las capas de las bacterias gram positivas también se pueden encontrar ácidos teicoicos formados por ésteres fosfato de glicerol o ribitol y ácidos lipoprotéicos cuya estructura es similar a los ácidos teicoicos pero se hallan anclados a la membrana citoplasmática (Sacsquispe *et al.*, 2005).

C. Coloración de esporas con verde malaquita

La coloración de esporas con verde malaquita es un método que nos permite ver una forma de esporulación que le da resistencia a la bacteria, el cual es generado por algunos géneros de bacterias gram positivas. Las endosporas son estructuras que aseguran la supervivencia de estas bacterias en condiciones desfavorables de temperaturas, radiación ultravioleta y agentes químicos. Las esporas bacterianas están rodeadas por gruesas envolturas y tienen muy bajo contenido de agua. Su corteza está compuesta por un peptidoglicano que contiene menos enlaces cruzados que el correspondiente a la pared celular, su cubierta está formada por una proteína del tipo de la queratina con gran cantidad de puentes disulfuro. Esta capa es fundamental para la resistencia de la espora a los agentes físicos y químicos. Las células vegetativas se tiñen de rosa, mientras que las esporas conservan el color verde de malaquita. Cabe resaltar que una vez coloreadas son difíciles de decolorar (Santambrosio, 2009).

D. Identificación bioquímica

El ABIS online (Advanced Bacterial Identification Software) es una herramienta de laboratorio para la identificación de bacterias basada en caracteres bioquímicos. Las pruebas bioquímicas se realizan para identificar especies bacterianas con ayuda del ABIS online, ya que nos permiten detectar características metabólicas distintivas de ciertos microorganismos, de modo que facilitan su clasificación (Asenjo, 2019). Para las bacterias gram positivas como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus*, se emplean pruebas específicas como la hidrólisis de caseína, almidón, gelatina, catalasa, citrato, entre otras, para su caracterización. Estas pruebas son fundamentales para la identificación precisa de bacterias (Fernández *et al.*, 2010).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Nivel de investigación

Descriptivo, porque el objetivo principal de este estudio fue caracterizar microbiológicamente a las bacterias precipitadoras de CaCO_3 aisladas de suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca sin la intervención directa en los sujetos o variables de estudio.

3.2. Tipo y diseño de estudio

El tipo de estudio es básico porque se exploró en las teorías y principios generales del conocimiento científico existente, además de generar nuevos conocimientos con el fin de proporcionar una base para investigaciones aplicadas futuras en bioconcreto.

El diseño de estudio es cuasiexperimental, porque se establecieron 4 grupos experimentales y un control negativo para evaluar los efectos de esta intervención; además, los sujetos se agruparon según criterios preexistentes y de esa manera se modificaron intencionalmente las variables independientes para observar su efecto en la variable dependiente que fue el sellamiento de las fisuras en cubos de concreto. Esto permitió tener una mayor aplicabilidad en contextos reales porque no se alteraron mucho las condiciones naturales.

3.3. Material biológico

- El material biológico estuvo conformado por las bacterias presentes en las muestras de suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca.

3.4. Área de estudio o lugar de muestreo

En el presente estudio se recolectaron muestras de suelos ureicos y calcáreos de los cinco lugares de muestreo de la provincia de Cajamarca con el objetivo de identificar bacterias precipitadoras de CaCO_3 , tal como se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción de los suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca.

Tipo de suelo	Lugar de muestreo	Distrito	Coordenadas geográficas		
			Latitud	Longitud	Altitud
Suelos ureicos	Suelo rico en estiércol del fundo en Huayrapongo	Baños del Inca	7°10'32.89"S	78°28'11.48"W	2628 m
	Suelo agrícola del jardín de Las Hortensias – Tres Molinos	Baños del Inca	7°7'42.4"S	78°30'51.4"W	2832 m
	Suelo agrícola de la Universidad Nacional de Cajamarca.	Cajamarca	7°10'3.8"S	78°29'34.8"W	2675 m
Suelos calcáreos	Cantera de Otuzco	Baños del Inca	7°7'30.44"S	78°26'46.34"W	2752 m
	Cantera de Namora	Namora	7°11'33.02"S	78°17'51.30"W	2837 m

Las bacterias precipitadoras de CaCO_3 obtenidas y estudiadas en esta investigación fueron colectadas solamente de los 3 puntos de muestreo mostrados en la figura 5.

Suelo agrícola de la Universidad Nacional de Cajamarca
(Apéndice N°1)



Suelo agrícola del Jardín de Las Hortensias
(Apéndice N°2)



Suelo de Cantera de Namora
(Apéndice N°3)



Figura 5. Ubicación geográfica de los 3 puntos de muestreo de los suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca, de los cuales se obtuvieron las bacterias precipitadoras de CaCO_3 .

3.5. Colecta de muestras

Se recolectaron muestras de suelo de cada punto de muestreo (Tabla 3), considerándose en cada punto de muestreo 20 submuestras, donde recorriéndose al azar en forma de zigzag se eligieron 20 puntos que distan 15 pasos (aproximadamente 5 m), para luego colectarse las submuestras (Laboratorio de Análisis de Muestreo de Suelos – INIA, 2002); en total se tomaron 20 submuestras de 1g aproximadamente de los diferentes puntos por cada zona de muestreo (Amer *et al.*, 2020); para esto, primero se limpió la superficie del terreno y con ayuda de una espátula estéril se toma la muestra a una profundidad de 10 cm (Vargas Chacón y Vargas Cartagena, 2015). Luego, se reunieron todas las submuestras en un frasco de vidrio estéril de 500 mL de capacidad y se mezclaron homogéneamente, finalmente se obtuvo aproximadamente 20 g de muestra por cada zona de muestreo. Las muestras fueron transportadas en cadena de frío hasta el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca ubicado en el edificio 1D - 107, para su posterior procesamiento.

3.6. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

En el Apéndice N°5 se ilustra de manera esquemática las técnicas e instrumentos empleados para el aislamiento, caracterización y aplicación de bacterias precipitadoras de CaCO₃ en el sellado de fisuras de concreto.

3.6.1. Aislamiento de bacterias precipitadoras de CaCO₃

A. Inoculación de la muestra de suelo en caldo LB

Se preparó 25 mL del caldo LB alcalino por cada punto de muestreo, el cual estuvo compuesto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de cloruro de sodio en 1 L de agua destilada (Farhat *et al.*, 2023). El pH se ajustó a 10 con NaOH 2 N (Shaheen *et al.*, 2023). Luego se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Las muestras de suelo se homogenizaron y después se pesó 1 g de cada uno de las muestras homogéneas para inocular en los 25 mL de caldo LB alcalino preparado anteriormente, seguidamente se incubó la muestra a 37 °C en agitación mediante el shaker a 200 rpm (Santos, 2021) durante 48 h (Amer *et al.*, 2020).

B. Aislamiento de las bacterias de interés

De la solución obtenida, se realizaron diluciones en serie (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) en solución salina (NaCl al 0,9 %). Seguidamente se sembraron mediante la técnica de estriado en placas en medio sólido LB alcalino; el cual estuvo compuesto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de cloruro de sodio y 15 g/L de agar en 1 L de agua destilada (Farhat *et al.*, 2023), con pH ajustado a 10. Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h (Amer *et al.*, 2020).

C. Evaluación de la precipitación de CaCO₃ de bacterias en medio B4

a. Preparación del medio sólido B4

El medio sólido B4 estuvo compuesto por 2,5 g/L de acetato de calcio, 5 g/L de glucosa, 4 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de agar-agar. Para su uso el pH del medio se ajustó a 8,2 con NaOH 1N (10 o 20 uL) antes de esterilizar el medio (Marvasi *et al.*, 2012).

b. Precipitación de CaCO₃

Enseguida, los aislados bacterianos obtenidos de las placas de medio sólido LB alcalino se sembraron por agotamiento en placas de medio sólido B4. Finalmente se selló la placa con cinta parafilm y se incubó a una temperatura óptima de 21 - 25 °C (Enyedi *et al.*, 2020) durante 15 días (Giraldo, 2017) en oscuridad (García *et al.*, 2016).

c. Determinación de la precipitación de CaCO₃

Una vez transcurrido el tiempo de incubación del medio sólido B4, cuidadosamente se recolectó con el asa bacteriológica el precipitado blanquecino formado alrededor de las colonias en un papel filtro estéril, luego se añadió 1 gota HCl_(aq) al 10 % para así determinar la presencia de CaCO₃, verificándose que la reacción debe manifestarse como una efervescencia o burbujeo. (Rivera, 2015).

3.6.2. Inoculación en medio líquido B4 para extracción y cuantificación de CaCO₃

Los 5 aislamientos se inocularon en 50 mL de medio líquido B4 en 5 matraces de 125 mL,

este medio se ajustó a un pH 8 con 1 M de hidróxido de sodio (NaOH) (García, 2021), luego se incubaron los matraces en agitación a 180 rpm y 30 °C durante 15 días, después se recogieron submuestras en tubos eppendorf de 2 mL a los días 1, 5, 10 y 15; y en cada momento se realizó la prueba de shock térmico y se centrifugó la submuestra a 8000 rpm durante 10 minutos para separar el precipitado del sobrenadante, asimismo se realizó el lavado respectivo con solución salina (Li *et al.*, 2023).

La solución obtenida se filtró en papel de filtro Whatman N°1 (*Fisher Scientific, Reino Unido*) (90 mm de diámetro), estos filtros se pesaron antes y después de la recolección de cristales para estimar las cantidades de cristales de CaCO₃ precipitados por los diferentes aislados (Zamarreño *et al.*, 2009). Después se dejó secar durante 3 días a 37°C para luego pesar. El peso del precipitante CaCO₃ (W_c) se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$W_c = W_{fc} - W_f$$

donde (W_{fc}) es el peso del papel de filtro que contiene precipitante; y (W_f) es el peso del papel de filtro vacío, es decir, sin el precipitante (Krishnapriya *et al.*, 2015).

3.6.3. Determinación del porcentaje de sellamiento de fisuras en cubos de concreto, con bacterias precipitadoras de CaCO₃

A. Preparación de las soluciones bacterianas y sustrato

Para obtener la solución bacteriana, se preparó dos tipos de soluciones: solución de células vegetativas de las 5 especies bacterianas y solución de esporas de las 2 especies esporuladas, las cuales se requirieron para su uso posterior (Amer *et al.*, 2020), tal como se describe a continuación:

a. Solución de células vegetativas

Se prepararon 30 mL de caldo LB alcalino para cada uno de los 5 matraces predispuestos para las 5 especies bacterianas, luego del autoclavado se inocularon estas especies bacterianas por separado, considerándose 9 colonias de 18 horas de crecimiento en medio sólido LB alcalino; se incubaron a 30°C en agitación a 100 rpm durante 24 horas y luego se preservaron a 4°C.

b. Solución de esporas

Se preparó también en 2 matraces 30 mL de caldo LB alcalino para cada especie bacteriana esporulada, luego se autoclavó y se inoculó cada bacteria considerándose 9 colonias de 18 horas de crecimiento en medio sólido LB alcalino. Asimismo, se pesó 0,01 g/L de $MnSO_4 \cdot H_2O$ y se adicionó a la solución preparada después de la inoculación bacteriana. Finalmente se incubó a 30 °C en agitación a 100 rpm durante 30 días. Al cabo del tiempo transcurrido, se centrifugó la solución durante 4 minutos a 5000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se suspendió en solución salina, luego se lavaron las esporas formadas con agua destilada. Para corroborar la presencia de esporas en la solución, se observó en un examen directo en fresco y mediante la coloración Gram (Apéndice N° 6).

Por otro lado, para obtener el sustrato se añadió 20 g/L de $CaCl_2$ a la solución salina al 0,9 %, después las soluciones bacterianas (vegetativas/esporas) se diluyeron por separado con solución salina al 0,9 % hasta lograr una concentración bacteriana de 10^9 células/mL (Amer *et al.*, 2020) según el sistema de McFarland. Finalmente, estas soluciones preparadas se conservaron a 4°C para su posterior uso.

B. Preparación de cubos de concreto

El concreto estuvo compuesto por arena fina, cemento Portland y agua de grifo; en el caso de preparar el bioconcreto 1 y 2 se agregó una solución bacteriana a la mezcla de concreto en vez del agua de grifo; y en el bioconcreto 3 además de adicionar la solución bacteriana se agregó el sustrato (CaCl_2), tal como se describe en la tabla 4. Primero se cuantificaron las cantidades de cada uno de los componentes en base a las 5 bacterias que demostraron su capacidad de precipitar CaCO_3 , cabe resaltar que se mantuvo la relación constante entre agua y cemento en 0,5 (SENCICO 2009) y la proporción de cemento y arena fue de 1:3 en masa (Amer *et al.*, 2020). Asimismo, por cada bacteria se consideraron 3 ensayos por cada grupo de control de concreto así como se detalla en la tabla 4 (García, 2021).

Tabla 4. Distribución de los grupos control con sus materiales requeridos tanto para la preparación de la mezcla de concreto como para el tratamiento de fisuras

GRUPO MÉTODO	GRUPOS EXPERIMENTALES				
	CONTROL NEGATIVO	Concreto	Bioconcreto 1	Bioconcreto 2	Bioconcreto 3
Materiales de preparación de mezcla de concreto	Cemento	Cemento	Cemento	Cemento	Cemento
	Arena fina	Arena fina	Arena fina	Arena fina	Arena fina
			Agua de mezcla	Agua de mezcla	Agua de mezcla
	Agua de mezcla	Agua de mezcla	Solución bacteriana	Solución bacteriana	Solución bacteriana
					Sustrato (CaCl_2)
Fisura			Si		
Tratamiento de sellamiento de fisuras	Agua de grifo	Solución bacteriana	Agua de grifo	Solución bacteriana	Solución bacteriana

El mezclado homogéneo se realizó por lo menos durante 90 segundos, según “Standard Specification for Ready-Mixed Concrete” (ASTM C 94M) (5.8.4.) Además, el agua empleada en la preparación y curado del concreto fue potable según corresponda (3.4.1.). Y la temperatura del concreto al ser colocado en los

cubos no fue mayor de 32° C (5.11.2.) (SENCICO 2009).

Los cubos a utilizados fueron de medida 22 mm x 22 mm x 19 mm (Apéndice N°4); y el volumen de concreto a llenar en cada cubo fue de aproximadamente 15 mL. La fisura se realizó con una lámina cubre objetos de 0,13 mm de ancho y a una profundidad de 10 mm. Después se curaron las muestras en agua o solución de células vegetativas / esporas según corresponda durante 24 horas (Asenjo, 2019). Y se esperó su solidificación durante 1 día, luego se realizó el tratamiento de curación de grietas correspondiente.

C. Tratamiento de sellamiento de fisuras

El tratamiento de sellamiento de fisuras se realizó durante 45 días a una temperatura 25 °C y se inocularon las soluciones de tratamiento respectivo los días impares observándose los sellamientos a nivel macroscópicamente, al medir con el fisurómetro (Apéndice N° 8), y tomándose la evidencia correspondiente con cámara digital (García, 2021).

3.6.4. Caracterización microbiológica de las bacterias precipitadoras de CaCO₃

A. Caracterización macroscópica y microscópica

Una vez evaluado la precipitación de CaCO₃ de los 5 aislamientos de los 3 puntos de muestreo, se caracterizaron los diversos tipos de colonias de bacterias precipitadoras de CaCO₃ en las placas de medio sólido LB alcalino y se anotaron las características más importantes (Anexo N° 1). Asimismo, se realizó un estudio microscópico de cada colonia aislada, mediante la coloración Gram (Sacsquispe *et al.*, 2005) (Anexo N° 2) y la tinción de esporas según Santambrosio (2009) (Anexo N° 3), con la finalidad de observar el comportamiento tintorial, la forma, el tamaño, las agrupaciones de las células, la presencia

y ubicación de las esporas (Reynoso *et al.*, 2015).

B. Caracterización bioquímica e identificación de especies

Se realizó la identificación bioquímica a las 5 bacterias que precipitaron CaCO_3 , realizándose las pruebas bioquímicas que se requieren de acuerdo al grupo de *Bacillus* y *Paenibacillus* según el software ABIS online (Asenjo, 2019): coloración Gram, coloración de esporas con verde malaquita, motilidad, hidrólisis de esculina, ONPG - β -galactosidasa, catalasa, oxidasa, ureasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, producción de indol, utilización de citrato, reducción de nitratos, prueba de Voges-Proskauer; y producción de ácido a partir de: l-arabinosa, glucosa, inositol, maltosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa, sorbitol y sacarosa. Estas pruebas se llevaron a cabo de manera tradicional y en el equipo semiautomatizado MicroScan.

3.7. Técnicas de Procesamiento y análisis de datos

Se utilizó el software ABIS online para la identificación de bacterias basada en la morfología y características bioquímicas, donde se obtuvieron resultados informativos. Se construyó una base de datos en el programa Excel, con los pesos obtenidos en la producción de CaCO_3 de cada uno de los aislados bacterianos en medio B4, asimismo los porcentajes obtenidos en el sellamiento de fisuras en cada grupo experimental. Posteriormente, se utilizó el programa IBM SPSS Statistics versión 25, para analizar los datos obtenidos y determinar si existe diferencia significativa, considerándose un nivel de confianza de 95 % y un valor de $p < 0,05$. Las pruebas estadísticas utilizados se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Pruebas estadísticas realizadas en el programa IBM SPSS Statistics versión 25 para análisis de datos.

