

# Precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente como potencial estrategia en la restauración de estructuras patrimoniales

Erick Ortega-Villamagua, Mariana Arcos, Martha Romero, Carlos Vasquez, Alex Palma-Cando

**Resumen:** En los últimos años, la precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente ha demostrado ser una potencial herramienta de restauración de piezas arquitectónicas y esculturas alrededor del mundo con buenos resultados a corto y largo plazo. En este trabajo se realizaron incubaciones partiendo de cepas bacterianas locales de *Bacillus subtilis* previamente aisladas e identificadas para comprobar la capacidad de estas cepas bacterianas en la producción de carbonato de calcio sobre muestras de roca carbonática. Los cristales obtenidos fueron analizados a través de FT-IR, SEM-EDS y DRX. Los resultados muestran la formación de películas estables de bioprecipitado de calcita, el polimorfo más estable de carbonato de calcio, sobre las muestras de rocas demostrando así la posibilidad de utilizar cepas no patogénicas y medios económicos para restaurar, prevenir o disminuir el futuro deterioro del patrimonio cultural.

**Palabras clave:** precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente, restauración, conservación, patrimonio cultural, calcita

## Microbiologically induced carbonate precipitation as a potential strategy in the restoration of heritage structures

**Abstract:** In recent years, microbiologically induced carbonate precipitation has become a potential tool for restoring architectural pieces and sculptures around the world showing good results in the short and long term. In this work, isolated and identified *Bacillus subtilis* local strains were incubated to verify the capacity of these bacterial strains in the production of calcium carbonate on carbonate rock samples. The crystals obtained were analyzed through FT-IR, SEM-EDS, and DRX. Results show the formation of a stable layer of bioprecipitated calcite, the most stable polymorph of calcium carbonate, on the carbonate samples thus demonstrating the possibility of using non-pathogenic strains and economic means to restore, prevent or reduce the future deterioration of cultural heritage.

**Keywords:** microbiologically induced carbonate precipitation, restoration, conservation, cultural heritage, calcite

### Introducción

El problema de la conservación de monumentos históricos requiere un estudio preciso de los diferentes agentes medioambientales, físico-químicos, aéreos, biológicos y antropológicos que contribuyen al deterioro presente y futuro de las piezas expuestas al aire libre o aquellas resguardadas (Ortega-Villamagua, Gudiño-Gomezjurado and Palma-Cando 2020). Se conoce que la ciencia de la conservación se originó tras las trágicas inundaciones que devastaron Florencia y Venecia en 1966 (Giorgi *et al.* 2010). La restauración de una construcción histórica representa un gran reto para el restaurador, puesto que el criterio tomado para la correcta restauración puede

ser un problema, surgiendo preguntas como: ¿Se deben restaurar totalmente las partes faltantes?, ¿Cuánto se puede intervenir e interpretar?, ¿Qué material o técnica se debe implementar?, etc (Carrió and Marcos, 2013). Sin embargo, las normativas que rigen la restauración, que han sido propuestas y adoptadas por UNESCO en 1972, tienen como finalidad proteger, conservar y transmitir a futuras generaciones la apariencia física externa e interna de una pieza tratada, manteniendo cambios imperceptibles. Estas normativas son requeridas puesto que, el daño irreversible del patrimonio cultural representa una pérdida social, económica y cultural irremplazable. Jokilehto en 2005 define al patrimonio cultural como: "todo cuerpo de signos materiales, ya sean artísticos o simbólicos, que el

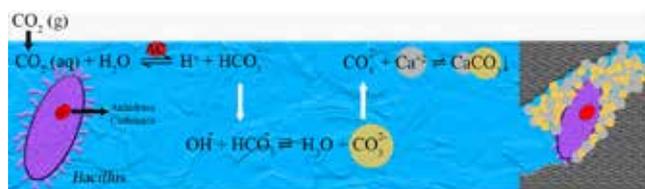
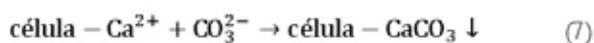
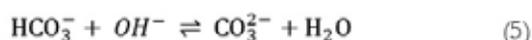
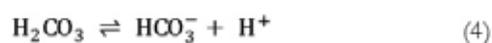
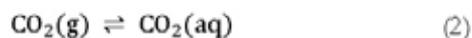
pasado ha entregado a cada cultura y, por lo tanto, a toda la humanidad. Como parte constituyente de la afirmación y el enriquecimiento de las identidades culturales, como legado de toda la humanidad, el patrimonio cultural da a cada lugar particular sus características reconocibles y es el almacén de la experiencia humana. La preservación y la presentación del patrimonio cultural son, por tanto, una piedra angular de toda política cultural." (Jokilehto 2005).