Prueba estadística		Propósito
Diagrama de Cajas Agrupado		Visualizar la distribución de una variable numérica a través de sus cuartiles, para identificar valores atípicos y comparar la variabilidad entre diferentes grupos.
Kolmogorov-Smirnov Shapiro-Wilk		Evaluar la normalidad de los datos
Homogeneidad de varianzas		Evaluar si las varianzas de los diferentes grupos son iguales
ANOVA univariado		Evaluar el efecto de las variables independientes sobre la variable dependiente, considerando el análisis dentro de los grupos comparados
Pruebas post-hoc	Dunnett	Comparar el grupo de control negativo con las demás especies
	Scheffé	Comparaciones múltiples entre todos los grupos

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Aislamiento de bacterias precipitadoras de CaCO_3 provenientes de suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca

De 28 aislamientos provenientes de los cinco puntos de muestreo, evaluados en medio sólido LB alcalino y en medio sólido B4, solo 5 aislamientos lograron precipitar CaCO_3 . Las bacterias provienen de distintos puntos de muestreo, como se describe en la tabla 6. Las características de las muestras de suelo, se describen en la misma tabla.

Tabla 6. Características de los suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca de donde se obtuvieron las muestras.

LUGAR DE MUESTREO	Código de aislamiento	Características de suelo	
		pH	Tipo
Suelo agrícola de la Universidad Nacional de Cajamarca	UNC4	5	Ureico
Suelo agrícola del Jardín de Las Hortensias	HRT2	6	Ureico
Suelo de Cantera de Namora	CNS1	6	Calcáreo
Roca de Cantera de Namora	RCN1	7	Roca calcárea
	RCN4		

4.1.2. Precipitación de CaCO_3 de bacterias en medio sólido B4

La formación del precipitado de CaCO_3 se evidenció alrededor de las colonias, visualizándose con un color blanquecino que se formó producto del metabolismo microbiano de cada aislado en medio sólido B4. Asimismo, se confirmó la presencia de CaCO_3 , mediante la efervescencia rápida que se produjo al reaccionar este precipitado al agregarle $\text{HCl}_{(aq)}$ al 10 %, como se muestra en las imágenes de la figura 6.

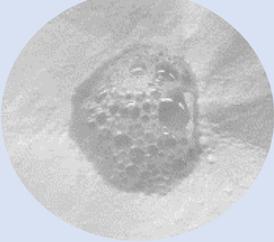
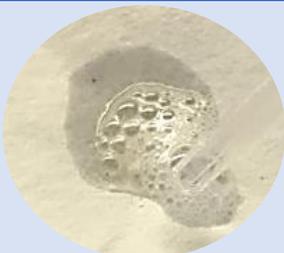
Código de aislamiento	Crecimiento en medio sólido B4	Prueba con HCl _(aq) al 10 %
UNC4		
HRT2		
CNS1		
RCN1		
RCN4		

Figura 6. Evaluación de la precipitación de CaCO₃ de bacterias en medio sólido B4 a nivel macroscópico.

4.1.3. Cuantificación de CaCO₃ precipitado por bacterias en medio líquido B4.

En la figura 7 se muestra el peso del CaCO₃ precipitado por cada especie, representándose mediante gráfico de barras la producción de CaCO₃, donde destaca el aislamiento UNC4 cuya producción fue mayor en comparación con los demás aislamientos. El aislamiento UNC4 en el día 5 produjo 0,005 g de CaCO₃, en el día 10 logró producir 0,026 g y hasta el día 15 produjo 0,047 g de CaCO₃.

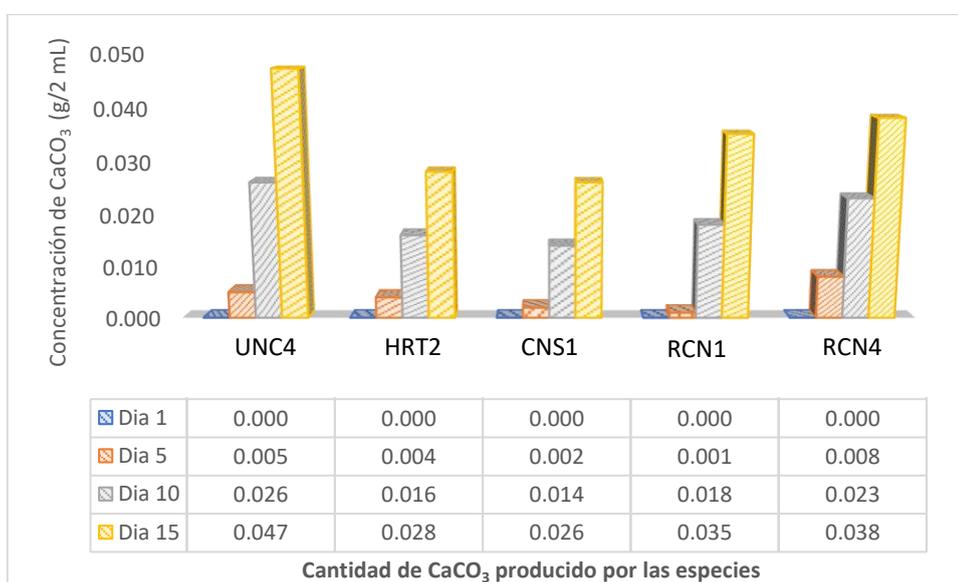


Figura 7. Producción de CaCO₃ por las especies bacterianas en medio líquido B4.

4.1.4. Porcentaje de sellamiento de fisuras en cubos de concreto, con bacterias precipitadoras de CaCO₃

La capacidad de sellamiento producido por las especies bacterianas se muestra en las imágenes de la figura 8, las imágenes corresponden al día 1 de pretratamiento y al día 45 postratamiento, describiéndose la media de los 3 ensayos realizados en cada día y en cada especie bacteriana; asimismo, en la tabla 7 se describe las medias y su desviación estándar de las fisuras en concreto por bacterias precipitadoras de CaCO₃

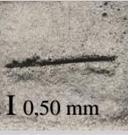
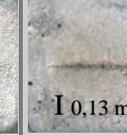
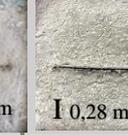
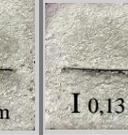
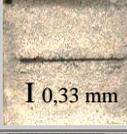
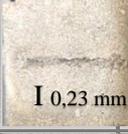
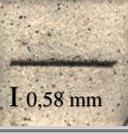
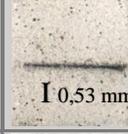
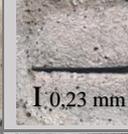
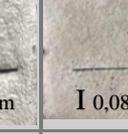
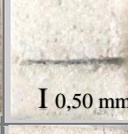
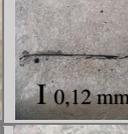
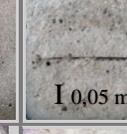
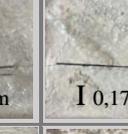
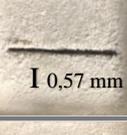
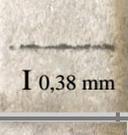
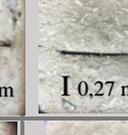
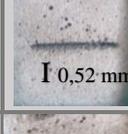
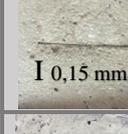
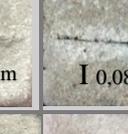
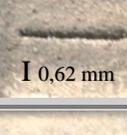
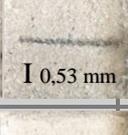
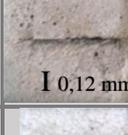
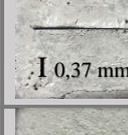
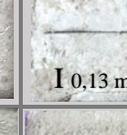
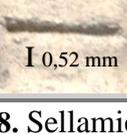
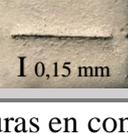
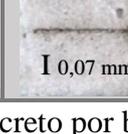
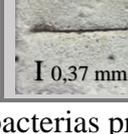
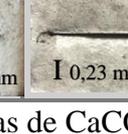
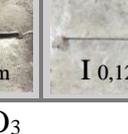
Solución Bacteriana		Concreto		Bioconcreto 1		Bioconcreto 2		Bioconcreto 3	
		Día 1	Día 45	Día 1	Día 45	Día 1	Día 45	Día 1	Día 45
Solución de células vegetativas	UNC4	 I 0,37 mm	 I 0,18 mm	 I 0,50 mm	 I 0,37 mm	 I 0,28 mm	 I 0,13 mm	 I 0,28 mm	 I 0,13 mm
	HRT2	 I 0,33 mm	 I 0,23 mm	 I 0,58 mm	 I 0,53 mm	 I 0,23 mm	 I 0,12 mm	 I 0,15 mm	 I 0,08 mm
	CNS1	 I 0,47 mm	 I 0,33 mm	 I 0,57 mm	 I 0,50 mm	 I 0,12 mm	 I 0,05 mm	 I 0,23 mm	 I 0,17 mm
	RCN1	 I 0,57 mm	 I 0,38 mm	 I 0,48 mm	 I 0,42 mm	 I 0,25 mm	 I 0,12 mm	 I 0,27 mm	 I 0,17 mm
	RCN4	 I 0,57 mm	 I 0,35 mm	 I 0,60 mm	 I 0,52 mm	 I 0,15 mm	 I 0,05 mm	 I 0,17 mm	 I 0,08 mm
Solución de esporas	UNC4	 I 0,62 mm	 I 0,53 mm	 I 0,22 mm	 I 0,12 mm	 I 0,37 mm	 I 0,13 mm	 I 0,43 mm	 I 0,27 mm
	RCN4	 I 0,52 mm	 I 0,43 mm	 I 0,15 mm	 I 0,07 mm	 I 0,37 mm	 I 0,17 mm	 I 0,23 mm	 I 0,12 mm

Figura 8. Sellamiento de fisuras en concreto por bacterias precipitadoras de CaCO_3

Tabla 7. Medias de las fisuras en el pretratamiento (día 1) y postratamiento (día 45) en concreto por bacterias precipitadoras de CaCO_3

GRUPO EXPERIMENTAL	Día / Especie	UNC4		HRT2		CNS1		RCN1		RCN4	
		Media	SD								
CONCRETO	DIA 1	0,367	±0,058	0,333	±0,058	0,467	±0,115	0,567	±0,058	0,567	±0,029
	DIA 45	0,183	±0,029	0,233	±0,115	0,333	±0,104	0,383	±0,058	0,350	±0,087
BIOCONCRETO 1	DIA 1	0,500	±0,100	0,583	±0,029	0,567	±0,058	0,483	±0,115	0,600	±0,050
	DIA 45	0,367	±0,029	0,533	±0,029	0,500	±0,087	0,417	±0,153	0,517	±0,029
BIOCONCRETO 2	DIA 1	0,283	±0,115	0,233	±0,144	0,117	±0,029	0,250	±0,132	0,150	±0,000
	DIA 45	0,133	±0,029	0,117	±0,115	0,050	±0,000	0,117	±0,076	0,050	±0,000
BIOCONCRETO 3	DIA 1	0,283	±0,115	0,150	±0,000	0,233	±0,104	0,267	±0,115	0,167	±0,058
	DIA 45	0,133	±0,029	0,083	±0,029	0,167	±0,029	0,167	±0,029	0,083	±0,058

A continuación, se muestran los porcentajes de sellamiento en cubos de concreto en los diferentes grupos experimentales para tratamiento de las fisuras empleados en este estudio: concreto, bioconcreto 1, bioconcreto 2 y bioconcreto 3 con las soluciones bacterianas: SV como solución de células vegetativas y SE como solución de esporas a una concentración de 0,5 en McFarland. Las mediciones de las fisuras se realizaron con fisurómetro (Apéndice N° 8) en los días representativos 1, 11, 22, 33 y 45; asimismo se determinó el porcentaje de sellamiento realizado por cada bacteria de estudio.

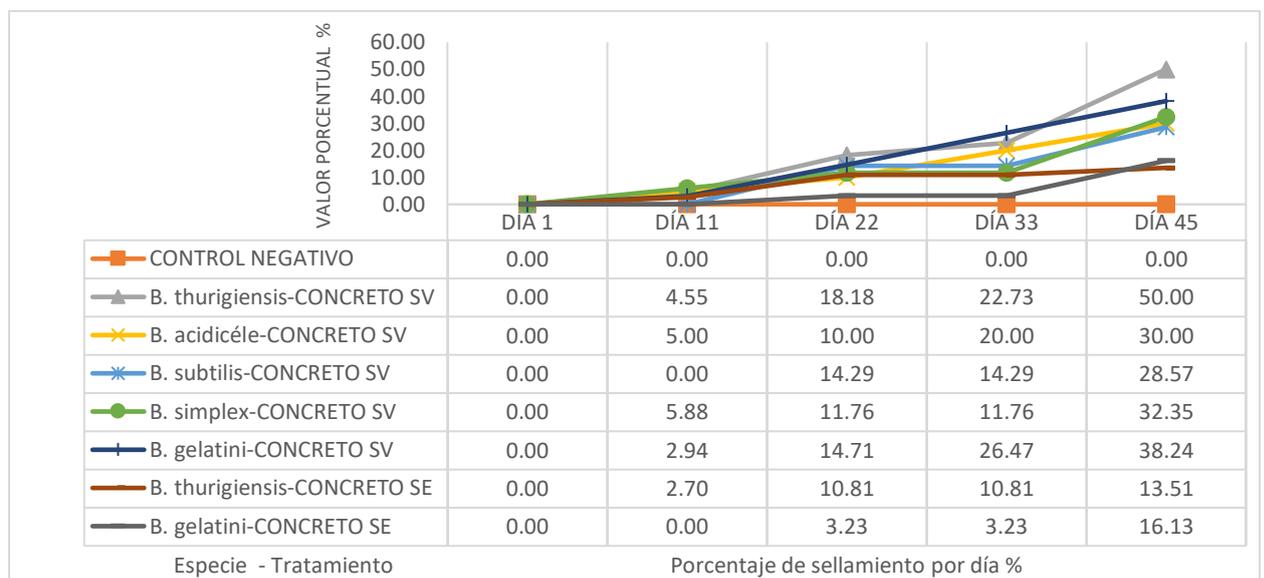


Figura 9. Porcentajes de sellamiento de fisuras en concreto por bacterias precipitadoras de CaCO_3 . *SV: Solución de células vegetativas, SE: Solución de esporas

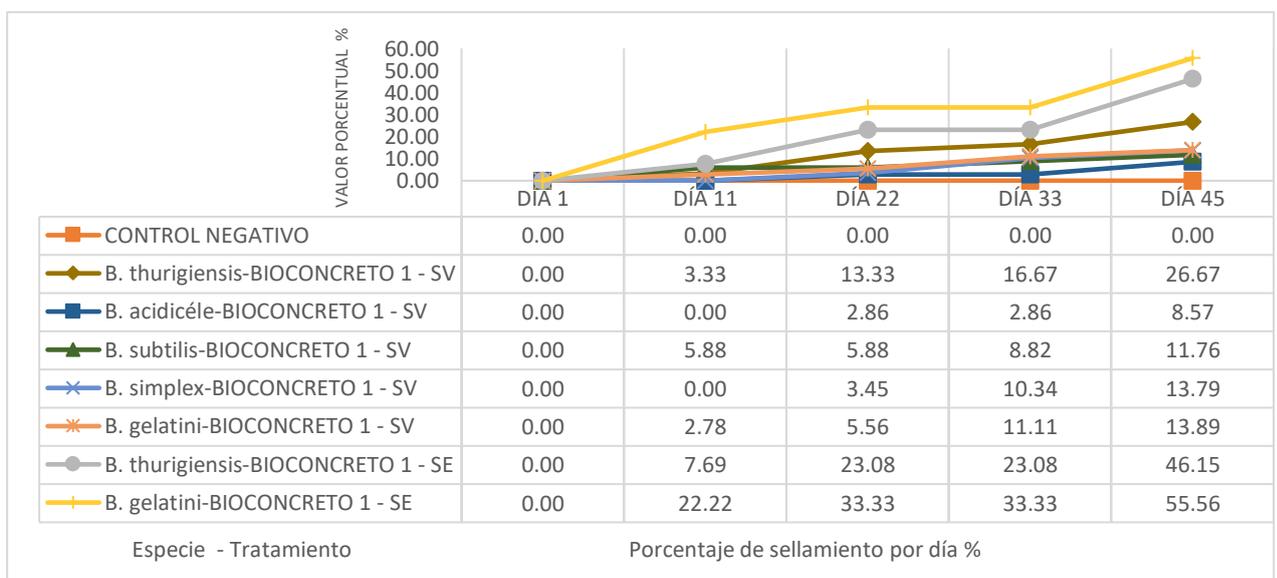


Figura 10. Porcentajes de sellamiento de fisuras en bioconcreto 1 por bacterias precipitadoras de CaCO_3 . *SV: Solución de células vegetativas, SE: Solución de esporas

B. thuringiensis (UNC4) en el grupo experimental de concreto, donde la fisura fue tratada durante 45 días con solución de células vegetativas, demostró ser la más destacada por su capacidad de sellamiento hasta un 50 %. De otro lado, la bacteria *B. gelatini* (RCN4) logró un sellamiento de 38,24 % en el mismo período de tiempo (Figura 9).

En la condición de bioconcreto 1, preparado con arena fina, cemento y solución bacteriana a una concentración de 0,5 de McFarland; y el tratamiento de fisuras realizado con la aplicación de agua potable, se logra observar que la bacteria *B. gelatini* (RCN4) selló un 55,56 % y es más efectiva en solución de esporas, además la bacteria *B. thuringiensis* (UNC4) como solución de esporas también logró sellar un 46,15 % en un tratamiento de 45 días, tal como se muestra en la figura 10.

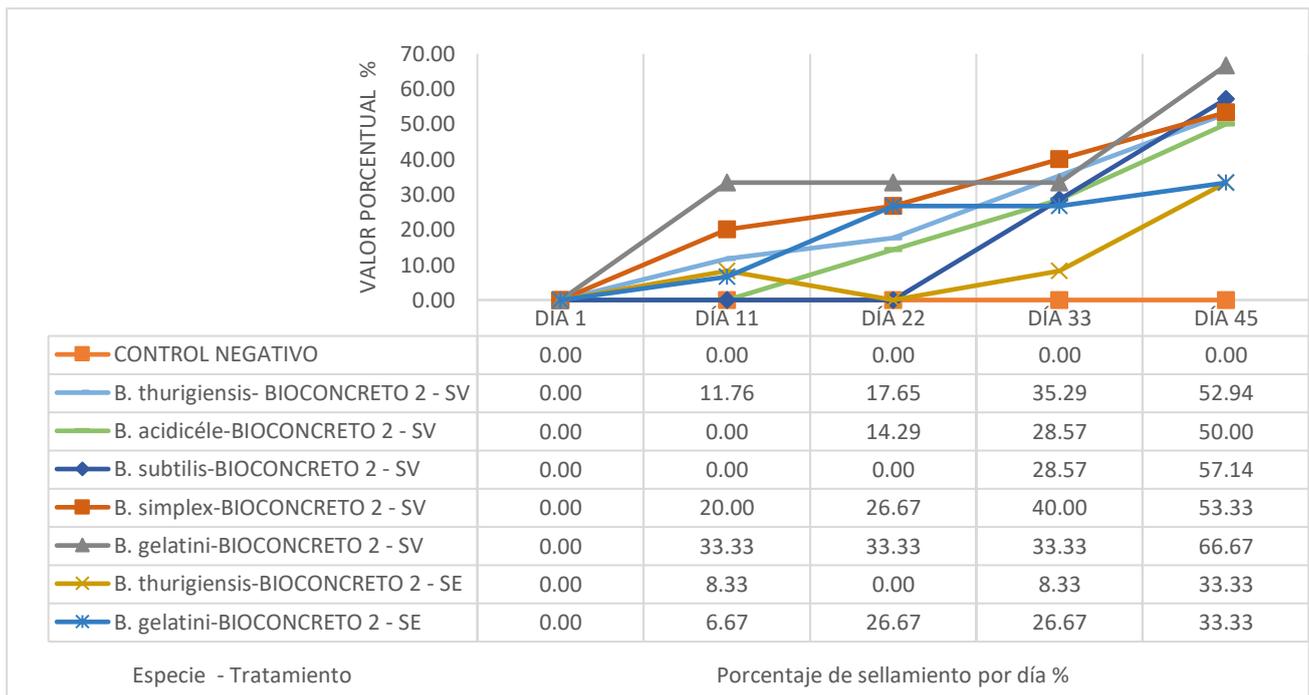


Figura 11. Porcentajes de sellamiento de fisuras en bioconcreto 2 por bacterias precipitadoras de CaCO_3 . *SV: Solución de células vegetativas, SE: Solución de esporas

Seguidamente, en la condición de bioconcreto 2, donde ha sido preparado previamente con arena fina, cemento y solución bacteriana a una concentración de 0,5 de McFarland; y su

tratamiento de fisuras se realizó con la aplicación de la misma solución bacteriana (vegetativa/esporas) de cada bacteria. Se observa que la bacteria *B. gelatini* (RCN4) como solución de células vegetativas, selló un 66,67 % de la fisura, seguidamente de las especies bacterianas *B. subtilis*- CNS1 (57,14 %) y *B. acidicele*- HRT2 (50 %) tal como se muestra en la figura 11.

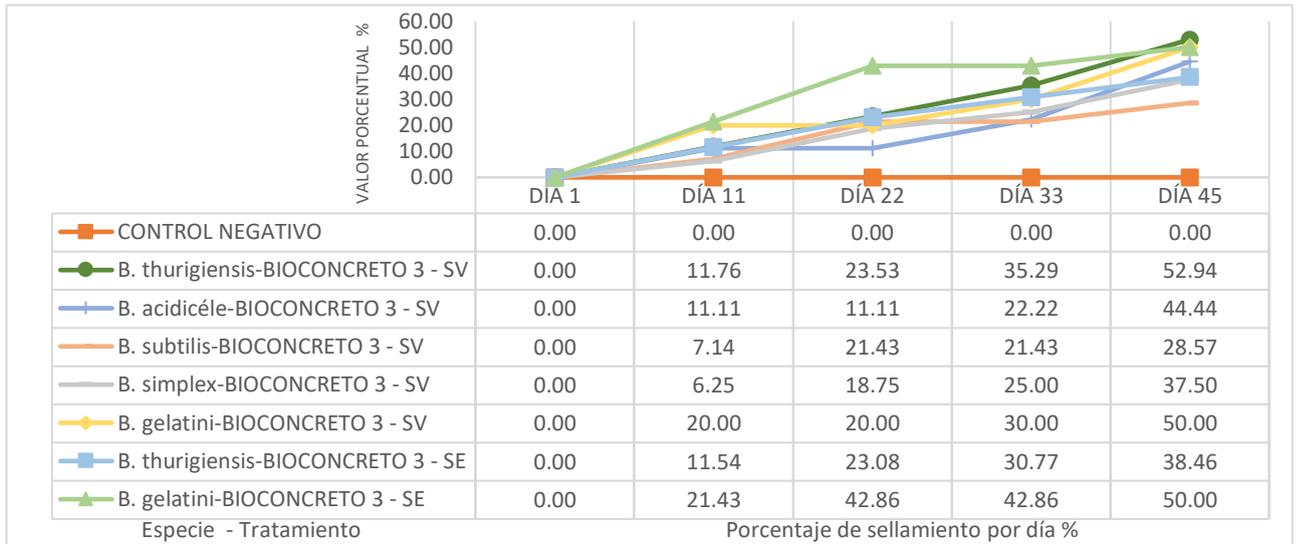


Figura 12. Porcentajes de sellamiento de fisuras en bioconcreto 3 por bacterias precipitadoras de CaCO_3 *SV: Solución de células vegetativas, SE: Solución de esporas

En la condición de bioconcreto 3, que se preparó con una mezcla de solución bacteriana, arena fina, cemento y sustrato (CaCl_2); y con un tratamiento de fisuras en concreto utilizándose la solución de células vegetativas / esporas de la bacteria a una concentración de 0,5 de McFarland. Se determinó que la bacteria *B. thuringiensis* (UNC4) logró sellar un 52,94 % de las fisuras en concreto con tratamiento de solución de células vegetativas, seguidamente la bacteria *B. gelatini* (RCN4) selló hasta el 50 % tanto en el tratamiento con solución de células vegetativas como también con solución de esporas, tal como se muestra en la figura 12.

4.1.5. Características microbiológicas de bacterias precipitadoras de CaCO_3

Cada uno de los aislados fue caracterizado a nivel macroscópico y microscópico tal como

se muestra en las imágenes de la figura 7. También se evaluó el perfil bioquímico de cada aislamiento, con los datos obtenidos se logró identificar las especies mediante el uso del software ABIS online, tal como se describe en las tablas 7, 8 y 9.

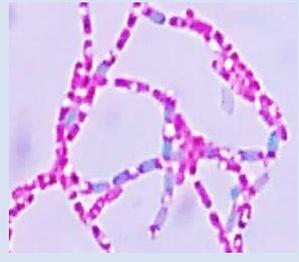
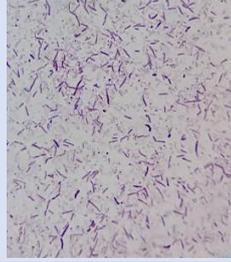
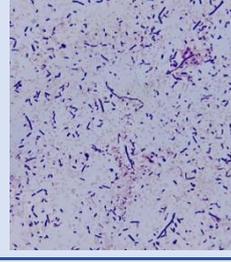
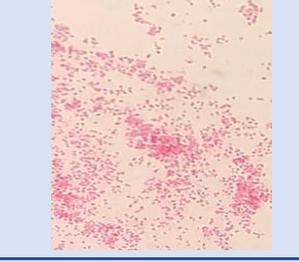
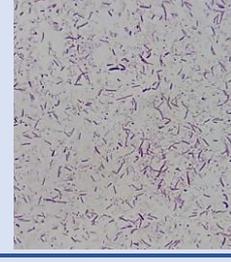
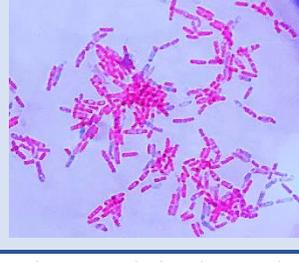
Código de aislamiento	Características macroscópicas	Características microscópicas (Aumento: 1000 X)	
	Morfología de la colonia en medio sólido LB alcalino	Coloración Gram	Coloración de esporas
UNC4			
HRT2			
CNS1			
RCN1			
RCN4			

Figura 13. Características macroscópicas y microscópicas de bacterias precipitadoras de CaCO_3 provenientes de suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca

Tabla 8. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de bacterias precipitadoras de CaCO₃.

Código de aislamiento	Características macroscópicas de la colonia							Características microscópicas		
	Tiempo (h)	Color	Borde	Forma	Elevación	Superficie	Diámetro (cm)	Gram (+/-)	Esporas (+/-)	Ubicación
UNC4	48	Crema	Entero	Circular	Plana	Rugosa	0,4	+	+	Central
HRT2	48	Crema	Ondulado	Irregular	Elevada	Cremosa	0,4	+	-	-
CNS1	48	Blanco	Entero	Circular	Convexa	Rugosa	0,1	+	-	-
RCN1	48	Blanco	Entero	Circular	Elevada	Rugosa	0,1	+	-	-
RCN4	48	Crema	Entero	Circular	Elevada	Lisa	0,2	+	+	Terminal

Tabla 9. Características microscópicas y bioquímicas de bacterias precipitadoras de CaCO₃.

N°	Pruebas para identificación bioquímica	Código de aislamiento				
		UNC 4	HRT 2	CNS 1	RCN 1	RCN 4
1	<i>Gram positivos</i>	+	+	+	+	+
2	<i>Motilidad</i>	+	-	+	+	+
3	<i>Espora central</i>	+	-	-	-	-
4	<i>Espora terminal</i>	-	-	-	-	+
5	<i>Hidrólisis de esculina</i>	+	+	+	+	+
6	<i>ONPG - β-galactosidasa</i>	-	-	+	-	-
7	<i>Catalasa</i>	+	+	+	+	+
8	<i>Oxidasa</i>	-	+	-	-	-
9	<i>Ureasa</i>	-	-	-	-	-
10	<i>Lisina descarboxilasa</i>	-	-	+	-	-
11	<i>Ornitina descarboxilasa</i>	-	-	+	-	-
12	<i>Producción de indol</i>	-	-	-	-	-
13	<i>Utilización de citrato</i>	+	-	+	-	-
14	<i>Reducción de nitratos</i>	+	-	+	-	-
15	<i>Prueba de Voges-Proskauer</i>	+	+	+	+	+
16	<i>Producción de ácido a partir de: L- arabinosa</i>	-	-	+	-	-
17	<i>Producción de ácido a partir de: Glucosa</i>	+	+	+	+	+
18	<i>Producción de ácido a partir de: Inositol</i>	-	-	+	-	-
19	<i>Producción de ácido a partir de: Maltosa</i>	+	-	+	-	-
20	<i>Producción de ácido a partir de: Melibiosa</i>	-	-	+	-	-
21	<i>Producción de ácido a partir de: Rafinosa</i>	-	-	+	-	-
22	<i>Producción de ácido a partir de: Rhamnosa</i>	-	-	+	-	-
23	<i>Producción de ácido a partir de: Sorbitol</i>	-	-	+	-	-
24	<i>Producción de ácido a partir de: Sacarosa</i>	+	+	+	+	-

Tabla 10. Identificación de bacterias precipitadoras de CaCO₃ en el software ABIS online (Apéndice N° 7).

N°	Código de aislamiento	Identificación bioquímica	
		Especie	% Similitud
1	UNC4	<i>Bacillus thuringiensis</i>	96,20 %
2	HRT2	<i>Bacillus acidicele</i>	86,40 %
3	CNS1	<i>Bacillus subtilis</i>	75,40 %
4	RCN1	<i>Bacillus simplex</i>	79,90 %
5	RCN4	<i>Bacillus gelatini</i>	82,7 %

4.1.6. Evaluación de diferencias entre grupos: grupos experimentales y bacterias precipitadoras de CaCO₃

Para el análisis estadístico se consideró la variable dependiente del sellamiento, el cual es la diferencia de la medida del ancho de la fisura entre el pretratamiento (Día 1) y postratamiento (Día 45). En el diagrama de cajas agrupado se logró observar las diferencias en la mediana y la dispersión entre los grupos presentados en el sellamiento por el tratamiento con solución vegetativa y de esporas, tal como se muestran en las figuras 14 y 15 respectivamente.

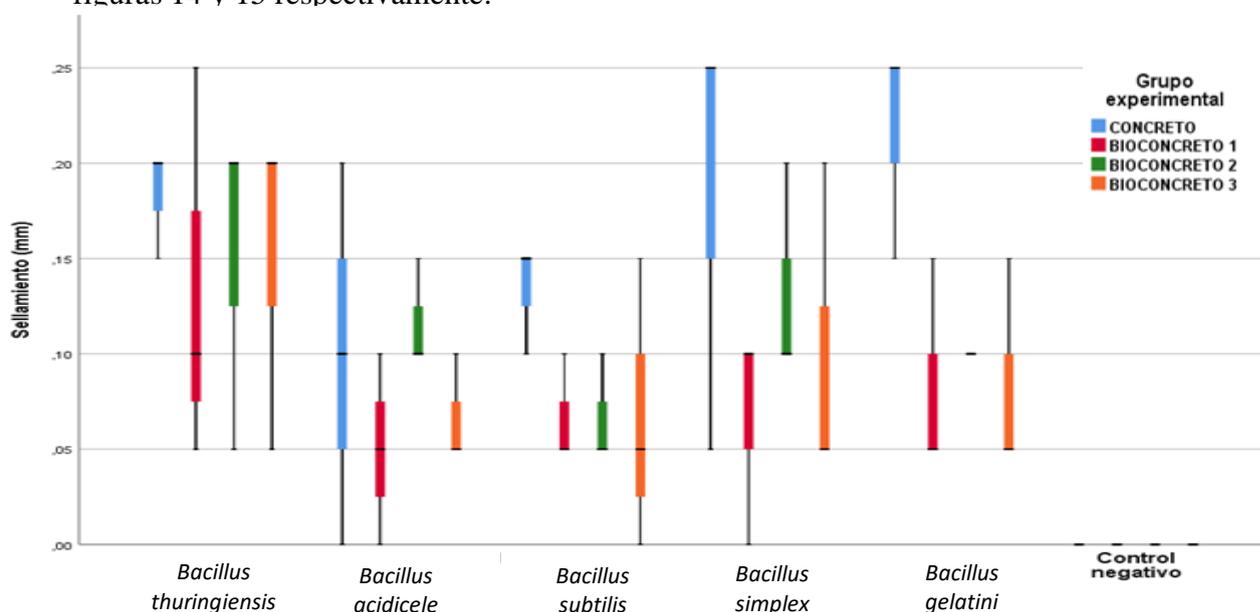


Figura 14. Diagrama de cajas agrupado de sellamiento de fisuras por especie por grupo experimental – Tratamiento con solución vegetativa

En el tratamiento con solución vegetativa resalta el grupo experimental Concreto, donde *B. thuringiensis* posee un menor rango entre sus datos, por lo tanto, tiene una

menor dispersión de datos; a diferencia de *B. simplex* y *B. gelatini* que tienen una mayor mediana con 0,25 mm de sellamiento, pero poseen una caja más grande, lo cual significa que tiene una mayor variabilidad entre sus datos (Figura 14). Mientras que el tratamiento con solución de esporas prevalece el grupo experimental bioconcreto 3, destacándose *B. thuringiensis* con una mediana de 0,15 mm de sellamiento, sin cruzamiento con otras medianas y con un menor tamaño de caja, reflejando menos variabilidad entre los datos a diferencia de los otros grupos experimentales (Figura 15).

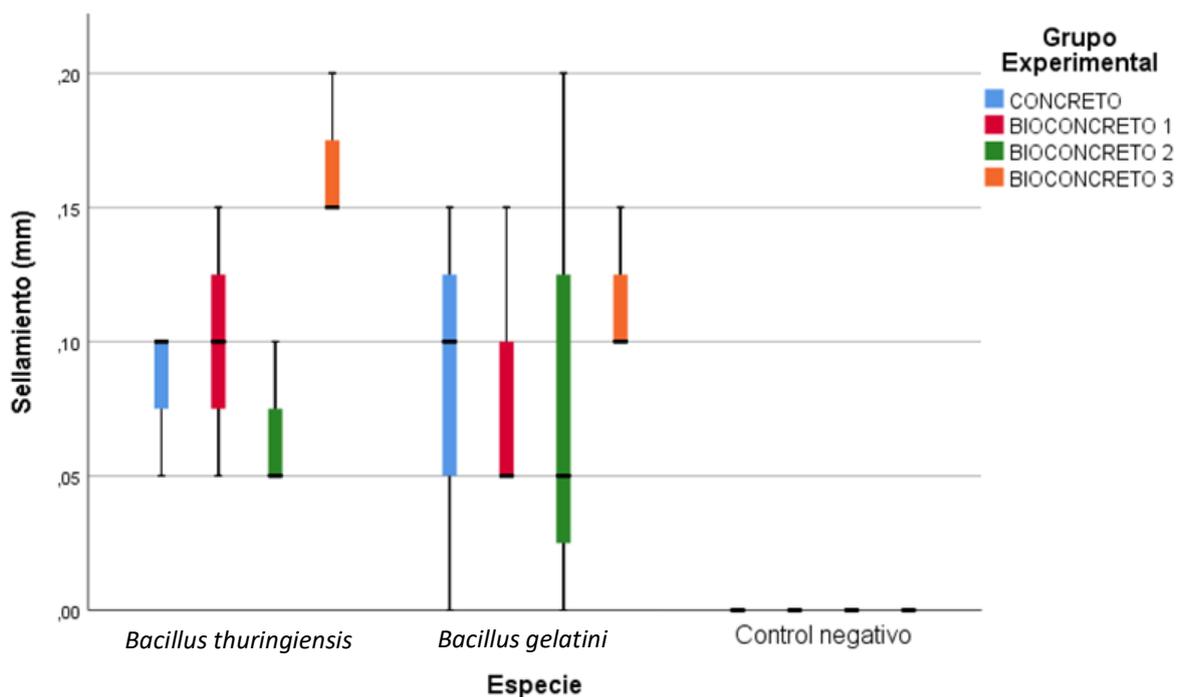


Figura 15. Diagrama de cajas agrupado de sellamiento de fisuras por especie por grupo experimental – Tratamiento con solución de esporas

Para la solución vegetativa mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov se determinó que los datos tienen una distribución normal ($p < 0,05$); mientras que, para la solución de esporas, en la prueba de Shapiro-Wilk se obtuvo que los datos no cumplen una distribución normal ($p < 0,05$). Como en el tratamiento con solución de esporas, no se observó una distribución normal en los datos, se aplicó la prueba de homogeneidad de varianzas, donde se concluyó que las varianzas de los grupos son iguales ($p > 0,05$), por lo tanto, se procedió a realizar las pruebas paramétricas para ambos tratamientos, ya que

la potencia del análisis no paramétrico no permitió visualizar mejor las diferencias significativas que se lograron ver con las pruebas paramétricas. En el análisis de varianza (ANOVA univariado), en el tratamiento con solución vegetativa se observó que las variables de especie y grupo experimental tienen un efecto importante de manera independiente, sin embargo, la combinación de ambas variables no es significativa ($p > 0,05$), por lo tanto, al combinar ambas variables el efecto es irrelevante y el resultado de un posterior análisis sale igual. Mientras que, en el tratamiento con solución de esporas, solo la especie es diferente significativamente ($p < 0,05$) de manera independiente, tal como se describe en la Tabla 11.

Tabla 11. Pruebas de efectos inter-sujetos, con variable dependiente el sellamiento (mm), en tratamiento con solución vegetativa/esporas

Origen	Solución vegetativa		Solución de esporas	
	F	p valor	F	p valor
Modelo corregido	3,026	0,001	4,114	0,002
Intersección	175,240	0,000	71,258	0,000
Especie*	9,387	0,000*	18,032	0,000*
Grupo experimental*	4,625	0,006*	1,667	0,201
Especie * Grupo experimental	0,587	0,871	0,699	0,653

* Prueba ANOVA univariado ($p < 0,05$)

Fuente: Resultados del análisis estadístico en IBM SPSS Statistics versión 25.

En la prueba de Dunnett todas las cepas del tratamiento con solución vegetativa/esporas, mostraron un promedio de reducción de fisuras superior al control negativo (Tabla 12), debido a que el valor $p < 0,05$, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que el tratamiento de fisuras de cada especie bacteriana tiene un efecto significativo en comparación con el control negativo.

Asimismo, en la prueba de Scheffé se vio diferencia significativa entre los grupos presentados, determinándose que en el tratamiento con solución vegetativa las tres especies *B. simplex*, *B. gelatini* y *B. thuringiensis*, fueron significativamente mayores que el control negativo; mientras que el *B. acidicele* y *B. subtilis* resultaron similares al control negativo (Tabla 13). Sin embargo, en el tratamiento con solución de esporas las especies

B. thuringiensis y *B. gelatini* son diferentes significativamente mayores al control negativo (Tabla 13). Los datos de la tabla 13 de subconjuntos homogéneos se derivaron de las tablas de diferencias observadas en los apéndices 9 y 10 según corresponda.

Tabla 12. Comparación del control negativo con las especies mediante la prueba de T de Dunnett (bilateral)^a con variable dependiente el sellamiento (mm), en tratamiento con solución vegetativa/esporas.

(I) Especie	(J) Control negativo (CN)	Solución vegetativa				Solución de esporas			
		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	p valor	IC al 95 %	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	p valor	IC al 95 %
<i>B. thuringiensis</i>	CN	0,1542*	0,02453	0,000	0,0904 - 0,2180	0,1042*	0,01894	0,000	0,0597 - 0,1487
<i>B. acidicele</i>	CN	0,0833*	0,02453	0,006	0,0195 - 0,1471				
<i>B. subtilis</i>	CN	0,0833*	0,02453	0,006	0,0195 - 0,1471				
<i>B. simplex</i>	CN	0,1208*	0,02453	0,000	0,0570 - 0,1846				
<i>B. gelatini</i>	CN	0,1208*	0,02453	0,000	0,0570 - 0,1846	0,0917*	0,01894	0,000	0,0472 - 0,1362

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

IC: Intervalo de confianza, $p < 0,05$

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Fuente: Resultados del análisis estadístico en IBM SPSS Statistics versión 25.

Tabla 13. Resumen de comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé* entre las especies y el control negativo con tratamiento de solución vegetativa y solución de esporas.

Especie	N	Solución vegetativa		Solución de esporas	
		Subconjunto		Subconjunto	
		1	2	1	2
Control negativo	12	0,0000		0,0000	
<i>B. acidicele</i>	12	0,0833	0,0833		
<i>B. subtilis</i>	12	0,0833	0,0833		
<i>B. simplex</i>	12		0,1208		
<i>B. gelatini</i>	12		0,1208		0,0917
<i>B. thuringiensis</i>	12		0,1542		0,1042
Sig.		0,059	0,161	1,000	0,806

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

*Prueba post hoc: Scheffé

Fuente: Resultados del análisis estadístico en IBM SPSS Statistics versión 25.

Se demostró además que los 3 grupos experimentales bioconcreto 2, 3 y 1, fueron similares en el tratamiento con solución vegetativa, así como en concreto y bioconcreto

2. Aunque la única diferencia se dio entre bioconcreto 3 y 1 con concreto, observándose mejor promedio en el concreto (0,1361 mm de curación de fisura), tal como se presenta en la tabla 14. Sin embargo, en el tratamiento con solución de esporas los 4 grupos experimentales son similares (Tabla 14).

Tabla 14. Resumen de comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé entre los grupos experimentales con tratamiento de solución vegetativa (Apéndice N° 11) y solución de esporas (Apéndice N° 12).

Solución vegetativa				Solución de esporas		
Grupo experimental	N	Subconjunto		Grupo experimental	N	Subconjunto 1
		1	2			
Bioconcreto 1	18	0,0667		Bioconcreto 2	9	0,0500
Bioconcreto 3	18	0,0778		Concreto	9	0,0556
Bioconcreto 2	18	0,0944	0,0944	Bioconcreto 1	9	0,0611
Concreto	18		0,1361	Bioconcreto 3	9	0,0944
Sig.		0,592	0,242	Sig.		0,274

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

*Prueba post hoc: Scheffé

Fuente: Resultados del análisis estadístico en IBM SPSS Statistics versión 25

La combinación del grupo experimental de concreto con la especie *B. thuringiensis* es significativo, porque el $p < 0,05$, concluyéndose que hay diferencia entre el día 1 y el día 45 de tratamiento con solución vegetativa, y el valor de t es 11; resaltándose que el día 1 es significativamente mayor en promedio que el día 45; de manera similar la especie *B. subtilis* es significativo con un valor de $t = 8$. Asimismo, en el grupo experimental bioconcreto 2 la especie *B. acidicele* es significativo con un valor de $t = 7$, tal como se observa en la tabla 15. Por lo tanto, la variación del día 1 al día 45 de tratamiento con solución vegetativa, solamente es significativo en concreto para las especies: *B. thuringiensis* y *B. subtilis*, y para bioconcreto 2 la especie *B. acidicele* (Tabla 15).

En el tratamiento de fisuras con solución de esporas, considerándose la combinación del

grupo experimental bioconcreto 3 con las especies *B. thuringiensis* y *B. gelatini*, se observa que el valor t es 10 y 7 respectivamente; seguidamente el grupo experimental concreto con la especie *B. thuringiensis* tiene un valor de $t = 5$ (Tabla 16); por lo tanto, se concluye que el día 1 es significativamente mayor en promedio que el día 45 en ambas especies en los grupos experimentales mencionados. Las tablas 15 y 16 son el resumen que derivan de los apéndices 13 y 14.

Tabla 15. Resumen de prueba de muestras emparejadas en los grupos experimentales en el tratamiento con solución vegetativa de bacterias precipitadoras de CaCO_3 .

Grupo experimental	Especie	Diferencia	Desv.		t	Sig. (bilateral)
			Media	Desviación		
Concreto	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1833333	0,0288675	11,000	0,008*
	<i>Bacillus acidicele</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1000000	0,1000000	1,732	0,225
	<i>Bacillus subtilis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1333333	0,0288675	8,000	0,015*
	<i>Bacillus simplex</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1833333	0,1154701	2,750	0,111
	<i>Bacillus gelatini</i>	Dia 1 - Dia 45	0,2166667	0,0577350	6,500	0,023*
Bioconcreto 1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1333333	0,1040833	2,219	0,157
	<i>Bacillus acidicele</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0500000	0,0500000	1,732	0,225
	<i>Bacillus subtilis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0666667	0,0288675	4,000	0,057
	<i>Bacillus simplex</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0666667	0,0577350	2,000	0,184
	<i>Bacillus gelatini</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0833333	0,0577350	2,500	0,130
Bioconcreto 2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1500000	0,0866025	3,000	0,095
	<i>Bacillus acidicele</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1166667	0,0288675	7,000	0,020*
	<i>Bacillus subtilis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0666667	0,0288675	4,000	0,057
	<i>Bacillus simplex</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1333333	0,0577350	4,000	0,057
Bioconcreto 3	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1500000	0,0866025	3,000	0,095
	<i>Bacillus acidicele</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0666667	0,0288675	4,000	0,057
	<i>Bacillus subtilis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0666667	0,0763763	1,512	0,270
	<i>Bacillus simplex</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1000000	0,0866025	2,000	0,184
	<i>Bacillus gelatini</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0833333	0,0577350	2,500	0,130

* Prueba de Scheffé ($p < 0,05$). **Fuente:** Resultados del análisis estadístico en IBM SPSS Statistics

versión 25.

Tabla 16. Resumen de prueba de muestras emparejadas en los grupos experimentales en el tratamiento con solución de esporas de bacterias precipitadoras de CaCO₃.

Grupo experimental			Desv.		t	Sig. (bilateral)
			Media	Desviación		
Concreto	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Día 1 - Día 45	0,0833333	0,0288675	5,000	0,038*
	<i>Bacillus gelatini</i>	Día 1 - Día 45	0,0833333	0,0763763	1,890	0,199
Bioconcreto 1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Día 1 - Día 45	0,1000000	0,0500000	3,464	0,074
	<i>Bacillus gelatini</i>	Día 1 - Día 45	0,0833333	0,0577350	2,500	0,130
Bioconcreto 2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Día 1 - Día 45	0,0666667	0,0288675	4,000	0,057
	<i>Bacillus gelatini</i>	Día 1 - Día 45	0,0833333	0,1040833	1,387	0,300
Bioconcreto 3	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Día 1 - Día 45	0,1666667	0,0288675	10,000	0,010*
	<i>Bacillus gelatini</i>	Día 1 - Día 45	0,1166667	0,0288675	7,000	0,020*

* Prueba de Scheffé ($p < 0,05$). **Fuente:** Resultados del análisis estadístico en IBM SPSS Statistics versión 25.

4.2. Discusión

Este estudio tuvo como finalidad la caracterización microbiológica de bacterias precipitadoras de CaCO_3 aisladas de suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca, de donde resulta que 5 aislamientos lograron precipitar CaCO_3 ; demostrándose así su potencial biotecnológico en la bioprecipitación de CaCO_3 , evidenciándose en su producción en medio sólido B4 y en el sellamiento de fisuras en cubos de concreto mediante los diferentes grupos experimentales.

Una de las características importantes considerados en este estudio fue el tipo de suelo, donde en el suelo ureico se esperaba aislar bacterias ureolíticas que por su metabolismo precipitan CaCO_3 (Cui *et al.*, 2022), y en el suelo calcáreo a bacterias precipitadoras de CaCO_3 por su alta composición de calcita, donde este es un polimorfo de CaCO_3 (Imbellone *et al.*, 2014); de manera que en ambos tipos de suelos característicos se evaluó la presencia de bacterias de interés. Además, dos de los suelos ureicos considerados en este estudio fueron agrícolas, considerándose por la presencia de urea debido a la descomposición de materia orgánica o a su aplicación como fertilizante. Sin embargo, las especies bacterianas en este estudio, a pesar su origen y pH (Tabla 6), se determinaron como no ureolíticas y alcalinas, considerándose aptas para su evaluación en la bioprecipitación de CaCO_3 .

Otra característica importante fue el pH, donde el pH de los suelos evaluados perteneció a un rango de 5 – 7 (Tabla 6), rango que predomina en suelos agrícolas debido a la actividad microbiana, influyéndose de esta manera en los procesos como la nitrificación y la descomposición de la materia orgánica para tener una mejor disponibilidad de nutrientes propicios para el crecimiento de las plantas; y en los suelos calcáreos el pH suele estar entre 7,2 y 8,4 por la presencia de carbonatos de

calcio y magnesio. Sin embargo, según Valencia *et al.*, 2014, las especies bacterianas precipitadoras de CaCO_3 se desarrollan a un pH alcalino, y de acuerdo con Shaheen *et al.*, 2023 el medio LB tuvo un pH de 10, con el propósito de aislar bacterias precipitadoras de CaCO_3 en un medio alcalino; debido a que ya se demostraron en estudios previos que las bacterias expuestas a un medio alcalino tienen una mayor actividad precipitadora en un pH óptimo de 10.

En primer lugar, los niveles de pH no deben ser muy bajos porque el carbonato en estas condiciones se disuelve y no logra precipitarse (Chaparro *et al.*, 2018). En segundo lugar, el pH del medio aumenta a causa de la actividad enzimática y el metabolismo bacteriano (Achal y Pan, 2010; Xu *et al.*, 2014). En tercer lugar, en la vía activa del metabolismo bacteriano, el aumento del pH está influenciado por la oxidación de ácidos orgánicos y el nivel de concentración de DIC, induciéndose así la precipitación de CaCO_3 (Braissant, Verrecchia y Aragno, 2002).

La formación de CaCO_3 se evidenció mediante la producción de halos blanquecinos alrededor de las colonias bacterianas inoculadas en medio B4 tal como se muestra en la figura 6; así también, un estudio realizó la evaluación de la precipitación de CaCO_3 en agar CPM (medio precipitado de calcio: medio B4 modificado) donde la zona del halo del precipitado blanco fue raspado y evaluado con $\text{HCl}_{(aq)}$ para confirmar aún más la presencia de CaCO_3 (Shaheen *et al.*, 2021). De la misma forma, en nuestro estudio se ha confirmado la presencia de CaCO_3 al reaccionar con $\text{HCl}_{(aq)}$ al 10 %, así como se muestra en las fotografías de la figura 6.

Para comprender mejor el metabolismo de estas bacterias precipitadoras de CaCO_3 , debemos tener en cuenta que las bacterias alcalinas heterotróficas inducen su precipitación mediante la utilización de las vías pasivas y activas. En este contexto, las 5 bacterias evaluadas en nuestro estudio, al ser no ureolíticas, utilizaron la vía

activa, constituida por la oxidación de la materia orgánica en presencia de O₂ y Ca⁺²; ya que en la vía pasiva las bacterias ureolíticas utilizan el ciclo del azufre y el ciclo del nitrógeno obteniéndose como subproducto el amoníaco, donde aquel compuesto es perjudicial para el medio ambiente (Shaheen *et al.*, 2021).

El software ABIS online es una herramienta importante para la identificación de bacterias, basada en su morfología, características bioquímicas y de cultivo, incluso en su ecología y datos de patogenicidad (Sorescu y Stoica 2021); generándose así resultados confiables con un alto porcentaje de identidad (Tabla 10 - Apéndice N° 7). Mediante este software se determinó que las especies bacterianas de nuestro estudio pertenecen al género *Bacillus*, bacilos gram positivos donde la mayoría de estas bacterias son capaces de formar esporas, permitiéndoles tener más resistencia frente a entornos hostiles como la sequía y la congelación; incluso las esporas pueden entrar en periodo de latencia de cientos a miles de años (Chen *et al.*, 2019).

Todos los aislamientos de nuestro estudio fueron bacilos gram positivos y las especies bacterianas *B. thuringiensis* y *B. gelatini* presentaron esporas tal como se muestran en las fotografías de la figura 7. Similarmente se ha descrito las características morfológicas bacterianas de nuestro estudio como colonias liqueniformes en medio LB, además varían desde la forma circular a irregular, con bordes desde enteros a ondulados, crenados o fimbriados, además tienen una textura mate o granular, también son lisas y húmedas en algunas especies identificadas en nuestro estudio (A. Logan y De Vos, 2015).

Como se describió anteriormente, las especies bacterianas de nuestro estudio se determinaron como no ureolíticas; sin embargo, en otros estudios identificaron bacterias ureolíticas aisladas de los suelos calcáreos en base a la producción de ureasa como *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* y *Lysinibacillus*

fusiformis (Dhami 2013). En contraste con otro estudio que determinó a las especies de *Lysinibacillus sphaericus*, *B. subtilis* y *Pseudomonas putida*, con capacidad de precipitar CaCO₃ en medio B4 (Aiko Shirakawa *et al.*, 2011); además, en otro estudio lograron identificar a las especies de *Stenotrophomonas maltophilia*, *B. simplex* y *Rhodococcus degradans* como precipitadoras de CaCO₃ (Enyedi *et al.*, 2020). En síntesis, las especies bacterianas concordantes con nuestro estudio son *B. thuringiensis*, *B. subtilis* y *B. simplex*, mostrándose así que el género *Bacillus* es predominante en el estudio de la precipitación de CaCO₃.

Cabe resaltar que la identificación bacteriana fue realizada a nivel bioquímico y microbiológico, precisamente la bacteria *B. thuringiensis* obtuvo un 96,20 % de similitud, obteniéndose el porcentaje más alto de las 5 bacterias estudiadas (Tabla 10); por tanto, no se logró alcanzar un 100 % de similitud en su identificación bacteriana en el software ABIS online. Razón por la cual se recomienda que en estudios posteriores se realice la identificación molecular mediante el secuenciamiento del gen 16S ARNr a bacterias precipitadoras de CaCO₃, considerándose este método el más rápido y preciso en comparación con la identificación bioquímica y microbiológica (Enyedi *et al.*, 2020); además, se recomienda utilizar como marcador molecular el gen *tuf*, por su alta precisión en el análisis filogenómico a nivel de especie, debido a la variabilidad natural de la estructura de la comunidad del género *Bacillus* (Xu *et al.*, 2023), lográndose así una mejor precisión de especiación con la finalidad de estudiar el metabolismo microbiano de las especies bacterianas de nuestro estudio.

Las especies bacterianas de nuestro estudio se destacaron por su producción de CaCO₃, demostrándose que en 15 días pueden producir una considerable cantidad de CaCO₃; en primer lugar, la bacteria *B. thuringiensis* produjo 47 mg /2 mL de CaCO₃

en 15 días, sobresaliéndose de entre las especies bacterianas de nuestro estudio; en segundo lugar, la bacteria *B. subtilis* produjo 26 mg /2 mL de CaCO₃, donde esta especie fue la que produjo menor CaCO₃ de las 5 bacterias de nuestro estudio (Figura 8). En contraste con otro estudio que determinaron que las cepas B14 y D2, produjeron en 3 semanas 40 mg de CaCO₃ en medio B4 (Zamarreño *et al.*, 2009). Por consiguiente, a diferencia de los tiempos que se realizó para determinar el peso de cada uno de los precipitados en estos estudios, se evidencia que en nuestro estudio la bacteria *B. thuringiensis* presentó un mayor precipitado de CaCO₃ que el otro estudio mencionado.

Otro estudio determinó la producción de CaCO₃ obtenido por las cepas bacterianas inoculadas en 100 mL de caldo nutritivo, donde podemos inferir que, en 2 mL de caldo, la bacteria ureolítica *B. lincheniformis* produjo 10 mg de CaCO₃ en 14 días (Šovljanski *et al.*, 2021). Asimismo, en otro estudio evaluó la precipitación de CaCO₃ en 1 L de caldo nutritivo suplementado con 2 % de urea y CaCl₂, por lo que se infiere que en 2 mL de caldo nutritivo la bacteria ureolítica *B. megaterium* MTCC 1684 en 7 días produjo 2,16 mg de CaCO₃ (Krishnapriya, Venkatesh Babu y G. 2015). Mientras que en nuestro estudio la bacteria no ureolítica *B. thuringiensis* produjo 15,5 mg de CaCO₃ en 2 mL de caldo B4 en 7 días, cabe resaltar que en este proceso no ureolítico la bacteria utiliza la vía activa, al ser este proceso más eficiente que la vía pasiva que incluye la ureólisis.

Por lo tanto, es imprescindible realizar más estudios referentes al metabolismo microbiano en la vía activa, porque además de ser una opción ecoamigable con el medio ambiente, es también un proceso ideal para la precipitación de CaCO₃ en la matriz cementosa, debido a que en el concreto el pH es alcalino, y en muchas ocasiones las bacterias no ureolíticas pueden estar impedidas de realizar la

precipitación de CaCO_3 porque la ureólisis se desarrolla en un pH 9, en pH 10 no pueden lograr con éxito la precipitación esperada (Shaheen *et al.*, 2021).

De manera semejante, en las imágenes mostradas en la figura 8 se puede notar que las bacterias lograron sellar mejor la fisura en el grupo experimental de concreto, así como también se muestra en el diagrama de cajas (Figura 14), donde los cubos han sido preparados con agua, arena fina y cemento, mezcla que define la forma tradicional que se utiliza en la industria de la construcción. Por lo tanto, estas bacterias pueden ser útiles para el tratamiento de fisuras en concreto tradicional.

B. thuringiensis logró sellar hasta un 50 % con solución vegetativa después de 45 días de tratamiento en el grupo experimental de Concreto (Figura 9), seguidamente la bacteria *B. gelatini* llegó a sellar un 38,24 % en los cubos de concreto. Además *B. thuringiensis*, *B. gelatini* y *B. simplex* fueron significativamente mayores al control negativo en el tratamiento con solución vegetativa (Tabla 12). No obstante, las especies bacterianas *B. thuringiensis* y *B. gelatini* fueron significativamente diferentes al control negativo en el tratamiento con solución de esporas (Tabla 13).

Asimismo, durante el tratamiento con soluciones vegetativas en el grupo experimental de concreto prevalecen las especies *B. thuringiensis* y *B. subtilis* y en el grupo experimental de bioconcreto 2 predomina *B. acidicele* (Tabla 15). Mientras que para el tratamiento con solución de esporas predomina el grupo experimental de Bioconcreto 3 tanto para *B. thuringiensis* y *B. gelatini* (Tabla 16). De manera que se concluye que las esporas de estas bacterias rinden mejor en presencia de un sustrato (CaCl_2) para lograr precipitar CaCO_3 , al sellar las fisuras a un 52,94 % después de 45 días de tratamiento; tal como se evidencia en la figura 12.

Esto nos sugiere que el concreto puede ser preparado previamente con las soluciones

de esporas de estas bacterias y sustrato (CaCl_2), y en caso de generarse fisuras en el concreto más adelante, estas fisuras pueden ser tratadas con la aplicación de agua potable, induciéndose así la precipitación de CaCO_3 , y de esta forma contribuir en la minimización del efecto invernadero y explotación de recursos naturales. El estudio de *B. gelatini* en la bioprecipitación es un nuevo indicio para estudiar mejor a esta especie bacteriana, ya que no se han registrado estudios que demuestren su potencial en la precipitación de CaCO_3 .

La precipitación de CaCO_3 se ha estudiado en diferentes tipos de suelos, por ejemplo, en un estudio donde se aisló bacterias de un travertino identificándose como *B. thuringiensis*, y con el objetivo de cementar la arena se demostró que tiene una mayor producción de CaCO_3 en las muestras de arena, por consiguiente, puede llenar y cementar bien las partículas de arena (Xiao, Deng y Li 2023). Demostrándose una vez más el papel fundamental de *B. thuringiensis* en la biomineralización de CaCO_3 y su potencial biotecnológico para optimizar la producción de CaCO_3 .

En síntesis, se demostró la mayor eficiencia de las especies bacterianas *B. thuringiensis* y *B. gelatini* en el tratamiento de los grupos experimentales de concreto y bioconcreto 3, según corresponda; lo que nos proporciona nuevas propuestas de desarrollo de bioconcretos para así reducir la dependencia a los productos químicos en los procesos de tratamiento de fisuras en concreto, de esta manera logra ser una solución sostenible y medioamigable en el mantenimiento de las construcciones.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se caracterizó microbiológicamente a 5 bacterias precipitadoras de CaCO_3 , selladoras de fisuras en cubos de concreto aisladas de suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca
- Se caracterizó a *Bacillus thuringiensis* como la especie bacteriana más eficiente, al producir 47 mg/2mL de CaCO_3 durante 15 días; obteniéndose además una diferencia significativamente mayor de sellamiento ($p < 0,05$) en tratamiento de fisuras en cubos de concreto con solución vegetativa en el grupo experimental concreto y en tratamiento con solución de esporas en el grupo experimental bioconcreto 3 durante 45 días. Además, *Bacillus gelatini* logró producir 38 mg/2mL de CaCO_3 en medio líquido B4 durante 15 días, obteniéndose un sellamiento significativamente mayor ($p < 0,05$) en el tratamiento de fisuras en cubos de concreto con solución de esporas en el grupo experimental de bioconcreto 3.
- Las especies precipitadoras de CaCO_3 y selladoras de fisuras en cubos de concreto aisladas de suelos ureicos y calcáreos de la provincia de Cajamarca fueron: *Bacillus thuringiensis* (39,25 %), *Bacillus gelatini* (39,12 %), *Bacillus simplex* (34,24 %), *Bacillus acidicele* (33,25 %) y *Bacillus subtilis* (31,51 %)
- Las especies bacterianas identificadas fueron: *Bacillus thuringiensis* (96,20 %), *Bacillus acidicele* (86,40 %), *Bacillus subtilis* (75,40 %), *Bacillus simplex* (79,90 %) y *Bacillus gelatini* (82,70 %) con sus respectivos porcentajes de similitud obtenidos en el software ABIS online.

5.2. Recomendaciones

- Evaluar el sellamiento de fisuras en concreto a diferentes concentraciones de solución vegetativa/esporas, en los diferentes ensayos considerados en este estudio, para una mejor evaluación del rendimiento de cada bacteria en la precipitación de CaCO_3 .
- Considerar la identificación molecular en estudios posteriores para un mejor estudio del metabolismo microbiano implicado en la precipitación de CaCO_3 . De igual manera, se debería realizar el secuenciamiento del genoma completo para determinar los mecanismos responsables de la precipitación de CaCO_3 .
- Realizar un mapeo de espectrometría de rayos X de energía dispersiva (EDS) del CaCO_3 precipitado por las bacterias de nuestro estudio, para confirmar la presencia y pureza del mismo. De igual modo, realizar la microscopía electrónica de barrido (SEM) para obtener imágenes de alta resolución de la superficie (morfología y topografía) de la fisura en el concreto, y de esta manera visualizar mejor el sellamiento de las fisuras con la acumulación del CaCO_3 precipitado por las bacterias.

Referencias Bibliográficas

- Acevedo Macías, A., (2019). Síntesis de CaCO₃ poroso para la precipitación química de fosfato en sistemas en lote. Tesis para maestría, *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica*, A.C. Disponible en: <http://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1010/2186>
- Achal, V. y Pan, X. (2010). Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation. *Current Microbiology*, 62(5), 894–902.
- Águila Arbolález, I., (2023). Presente y futuro de la tecnología del concreto. La experiencia del IDEC. En: tecnología constructiva TC-05, 21 de agosto de 2023, Caracas, Venezuela. Caracas: *Universidad Central de Venezuela*. p. 15. Disponible en: https://trienal.fau.ucv.ve/2017/publicacion/articulos/TC/extenso/TIFAU2017_Extenso_TC-05_IAGuila.pdf
- Agroenlace, (2024). ¿Qué Es Estiércol Y Cómo Mejora La Calidad Del Suelo? [en línea]. *Agroenlace*. Disponible en: <https://agroenlace.co/que-es-estiercol/>
- Ahmad, N. A. H., Husin, N. B., Mohd Noh, N. I. y Zakaria, Z., (2023). Enhancing biocement precipitation potential of locally isolated soil ureolytic bacteria using seawater. *Materials today: proceedings* [en línea]. Disponible en: doi: 10.1016/j.matpr.2023.11.011
- Aiko Shirakawa, M., Alba Cincotto, M., Atencio, D., C Gaylarde, C. y M John, V., (2011). Efecto del medio de cultivo sobre la biocalcificación por *Pseudomonas Putida*, *Lysinibacillus Sphaericus* y *Bacillus Subtilis*. *Braz J Microbiol* [en línea]. **42**(2). Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3769833/>

- Alarcon, E., Valdes, N., & Torres, R. (2015). Saturación del carbonato de calcio en un área de cultivo de mitilidos en el Seno Reloncavi, Patagonia norte, Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 277–281. pp. 1-2. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue2-fulltext-1>
- A. Logan, N. y De Vos, P., (2015). *Bacillus*. *Wiley Online Library* [en línea]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.gbm00530>
- Amer Algaifi, H., Abu Bakar, S., Rahman Mohd. Sam, A., Ismail, M., Razin Zainal Abidin, A., Shahir, S., & Ali Hamood Altowayti, W. (2020). Insight into the role of microbial calcium carbonate and the factors involved in self-healing concrete. *Construction and Building Materials*, 254, 119258. pp. 3-6. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.119258>
- Aristizabal Vásquez, D. Y., Caicedo Pineda, G. A., Prada Fonseca, M. C., Casas Botero, A. E., & Martínez Tejada, H. V. (2017). Efecto del Tween® 80 sobre la bioprecipitación de carbonato de calcio por *Bacillus cereus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 116–123. pp. 116-123. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.62007>
- Asenjo Alarcón, D. E., (2019). Influencia de la incorporación del aditivo bacteriano en la reparación del proceso de fisuración controlada del concreto. Tesis para título, *Universidad Nacional de Cajamarca*. pp. 105. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.14074/3243>
- Becosan. (2021). Cemento Portland: ¿Qué es? Usos, Historia y Tipos. *BECOSAN*. <https://www.becosan.com/es/cemento-portland/>
- Bhutange, S. P., & Latkar, M. V. (2020). Microbially induced calcium carbonate precipitation in construction materials. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 32(5), 03120001. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)mt.1943-5533.0003141](https://doi.org/10.1061/(asce)mt.1943-5533.0003141)

- Bibi, S., Oualha, M., Ashfaq, M. Y., Suleiman, M. T., & Zouari, N. (2018). Isolation, differentiation and biodiversity of ureolytic bacteria of Qatar soil and their potential in microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. *RSC Advances*, 8(11), 5854–5863. <https://doi.org/10.1039/c7ra12758h>
- Braissant, O., Verrecchia, E. y Aragno, M., (2002). Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated? *Naturwissenschaften* [en línea]. **89**(8), 366–370. Disponible en: doi: 10.1007/s00114-002-0340-0
- Chaparro-Acuña, S. P., Becerra-Jiménez, M. L., Martínez-Zambrano, J. J. y Rojas-Sarmiento, H. A., (2018). Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: mechanism and applications of the process. *Acta Agronómica* [en línea]. 67(2). pp. 1-6. Disponible en: doi: 10.15446/acag.v67n2.66109
- Chen, H.-J., Peng, C.-F., Tang, C.-W. y Chen, Y.-T., (2019). Self-healing concrete by biological substrate. *Materials* [en línea]. 12(24), 4099. pp. 2. Disponible en: doi: 10.3390/ma12244099
- Choi, S.-G., Wang, K., Wen, Z. y Chu, J., (2017). Mortar crack repair using microbial induced calcite precipitation method. *Cement and Concrete Composites* [en línea]. **83**, 209–221. Disponible en: doi: 10.1016/j.cemconcomp.2017.07.013.
- Comadran-Casas, C., Schaschke, C. J., Akunna, J. C. y Jorat, M. E., (2022). Cow urine as a source of nutrients for microbial-induced calcite precipitation in sandy soil. *Journal of Environmental Management* [en línea]. 304, 114307. pp. 1. Disponible en: doi: 10.1016/j.jenvman.2021.114307
- Cui, M.-J., Teng, A., Chu, J., & Cao, B. (2022). A quantitative, high-throughput urease activity assay for comparison and rapid screening of ureolytic bacteria. *Environmental Research*, 208, 112738.

pp. 1. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112738>

Dhami, N. K., (2013). Biomineralization of Calcium Carbonate Polymorphs by the Bacterial Strains Isolated from Calcareous Sites. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [en línea]. **23**(5), 707–714. Disponible en: doi: 10.4014/jmb.1212.11087

Dhami, N. K., Reddy, M. S. y Mukherjee, A. (2014). Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterium *Sporosarcina pasteurii*. *Journal of Applied Microbiology*, 116(3), 1010–1021.

Di Salvo, F. y Suárez, S., (2020). Polimorfismo cristalino: aplicaciones en fármacos y técnicas de caracterización [en línea]. *Grupo de Química Estructural & Ingeniería Cristalina*. Disponible en: <http://qcris.qi.fcen.uba.ar/doc/polimorfismo.pdf>

Dong, Y., Gao, Z., Wang, D., Di, J., Guo, X., Yang, Z., Li, Y., Wang, Y. y Wang, Y., (2023). Optimization of growth conditions and biological cementation effect of *Sporosarcina pasteurii*. *Construction and building materials* [en línea]. 395, 132288. pp. 1-2. Disponible en: doi: 10.1016/j.conbuildmat.2023.132288

Enyedi, N.T., Makk, J., Kótai, L., Berényi, B., Klébert, S., Sebastyén, Z., Molnár, Z., Borsodi, A. K., Leél-Óssy, S., Demény, A. y Németh, P., (2020). Cave bacteria-induced amorphous calcium carbonate formation. *Scientific Reports* [en línea]. 10(1). pp. 3. Disponible en: doi: 10.1038/s41598-020-65667-w

Fahimizadeh, M., Diane Abeyratne, A., Mae, L. S., Singh, R. K. R., & Pasbakhsh, P. (2020). Biological self-healing of cement paste and mortar by non-ureolytic bacteria encapsulated in alginate hydrogel capsules. *Materials*, 13(17), 3711. pp. 2. <https://doi.org/10.3390/ma13173711>

- Farhat, T. M., Al Disi, Z. A., Ashfaq, M. Y. y Zouari, N., (2023). Study of diversity of mineral-forming bacteria in sabkha mats and sediments of mangrove forest in Qatar. *Biotechnology Reports* [en línea]. 39, número de artículo: e00811. pp. 4. Disponible en: doi: 10.1016/j.btre.2023.e00811
- Fernández Olmos, A.; García de la Fuente, C.; Saéz Nieto, J.A.; Valdezate Ramos, S., (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología [en línea]. 37a ed. España: *Procedimientos en Microbiología Clínica*. pp. 6-34. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Fernández Rosas, P., Salvador Lagunas, B., Salgado Miranda, C., Talavera Rojas, M., Vega Castillo, L. F. y Díaz González Borja, A. E., (2013). *Programa de prácticas de bacteriología y micología* [en línea]. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Fiallos Núñez, J. E., (2017). Determinación de la correlación entre métodos visuales, ópticos y difusión en placa en el crecimiento de *Escherichia coli*. Tesis para titulación, *Universidad Técnica de Ambato*. pp. 28. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/26334>
- Freiberg, A., Schefter, C., Girbig, M., Murta, V. C., & Seidler, A. (2018). Health effects of wind turbines in working environments – a scoping review. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 44(4), 351–369. <https://doi.org/10.5271/sjweh.3711>
- García, A. P. A., (2021). Evaluación de la capacidad de biomineralización de un consorcio bacteriano aislado de suelos arcillosos. Tesis de maestría, *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. pp. 53. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12672/16781>
- García G., M., Márquez G., M. A. y Moreno H., C. X., (2016). Characterization of bacterial diversity associated with calcareous deposits and drip-waters, and isolation of calcifying bacteria from two

Colombian mines. *Microbiological Research* [en línea]. 182, 21–30. Disponible en: doi: 10.1016/j.micres.2015.09.006

Giraldo Mora, N. (2017). Autorreparación de fisuras en concreto rígido para pavimentos mediante la adición de bacterias bioprecipitadoras de carbonato de calcio - estado del arte y diseño experimental. [online] *Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá Facultad de Ingeniería Departamento de Ingeniería Civil y Agrícola Ingeniería Civil*. pp. 96-142. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/60199>

Görger, S., Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Gugger, M., Chauvat, F. y Cassier-Chauvat, C., (2020). The diversity of molecular mechanisms of carbonate biomineralization by bacteria. *Discover materials* [en línea]. 1(1). pp. 3. Disponible en: doi: 10.1007/s43939-020-00001-9

Gómez, V. (2023). Suelo calcáreo o calizo: qué es, características, formación, localización. *Lifeder*. <https://www.lifeder.com/suelo-calizo/>

Hammes, F. y Verstraete, W., (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* [en línea]. 1(1), 3–7. pp. 1. Disponible en: doi: 10.1023/a:1015135629155

Hemayati, M., Nikooee, E., Habibagahi, G., Niazi, A., & Afzali, S. F. (2023). New non-ureolytic heterotrophic microbial induced carbonate precipitation for suppression of sand dune wind erosion. *Scientific Reports*, 13(1). pp. 2-3. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33070-w>

Heredia Velásquez, 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. [Tesis de licenciatura] *Universidad del Valle de Guatemala*. pp. 19. Repositorio. <https://repositorio.uvg.edu.gt/handle/123456789/3624>

- Hernández Hernández, M. d. I. A., (2009). Estudios de precipitación de CaCO_3 como herramienta para entender los procesos de biomineralización, usando como modelo biológico la cáscara de huevo de gallina. [Tesis doctoral] *Universidad de Granada*. pp. 5-20. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=68998>
- Hernández-Piedrazul, E., Castañeda-Robles, I. E., & Lizárraga-Mendiola, L. (2022). El bioconcreto como agente reparante en estructuras de concreto. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 10(Especial2), 176–183.
- Hituyan Dussan J. S., Valencia Barrera, L. J. (2020). Análisis sistemático de literatura sobre patologías del concreto auto reparadas a partir de reacciones de mineralización con bacterias [Tesis, *Universidad Cooperativa de Colombia*]. pp. 42-57. <https://docplayer.es/207327849-Analisis-sistematico-de-literatura-sobre-patologias-del-concreto-auto-reparadas-a-partir-de-reacciones-de-mineralizacion-con-bacterias.html>
- Imbellone, P.A., Giménez, J.E., Mormeneo, M.L. (2014). Suelos calcáreos del litoral noreste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Instituto de Geomorfología y Suelos. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. *Universidad Nacional de La Plata*, 3. pp. 3. <https://core.ac.uk/download/pdf/187728295.pdf>
- Jiang, L., Xia, H., Wang, W., Zhang, Y. y Li, Z., (2023). Applications of microbially induced calcium carbonate precipitation in civil engineering practice: A state-of-the-art review. *Construction and building materials* [en línea]. 404, 133227. Disponible en: doi: 10.1016/j.conbuildmat.2023.133227
- Jroundi, F., González Muñoz, M. T. y Rodríguez Navarro, C., (2021). Protección y consolidación del patrimonio pétreo mediante carbonatogénesis bacteriana. *Microorganismos en el deterioro y*

preservación del patrimonio cultural. Springer, Cham. [en línea]. pp. 3. Disponible en: doi: 10.1007/978-3-030-69411-1 13

Khambholja, D. B., Gamit, D., Patel, H., & Kumar, P. (2022). Isolation and characterisation of urease producing bacteria and their capacity to precipitate calcium carbonate. *Defence Life Science Journal*, 7(2), 89–96. pp. 4. <https://doi.org/10.14429/dlsj.7.17279>

Khan, I., Rafiq, M., Zada, S., Jamil, S. U. U. y Hasan, F., (2020). Calcium carbonate precipitation by rock dwelling bacteria in Murree Hills, Lower Himalaya Range Pakistan. *Geomicrobiology Journal* [en línea]. 1–6. pp. 4. Disponible en: doi: 10.1080/01490451.2020.1836085.

Krishnapriya, S., Venkatesh Babu, D. L., & G., P. Arulraj. (2015). Isolation and identification of bacteria to improve the strength of concrete. *Microbiological Research*, 174, 48–55. pp. 2-3. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.009>

Laboratorio de Análisis de Muestreo de Suelos – Instituto Nacional de Innovación Agraria [en línea], (2002). Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA - *Plataforma del Estado Peruano*. Disponible en: <https://www.inia.gob.pe/laboratorio-de-analisis-de-muestreo-de-suelos/>

Lakshmi, L., Meera, C. y Cheriyan, E., (2016). Durability and self- healing behaviour of bacterial impregnated concrete. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* [en línea]. 5, número de artículo: 8. pp. 5. Disponible en: https://www.ijirset.com/upload/2016/august/111_Durability.pdf

Lee, Y. S., Kim, H. J., & Park, W. (2017). Non-ureolytic calcium carbonate precipitation by *Lysinibacillus sp.* YS11 isolated from the rhizosphere of *Miscanthus sacchariflorus*. *Journal of Microbiology*, 55(6), 440–447. pp. 1. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7086-z>

- León-Velez, A. y Guillén-Mena, V., (2020). Energía contenida y emisiones de CO₂ en el proceso de fabricación del cemento en Ecuador. *Ambiente construido* [en línea]. **20**(3), 611–625. Disponible en: doi: 10.1590/s1678-86212020000300448
- Li, J., Tian, L., Xu, Y., Tian, Z., & Zhang, Z. (2023). Study on the solidification effect of dredger fill by microbial-induced calcium precipitation (MICP). *Materials*, **15**(22), 7891. pp. 2. <https://doi.org/10.3390/ma15227891>
- Luo, M., Qian, C.-x. y Li, R.-y., (2015). Factors affecting crack repairing capacity of bacteria-based self-healing concrete. *Construction and Building Materials* [en línea]. **87**, 1–7. pp. 2-3. Disponible en: doi: 10.1016/j.conbuildmat.2015.03.117
- Marvasi, M., Gallagher, K. L., Martinez, L. C., Molina Pagan, W. C., Rodríguez Santiago, R. E., Castilloveitía Vega, G., & Visscher, P. T. (2012). Importance of B4 medium in determining organomineralization potential of bacterial environmental isolates. *Geomicrobiology Journal*, **29**(10), 916–924. pp. 9. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.636145>medio
- Murugan, R., Suraishkumar, G. K., Mukherjee, A., & Dhama, N. K. (2021). Influence of native ureolytic microbial community on biocementation potential of *Sporosarcina pasteurii*. *Scientific Reports*, **11**(1). pp. 5. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00315-5>
- Mwandira, W., Mavroulidou, M., Timmermans, M., Gunn, M.J., Gray, C., Pantoja-Muñoz, L. y Purchase, D. (2024). A study of bacteria producing carbonic anhydrase enzyme for CaCO₃ precipitation and soil biocementation. *Environmental Science and Pollution Research*, **31**, 45818–45833. Disponible en: PMC(11356 2024 Article 34077).
- Nookala, S. (2023). Estudio detallado sobre las bacterias precipitadoras de calcio. *Ediciones Nuestro Conocimiento*, **168**. <https://www.perlego.com/es/book/4054890/estudio-detallado-sobre-las>

- Okwadha, G. D. O. y Li, J., (2010). Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere* [en línea]. 81(9), 1143–1148. pp. 3 Disponible en: doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.066
- Omoregie, A. I., Ong, D. E. L. y Nissom, P. M., (2018). Assessing ureolytic bacteria with calcifying abilities isolated from limestone caves for biocalcification. *Letters in Applied Microbiology* [en línea]. pp. 8. Disponible en: doi: 10.1111/lam.13103
- Ortega-Villamagua, E., Arcos, M., Romero, M., Vasquez, C., & Palma-Cando, A. (2022). Precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente como potencial estrategia en la restauración de estructuras patrimoniales. *Ge-conservacion*, 21(1), 224–234. pp. 1-3. <https://doi.org/10.37558/gec.v21i1.1119>
- Osorio, J. D. (2018). Hidratación del concreto: agua de curado y agua de mezclado. *360 en concreto*. <https://360enconcreto.com/blog/detalle/hidratacion-del-concreto-agua-de-curado-y-agua-de-mezclado/>
- Pancorbo, F. (2011). Índices de estabilidad del agua. Físico-química del agua. *Ecoeficiencia*. <https://javierpancorbo.blogspot.com/2011/05/indices-de-estabilidad-del-agua-19.html>
- Pan, L., Li, Q., Zhou, Y., Song, N., Yu, L., Wang, X., Xiong, K., Yap, L., & Huo, J. (2019). Effects of different calcium sources on the mineralization and sand curing of CaCO₃ by carbonic anhydrase-producing bacteria. *RSC Advances*, 9(70), 40827–40834. pp. 1. <https://doi.org/10.1039/c9ra09025h>
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., & Demo, M. (2015). Manual de microbiología general.

Universidad Nacional de Río Cuarto. (Obra original publicada en 2015). pp. 5

Rivera Devia, I. C., (2015). Autocuración del concreto a partir de la encapsulación del *Bacillus subtilis* en un biopolímero de almidón. Título, *Corporación Tecnológica de Bogotá*. pp. 51. Disponible en: <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/5140>

Rivera Arguello, H. R., Melendez Palomino, J., (2021). Recomendaciones para la reparación de fisuras con métodos no tradicionales y métodos tecnológicos en elementos estructurales y no estructurales. Tesis para título, *Universidad Nacional de Piura*

Rojas Cáceres, J. P. (2008). Estudio mineralización de carbonato de calcio usando como matriz quitosano y mezclas de quitosano con polímeros sintéticos hidrosolubles [Tesis para optar el título, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Química Orgánica y Físicoquímica, Laboratorio de Polímeros]. pp. 10. Repositorio.https://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2008/rojas_j/sources/rojas_j.pdf

Røyne, A., Phua, Y. J., Balzer Le, S., Eikjeland, I. G., Josefsen, K. D., Markussen, S., Myhr, A., Throne-Holst, H., Sikorski, P., & Wentzel, A. (2019). Towards a low CO₂ emission building material employing bacterial metabolism (1/2): The bacterial system and prototype production. *PLOS ONE*, 14(4), Artículo e0212990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212990>

Ruíz Oviedo, C. V. (2020). Precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente como alternativa para remediar entornos naturales contaminados con metales y metaloides tóxicos [Tesis para magister, Universidad Nacional de Colombia]. pp. 37. Repositorio. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/78261>

Sacsquispe Contreras, R., Ventura Egúsqüiza, G., (2005). Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias [en línea]. *Instituto Nacional de Salud*. pp. 50-94. Disponible en:

[https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/Manual
Procedimientos Bacteriologicos IIIH.pdf](https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/Manual_Procedimientos_Bacteriologicos_IIIH.pdf)

Santambrosio, E., Ortega, M., Garibaldi, P., (2009). Tinción y observación de microorganismos [en línea]. UTN - Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Rosario. pp. 5. Disponible en: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_ano/biotecnologia/practico4.pdf.

Santos Estrada, A. J., (2021). Aplicación del bioconcreto para reparar agrietamientos de los decantadores de la planta de tratamiento de agua La Atarjea. Para optar el título profesional de Ingeniero Civil, *Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas*. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10757/655332>

SENCICO, (2009). Norma E.060 Concreto Armado. Reglamento Nacional de Edificaciones [en línea]. *Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento*. Disponible en: <https://drive.google.com/file/d/1YygoHSNpu2-UfJLmSa-C1Wxr6oFAfCwA/view?pli=1>

Shaheen, N., Jalil, A., Adnan, F., & Arsalan Khushnood, R. (2021). Isolation of alkaliphilic calcifying bacteria and their feasibility for enhanced CaCO₃ precipitation in bio-based cementitious composites. *Microbial Biotechnology*, 14(3), 1044–1059. pp. 1-4. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13752>.

Shaheen, N., Khushnood, R. A., Memon, S. A. y Adnan, F., (2023). Feasibility assessment of newly isolated calcifying bacterial strains in self-healing concrete. *Construction and Building Materials* [en línea]. 362, 129662. Disponible en: doi: 10.1016/j.conbuildmat.2022.129662

Sorescu, I. y Stoica, C., (2021). Online Advanced Bacterial Identification Software, an Original Tool for Phenotypic Bacterial Identification. *Romanian Biotechnological Letters* [en línea]. 26(6), 3047–3053. Disponible en: doi: 10.25083/rbl/26.6/3047-3053

- Šovljanski, O., Pezo, L., Stanojev, J., Bajac, B., Kovač, S., Tóth, E., Ristić, I., Tomić, A., Ranitović, A., Cvetković, D. y Markov, S., (2021). Comprehensive Profiling of Microbiologically Induced CaCO₃ Precipitation by Ureolytic Bacillus Isolates from Alkaline Soils. *Microorganisms* [en línea]. **9**(8), 1691. Disponible en: doi: 10.3390/microorganisms9081691
- Sosa, M., Lamnek, A., Villagrán, Y., Benito, D., Zega, C., & Di Maio, A. (2016). Composición y propiedades del agregado fino reciclado en función del tamaño de partícula. *Asociación Argentina de Tecnologías del Hormigón*.
<https://host170.sedici.unlp.edu.ar/server/api/core/bitstreams/31581959-3ecb-4b09-a6cd-7bf8a4b5d53e/content>
- Stuckrath C, Valenzuela L, López, M., (2017). Remediación del hormigón mediante bacterias [en línea]. Pontificia Universidad Católica de Chile, *Escuela de Ingeniería*. pp. 2-3. Disponible en: https://i3.investigacion.ing.uc.cl/wp-content/uploads/2017/02/JI32012n02_sci02.pdf
- Valderrama, J. O., Campusano, R. y Espindola, C., (2019). Minería Chilena: Captura, transporte, y almacenamiento de dióxido de carbono en relaves mediante líquidos iónicos y carbonatación mineral. *Información tecnológica* [en línea]. **30**(5), 357–372. Disponible en: doi: 10.4067/s0718-07642019000500357
- Valencia G.Y., Patricia S.A., Camapum J.C. (2014). Bacterias nativas que inducen la precipitación de minerales de carbonato de calcio en suelos tropicales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, **34**(15-21), 1. pp. 1. <https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sciabstract&pid=S1315-25562014000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=en>
- Vargas Chacón, Vargas Cartagena, C. L., (2015). Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA- Costa Rica) [en línea]. *Ministerio de Agricultura y Ganadería*. Disponible en: <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/Av-1820.pdf>

- Wang, Q., Miao, Q., Liu, F., Wang, X., & Xu, Q. (2022). Coupled effect of microbiologically induced calcium carbonate and biofilms in leachate. *Journal of Environmental Management*, 324, 116350. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116350>
- Wong, L. S. (2015). Microbial cementation of ureolytic bacteria from the genus *Bacillus*: a review of the bacterial application on cement-based materials for cleaner production. *Journal of Cleaner Production*, 93, pp. 3-7. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.01.019>
- Xiao, Y., Deng, H. y Li, J., (2023). Biomineralización de arena de coral por *Bacillus thuringiensis* aislada de una cueva de travertino. *Informes científicos* [en línea]. **13** (1). Disponible en: doi: 10.1038/s41598-023-35893-z
- Xu, X., Nielsen, L. J. D., Song, L., Maróti, G., Strube, M. L. y Kovács, Á. T., (2023). Especificidad mejorada de la metataxonómica de *Bacillus* mediante un enfoque de secuenciación de amplicones dirigido a tuf. *Comunicaciones ISME* [en línea]. **3** (1). Disponible en: doi: 10.1038/s43705-023-00330-9
- Yu, X., He, Z., & Li, X. (2021b). Bio-cement-modified construction materials and their performances. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16401-0>
- Zamarreño, D. V., Inkpen, R. y May, E., (2009). Carbonate crystals precipitated by freshwater bacteria and their use as a limestone consolidant. *Applied and Environmental Microbiology* [en línea]. 75(18), 5981–5990. pp. 2. Disponible en: doi: 10.1128/aem.02079-08
- Zhang, K., Xue, Y., Zhang, J., & Hu, X. (2020). Removal of lead from acidic wastewater by bio-mineralized bacteria with pH self-regulation. *Chemosphere*, 241, 125041. pp. 2. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125041>

Apéndices

Apéndice N° 1. Ficha de toma de muestra del Suelo agrícola de la Universidad Nacional de Cajamarca.

FICHA DE TOMA DE MUESTRA			
Fecha de muestreo	25	marzo	2024
Zona de muestreo	Universidad Nacional de Cajamarca		
Tipo de suelo	Suelo agrícola - ureico		
Código de muestra	UNC		
Coordenadas geográficas	Punto A	Latitud	7°10'3.8''S
		Longitud	78°29'34.8''W
	Punto B	Latitud	7°10'4.1''S
		Longitud	78°29'34.7''W
	Punto C	Latitud	7°10'4.2''S
		Longitud	78°29'34.8''W
	Punto D	Latitud	7°10'3.9''S
		Longitud	78°29'35.1''W
Características de la superficie al momento de la toma de muestra	Soleado	Si	No
	Vegetación	Si	No
	Humedad	Si	No
	Utilidad humana	Si	No
	Contaminantes	Si	No
Características organolépticas	Color	Marrón oscuro	
	Olor	Tierra húmeda	
Características fisicoquímicas	pH	5	
	Temperatura	27 °C	
Total de puntos de muestreo	20		
Número de submuestras	20		
Cantidad de muestra total (g)	20 g		

Apéndice N° 2. Ficha de toma de muestra del Suelo agrícola del Jardín Las Hortensias.

FICHA DE TOMA DE MUESTRA			
Fecha de muestreo	7	mayo	2024
Zona de muestreo	Jardín Las Hortensias - Los tres Molinos - Cajamarca		
Tipo de suelo	Suelo agrícola - ureico		
Código de muestra	HRT		
Coordenadas geográficas	Punto A	Latitud	7°7'42.4''S
		Longitud	78°30'51.4''W
	Punto B	Latitud	7°7'42.2''S
		Longitud	78°30'51.1''W
	Punto C	Latitud	7°7'42.3''S
		Longitud	78°30'51.2''W
	Punto D	Latitud	7°7'42.2''S
		Longitud	78°30'51.0''W
Características de la superficie al momento de la toma de muestra	Soleado	Si	No
	Vegetación	Si	No
	Humedad	Si	No
	Utilidad humana	Si	No
	Contaminantes	Si	No
Características organolépticas	Color	Marrón negro	
	Olor	Tierra húmeda	
Características fisicoquímicas	pH	6	
	Temperatura	25 °C	
Total de puntos de muestreo	20		
Número de submuestras	20		
Cantidad de muestra total (g)	20 g		

Apéndice N° 3. Ficha de toma de muestra del Suelo calcáreo de la Cantera de Namora.

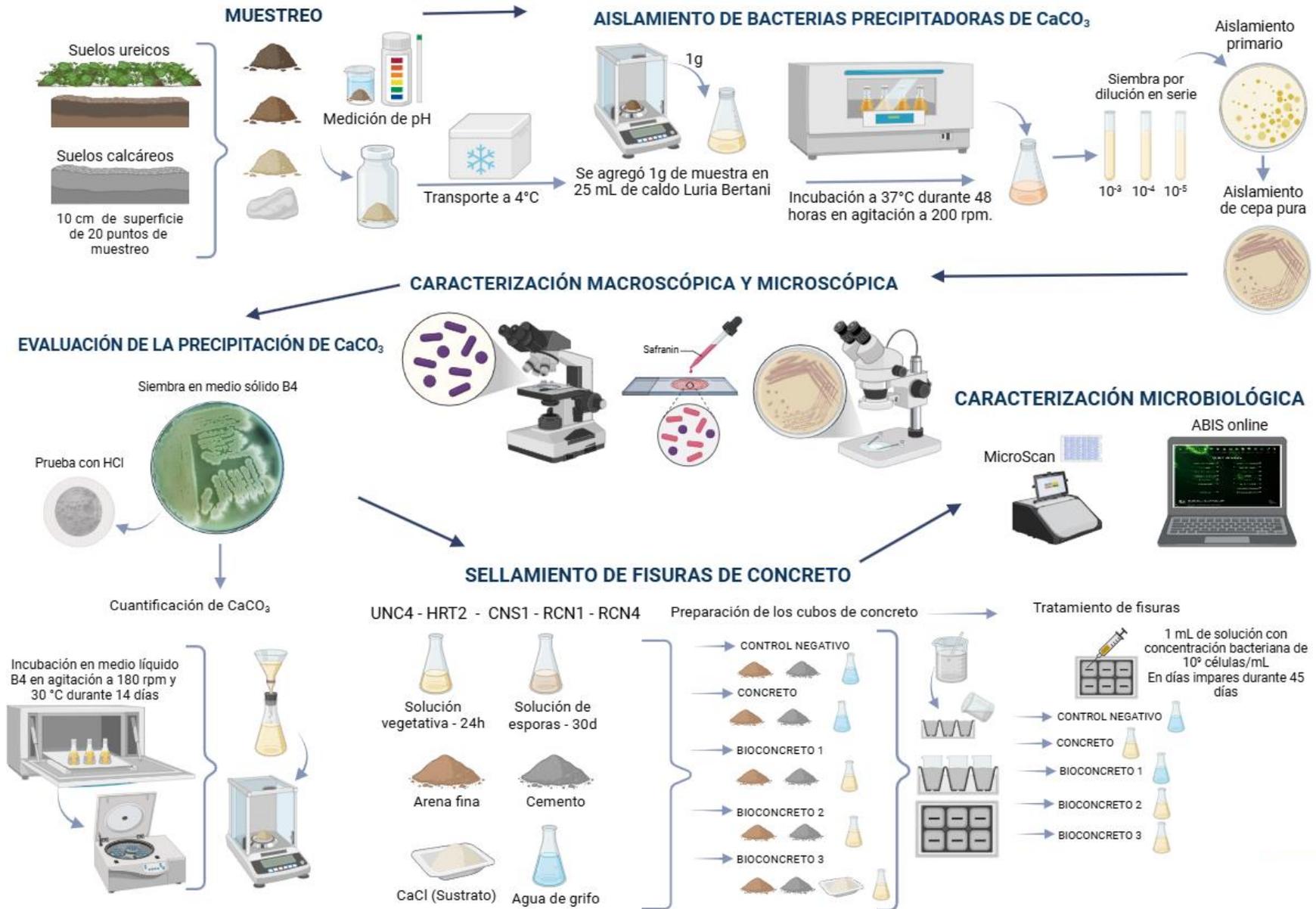
FICHA DE TOMA DE MUESTRA			
Fecha de muestreo	7	mayo	2024
Zona de muestreo	Cantera de Namora		
Tipo de suelo	Suelo Calcáreo y Rocoso		
Código de muestra	CNS / RCN		
Coordenadas geográficas	Punto A	Latitud	7°11'33.02''S
		Longitud	78°17'51.30''W
	Punto B	Latitud	7°11'23.05''S
		Longitud	78°17'51.22''W
	Punto C	Latitud	7°11'33.86''S
		Longitud	78°17'51.16''W
	Punto D	Latitud	7°11'32.84''S
		Longitud	78°17'51.28''W
Características de la superficie al momento de la toma de muestra	Soleado	Si	No
	Vegetación	Si	No
	Humedad	Si	No
	Utilidad humana	Si	No
	Contaminantes	Si	No
Características organolépticas	Color	Naranja oscuro con superficie blanquecina	
	Olor	Tierra húmeda	
Características fisicoquímicas	pH	7	
	Temperatura	22 °C	
Total de puntos de muestreo	20		
Número de submuestras	20		
Cantidad de muestra total (g)	20 g		

Apéndice N° 4. Cubos de láminas cubreobjetos para su uso en cubos de concreto.

Medidas del cubo: 22 mm x 22 mm x 15 mm

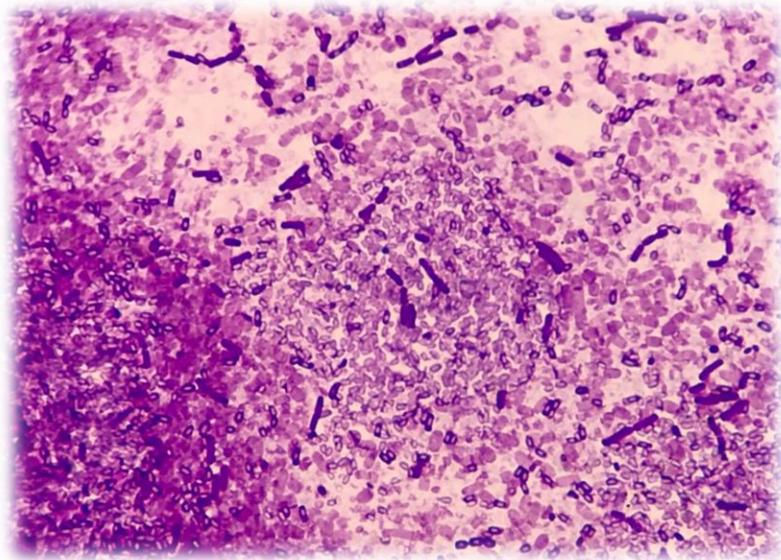


Apéndice N° 5. Metodología para el aislamiento, caracterización y aplicación de bacterias precipitadoras de CaCO_3 en el sellado de fisuras de concreto.

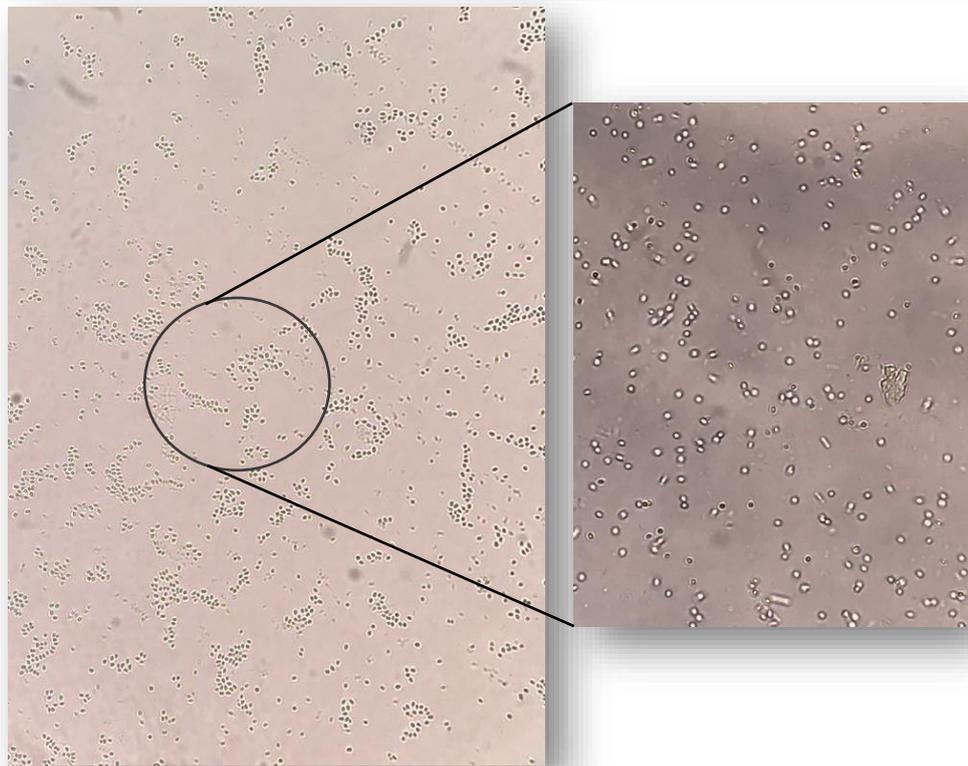


Apéndice N° 6. Visualización de esporas durante la preparación de la solución de esporas de bacterias esporuladas.

**Coloración Gram del sedimento de solución de esporas
(Aumento: 1000X)**



**Examen directo en fresco del sedimento de solución de esporas
(Aumento: 400X)**



Apéndice N° 7. Resultados de identificación bioquímica en el ABIS online

UNC4

1. Bacillus thuringiensis



Sin pruebas opuestas Similitud: 96,2% Probabilidad: 65,7% Integridad de la matriz: 100%

HRT2

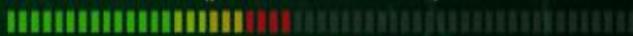
1. Bacillus acidicéle



Pruebas opuestas: *espora* ST/T⁻, Nitratos⁻ y Maltosa⁻ Similitud: 86,4% Probabilidad: 57,8% Integridad de la matriz: 100%

CNS1

2. Bacillus subtilis (posibilidad de B. atrophaeus/B. vallismortis)



Pruebas opuestas: PC/C spore⁻, LDC⁺, ODC⁺ y Rhamnose⁺ Similitud: 75,4% Probabilidad: 9% Integridad de la matriz: 100%

RCN1

1. Bacillus simplex



Pruebas opuestas: Sorbitol⁻ y VP⁺ Similitud: 79,9% Probabilidad: 94% Integridad de la matriz: 100%

RCN4

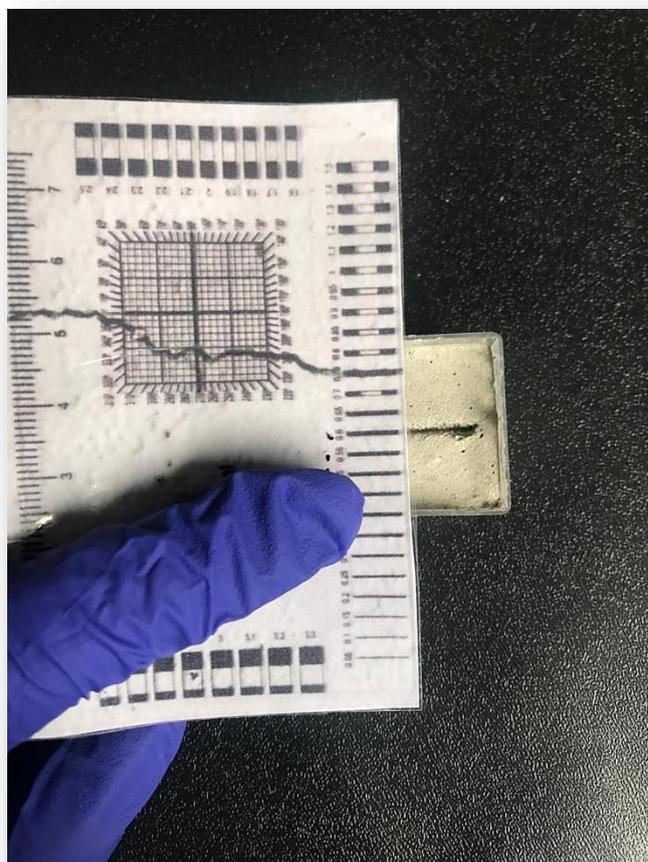
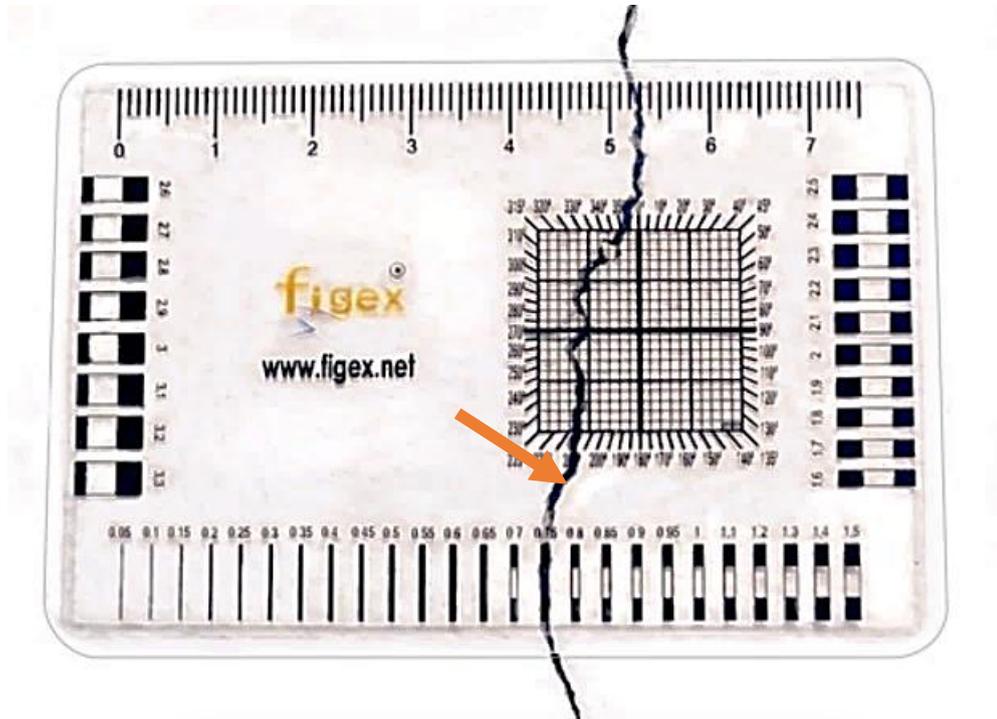
1. Bacillus gelatini



Pruebas opuestas: *espora* PC/C⁻, Maltosa⁻ y VP⁺ Similitud: 82,7% Probabilidad: 61,8% Integridad de la matriz: 100%

Apéndice N° 8. Medición de fisuras de concreto con fisurómetro.

Margen de error (± 0.05)



Apéndice N° 9. Comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé
entre las especies en el tratamiento con solución vegetativa.

(I) Especie	(J) Especie	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95 %	
					Límite inferior	Límite superior
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus acidicele</i>	0.0708	0.02453	0.161	-0.0143	0.1560
	<i>Bacillus subtilis</i>	0.0708	0.02453	0.161	-0.0143	0.1560
	<i>Bacillus simplex</i>	0.0333	0.02453	0.867	-0.0518	0.1185
	<i>Bacillus gelatini</i>	0.0333	0.02453	0.867	-0.0518	0.1185
	Control negativo	0.1542*	0.02453	0.000	0.0690	0.2393
<i>Bacillus acidicele</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-0.0708	0.02453	0.161	-0.1560	0.0143
	<i>Bacillus subtilis</i>	0.0000	0.02453	10.000	-0.0851	0.0851
	<i>Bacillus simplex</i>	-0.0375	0.02453	0.799	-0.1226	0.0476
	<i>Bacillus gelatini</i>	-0.0375	0.02453	0.799	-0.1226	0.0476
	Control negativo	0.0833	0.02453	0.059	-0.0018	0.1685
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-0.0708	0.02453	0.161	-0.1560	0.0143
	<i>Bacillus acidicele</i>	0.0000	0.02453	1.000	-0.0851	0.0851
	<i>Bacillus simplex</i>	-0.0375	0.02453	0.799	-0.1226	0.0476
	<i>Bacillus gelatini</i>	-0.0375	0.02453	0.799	-0.1226	0.0476
	Control negativo	0.0833	0.02453	0.059	-0.0018	0.1685
<i>Bacillus simplex</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-0.0333	0.02453	0.867	-0.1185	0.0518
	<i>Bacillus acidicele</i>	0.0375	0.02453	0.799	-0.0476	0.1226
	<i>Bacillus subtilis</i>	0.0375	0.02453	0.799	-0.0476	0.1226
	<i>Bacillus gelatini</i>	0.0000	0.02453	1.000	-0.0851	0.0851
	Control negativo	0.1208*	0.02453	0.001	0.0357	0.2060
<i>Bacillus gelatini</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-0.0333	0.02453	0.867	-0.1185	0.0518
	<i>Bacillus acidicele</i>	0.0375	0.02453	0.799	-0.0476	0.1226
	<i>Bacillus subtilis</i>	0.0375	0.02453	0.799	-0.0476	0.1226
	<i>Bacillus simplex</i>	0.0000	0.02453	1.000	-0.0851	0.0851
	Control negativo	0.1208*	0.02453	0.001	0.0357	0.2060
Control negativo	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-0.1542*	0.02453	0.000	-0.2393	-0.0690
	<i>Bacillus acidicele</i>	-0.0833	0.02453	0.059	-0.1685	0.0018
	<i>Bacillus subtilis</i>	-0.0833	0.02453	0.059	-0.1685	0.0018
	<i>Bacillus simplex</i>	-0.1208*	0.02453	0.001	-0.2060	-0.0357
	<i>Bacillus gelatini</i>	-0.1208*	0.02453	0.001	-0.2060	-0.0357

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 0.004.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Apéndice N° 10. Comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé
entre las especies en el tratamiento con solución de esporas.

(I) Especie	(J) Especie	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95 %	
					Límite inferior	Límite superior
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus gelatini</i>	0.0125	0.01894	0.806	-0.0369	0.0619
	Control negativo	0.1042*	0.01894	0.000	0.0548	0.1536
<i>Bacillus gelatini</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-0.0125	0.01894	0.806	-0.0619	0.0369
	Control negativo	0.0917*	0.01894	0.000	0.0423	0.1411
Control negativo	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-0.1042*	0.01894	0.000	-0.1536	-0.0548
	<i>Bacillus gelatini</i>	-0.0917*	0.01894	0.000	-0.1411	-0.0423

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 0.002.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Apéndice N° 11. Comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé entre los grupos experimentales en el tratamiento con solución vegetativas.

(I) Grupo experimental	(J) Grupo experimental	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95 %	
					Límite inferior	Límite superior
Concreto	Bioconcreto 1	0.0694*	0.02003	0.013	0.0114	0.1275
	Bioconcreto 2	0.0417	0.02003	0.242	-0.0164	0.0997
	Bioconcreto 3	0.0583*	0.02003	0.048	0.0003	0.1164
Bioconcreto 1	Concreto	-0.0694*	0.02003	0.013	-0.1275	-0.0114
	Bioconcreto 2	-0.0278	0.02003	0.592	-0.0858	0.0303
	Bioconcreto 3	-0.0111	0.02003	0.958	-0.0691	0.0469
Bioconcreto 2	Concreto	-0.0417	0.02003	0.242	-0.0997	0.0164
	Bioconcreto 1	0.0278	0.02003	0.592	-0.0303	0.0858
	Bioconcreto 3	0.0167	0.02003	0.875	-0.0414	0.0747
Bioconcreto 3	Concreto	-0.0583*	0.02003	0.048	-0.1164	-0.0003
	Bioconcreto 1	0.0111	0.02003	0.958	-0.0469	0.0691
	Bioconcreto 2	-0.0167	0.02003	0.875	-0.0747	0.0414

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 0.004.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Apéndice N° 12. Comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé entre los grupos experimentales en el tratamiento con solución de esporas.

(I) Grupo experimental	(J) Grupo experimental	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95 %	
					Límite inferior	Límite superior
Concreto	Bioconcreto 1	-0.0056	0.02187	0.996	-0.0713	0.0602
	Bioconcreto 2	0.0056	0.02187	0.996	-0.0602	0.0713
	Bioconcreto 3	-0.0389	0.02187	0.387	-0.1046	0.0268
Bioconcreto 1	Concreto	0.0056	0.02187	0.996	-0.0602	0.0713
	Bioconcreto 2	0.0111	0.02187	0.967	-0.0546	0.0768
	Bioconcreto 3	-0.0333	0.02187	0.520	-0.0990	0.0324
Bioconcreto 2	Concreto	-0.0056	0.02187	0.996	-0.0713	0.0602
	Bioconcreto 1	-0.0111	0.02187	0.967	-0.0768	0.0546
	Bioconcreto 3	-0.0444	0.02187	0.274	-0.1102	0.0213
Bioconcreto 3	Concreto	0.0389	0.02187	0.387	-0.0268	0.1046
	Bioconcreto 1	0.0333	0.02187	0.520	-0.0324	0.0990
	Bioconcreto 2	0.0444	0.02187	0.274	-0.0213	0.1102

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 0.002.

Apéndice N° 13. Prueba de muestras emparejadas en los grupos experimentales en el tratamiento con solución vegetativa de bacterias precipitadoras de CaCO₃.

Grupo experimental	Especie	Diferencia	Media	Desv. Desviación	Desv. Error Promedio	95 % de intervalo de confianza de la diferencia		t	g	Sig. (bilateral)
						Inferior	Superior			
Concreto	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1833333	0,0288675	0,0166667	0,1116225	0,2550442	11,000	:	0,008*
	<i>Bacillus acidicele</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1000000	0,1000000	0,0577350	-0,1484138	0,3484138	1,732	:	0,225
	<i>Bacillus subtilis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1333333	0,0288675	0,0166667	0,0616225	0,2050442	8,000	:	0,015*
	<i>Bacillus simplex</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1833333	0,1154701	0,0666667	-0,1035102	0,4701768	2,750	:	0,111
	<i>Bacillus gelatini</i>	Dia 1 - Dia 45	0,2166667	0,0577350	0,0333333	0,0732449	0,3600884	6,500	:	0,023*
Bioconcreto 1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1333333	0,1040833	0,0600925	-0,1252239	0,3918906	2,219	:	0,157
	<i>Bacillus acidicele</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0500000	0,0500000	0,0288675	-0,0742069	0,1742069	1,732	:	0,225
	<i>Bacillus subtilis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0666667	0,0288675	0,0166667	-0,0050442	0,1383775	4,000	:	0,057
	<i>Bacillus simplex</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0666667	0,0577350	0,0333333	-0,0767551	0,2100884	2,000	:	0,184
	<i>Bacillus gelatini</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0833333	0,0577350	0,0333333	-0,0600884	0,2267551	2,500	:	0,130
Bioconcreto 2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1500000	0,0866025	0,0500000	-0,0651326	0,3651326	3,000	:	0,095
	<i>Bacillus acidicele</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1166667	0,0288675	0,0166667	0,0449558	0,1883775	7,000	:	0,020*
	<i>Bacillus subtilis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0666667	0,0288675	0,0166667	-0,0050442	0,1383775	4,000	:	0,057
	<i>Bacillus simplex</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1333333	0,0577350	0,0333333	-0,0100884	0,2767551	4,000	:	0,057
Bioconcreto 3	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1500000	0,0866025	0,0500000	-0,0651326	0,3651326	3,000	:	0,095
	<i>Bacillus acidicele</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0666667	0,0288675	0,0166667	-0,0050442	0,1383775	4,000	:	0,057
	<i>Bacillus subtilis</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0666667	0,0763763	0,0440959	-0,1230625	0,2563958	1,512	:	0,270
	<i>Bacillus simplex</i>	Dia 1 - Dia 45	0,1000000	0,0866025	0,0500000	-0,1151326	0,3151326	2,000	:	0,184
	<i>Bacillus gelatini</i>	Dia 1 - Dia 45	0,0833333	0,0577350	0,0333333	-0,0600884	0,2267551	2,500	:	0,130

* Prueba de Scheffé ($p < 0,05$). Fuente: Resultados del análisis estadístico en IBM SPSS Statistics versión 25.

Apéndice N° 14. Prueba de muestras emparejadas en los grupos experimentales en el tratamiento con solución de esporas de bacterias precipitadoras de CaCO₃.

Grupo experimental			Media	Desv. Desviación	Desv. Error Promedio	95 % de intervalo de confianza de la diferencia		t	g	Sig. (bilateral)
						Inferior	Superior			
Concreto	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Día 1 - Día 45	0,0833333	0,0288675	0,0166667	0,0116225	0,1550442	5,000	2	0,038*
	<i>Bacillus gelatini</i>	Día 1 - Día 45	0,0833333	0,0763763	0,0440959	-0,1063958	0,2730625	1,890	2	0,199
Bioconcreto 1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Día 1 - Día 45	0,1000000	0,0500000	0,0288675	-0,0242069	0,2242069	3,464	2	0,074
	<i>Bacillus gelatini</i>	Día 1 - Día 45	0,0833333	0,0577350	0,0333333	-0,0600884	0,2267551	2,500	2	0,130
Bioconcreto 2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Día 1 - Día 45	0,0666667	0,0288675	0,0166667	-0,0050442	0,1383775	4,000	2	0,057
	<i>Bacillus gelatini</i>	Día 1 - Día 45	0,0833333	0,1040833	0,0600925	-0,1752239	0,3418906	1,387	2	0,300
Bioconcreto 3	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Día 1 - Día 45	0,1666667	0,0288675	0,0166667	0,0949558	0,2383775	10,000	2	0,010*
	<i>Bacillus gelatini</i>	Día 1 - Día 45	0,1166667	0,0288675	0,0166667	0,0449558	0,1883775	7,000	2	0,020*

* Prueba de Scheffé ($p < 0,05$). **Fuente:** Resultados del análisis estadístico en IBM SPSS Statistics versión 25.

Anexos

Anexo N° 1. Aspectos más comunes de las diversas colonias microbianas en medio sólido (Fernández Rosas et al. 2013).

Forma	Borde	Elevación	Superficie
Puntiforme 	Entero 	Plana 	Lisa o rugosa
Circular 	Ondulado 	Elevada 	Mate o brillante
Rizoide 	Lobulado 	Convexa 	Seca o cremosa
Irregular 	Filamentoso 	Crateriforme 	Invasiva o superficial
Filamentosa 		Acuminada 	

Anexo N° 2. Procedimiento de la coloración Gram

Para este procedimiento, primero se realizó un extendido de las colonias frescas con la ayuda de un asa bacteriológica estéril, para ello en una lámina portaobjetos se colocó una pequeña gota estéril de agua destilada y se homogenizó la colonia en forma circular; después se dejó secar la muestra a temperatura ambiente. Una vez seca la muestra, se fijó la muestra con ayuda del mechero tres veces para evitar su desprendimiento de la lámina. Una vez fijada la muestra, se aplicó el colorante cristal violeta y se dejó actuar durante 1 minuto, luego se enjugó con agua destilada. Después se añadió el lugol y se dejó actuar durante 1 minuto, seguidamente se enjugó con agua destilada. A continuación, se decoloró con alcohol acetona al 95 % durante unos 20 segundos y nuevamente se enjugó con agua destilada. Luego se agregó el colorante de safranina durante 10 segundos y finalmente se enjugó con agua destilada. Se dejó secar la lámina a temperatura ambiente y luego se observó al microscopio con objetivo de 100X añadiéndose una gota de aceite de inmersión para su respectiva caracterización (Sacsquispe *et al.*, 2005).

Anexo N° 3. Procedimiento de la coloración de esporas

Se realizó el procedimiento de Schaeffer Fulton, el cual consistió en fijar la muestra, tal y como se explicó anteriormente en la coloración Gram. Una vez fijada la muestra, se colocó la lámina en la gradilla de coloración y se cubrió todo el extendido de la lámina con papel de filtro. Luego se añadió el colorante verde de malaquita al 2 % (2 g – 100 mL agua destilada) y se dejó reaccionar durante 1 minuto. Consecuentemente, se calentó con ayuda del mechero durante por 1 minuto con el debido cuidado de que no llegue a hervir, hasta que emita un vapor blanco, esto permitió que el calor fuerce la entrada del colorante primario. Después se retiró el papel filtro y se lavó intensamente con agua. Para tener un contraste en la muestra, se coloreó con safranina al 5 % (5 g – 100 mL agua destilada) durante 1 minuto. Finalmente se lavó y se secó a temperatura ambiente. Asimismo, se observó al microscopio con objetivo de 100X añadiéndose una gota de aceite de inmersión para su respectiva caracterización, donde las esporas se observaron teñidas de color verde y el resto de las células de color rojo (Santambrosio, 2009).