La humanidad ha logrado entender y utilizar de manera efectiva ciertos mecanismos provistos por la naturaleza para resolver problemas específicos. Los microorganismos han sido empleados de manera beneficiosa en muchos campos, tales como: industria farmacéutica, comida, biorremediación, medicina, agricultura, manejo de residuos, etc. En los últimos años se ha reportado el uso de microorganismos como herramienta para la restauración de patrimonio cultural, principalmente en Europa (Ortega-Morales and Gaylarde 2021). Métodos convencionales como el uso de resinas, epóxidos, acrílicos y otros consolidantes tradicionales han sido aplicados en la conservación de edificaciones patrimoniales, sin embargo, estas presentan varias desventajas como: bajos rendimientos, baja adherencia, obstruyen la porosidad y dañan la estructura interna, además que pueden ser nocivos para el ambiente y el ser humano (Joseph 2021). Así, en las últimas décadas se ha propuesto la precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente (PCIM) como una alternativa amigable con el ambiente y con mejores resultados a corto y largo plazo para la conservación y consolidación del patrimonio cultural (Soffritti *et al.* 2019). La PCIM es un proceso presente en una gran variedad de microorganismos. Algunas teorías establecen que las bacterias convierten el dióxido de carbono, urea u otras fuente de carbono en iones carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$  y este reacciona con los iones de calcio  $\text{Ca}^{2+}$  adheridos a la superficie celular, de esta manera los cristales de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) son precipitados. Estos cristales, junto a sustancias poliméricas extracelulares (SPEs) son capaces de rellenar grietas y unir granos sueltos. Muchos estudios han demostrado que piezas anteriormente deterioradas mejoraron su consolidación y propiedades mecánicas al ser tratadas con PCIM (Camaiti, Borselli and Matteoli 1988). De manera general, la velocidad de precipitación de carbonato de calcio es una función lineal dependiente de la concentración de los iones  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . La supersaturación (S) es únicamente alcanzada cuando el producto de solubilidad  $K_{sp}$  es excedido por la concentración de  $[\text{CO}_3^{2-}]$  y  $[\text{Ca}^{2+}]$ . La precipitación de  $\text{CaCO}_3$  es favorecida con mayor nivel de supersaturación y definido por la Ecuación 1, (Al-Thawadi 2011).

$$S = \frac{[\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}]}{K_{sp}}$$

Durante el proceso de bioprecipitación, las partículas en suspensión, partículas de polvo y la misma bacteria pueden servir como sitios activos para la nucleación de calcita. La pared celular bacteriana generalmente se

encuentra cargada negativamente, por ende, es capaz de enlazar en su superficie cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ . Por ejemplo, múltiples especies de bacterias (*e.g.*, *Bacillus subtilis*) son capaces de promover la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  al convertir  $\text{CO}_2$  en  $\text{HCO}_3^-$  a través de la anhidrasa carbónica (AC), enzima que cataliza la formación de ácido carbónico a partir de anhídrido carbónico o dióxido de carbono y agua (Pérez and García 2020). En mayor detalle el mecanismo de precipitación inicia con la disolución de  $\text{CO}_2$  gaseoso en agua, para formar  $\text{CO}_2$  acuoso (Ecuación 2). El  $\text{CO}_2$  acuoso reacciona con  $\text{H}_2\text{O}$  para formar  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , justo durante esta reacción la AC juega su papel más importante al aumentar el coeficiente de hidratación del  $\text{CO}_2$  en  $10^7$  veces (Ecuación 3). La ionización de  $\text{H}_2\text{CO}_3$  genera  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{H}^+$  (Ecuación 4). Bajo condiciones alcalinas  $\text{HCO}_3^-$  se ioniza para formar  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Ecuación 5). La reacción continua hacia la precipitación de carbonato de calcio al enlazar los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  a la superficie de la célula bacteriana (Ecuación 6). En presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  los precipitados de carbonato son formados al reaccionar con  $\text{CO}_3^{2-}$  (Ecuación 7) los mismos que pueden consolidar material deteriorado en estructuras consideradas como patrimonio cultural [ver Figura 1] (Chaparro-Acuña *et al.* 2018; Zheng and Qian, 2020).



**Figura 1.-** Resumen gráfico de la carbonatogénesis bacteriana aplicado en grietas.

El carbonato de calcio puede precipitar como cualquiera de sus 6 polimorfos, sin embargo, las investigaciones reportan mayoritariamente la presencia de calcita, vaterita y aragonita, siendo estos los más termodinámicamente estables. Este proceso en un ambiente controlado puede ser utilizado para diferentes aplicaciones, tales como (i) mejorar de las propiedades mecánicas del concreto y su autorrestauración de grietas, (ii) eliminación de metales pesados, (iii) biocementación de arena y arcilla, (iv)

biorremediación de radionucleidos, (v) secuestro de  $\text{CO}_2$ , y (iv) restauración y conservación de objetos históricos y culturales (Choi *et al.* 2020). Uno de los primeros estudios en considerar el uso de la precipitación de carbonato de calcio inducida microbiológicamente para la conservación y protección de edificaciones patrimoniales se realizó en París en los 90s (Le Métayer-Levrel *et al.* 1999). Ellos demostraron que las bacterias eran capaces de precipitar calcita sobre la superficie dañada de piedra caliza. Más tarde, se realizaron estudios en diferentes lugares del mundo incluidos Rumania, China, Alemania, España, Francia, Brasil, Colombia y Rusia, donde se ha probado la efectividad del método con diferentes géneros y especies bacterianas como, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Cupriavidus*, *Myxococcus xanthus*, *Bacillus* y otros (Ortega-Morales and Gaylarde 2021). Específicamente, los estudios realizados con *Bacillus subtilis* han demostrado capacidad de consolidar y restaurar muestras carbonatadas deterioradas mejorando sus propiedades mecánicas. Micallef *et al.* obtuvo resultados eficaces aplicando el tratamiento con *B. subtilis* sobre caliza deteriorada, la cual adquirió mayor resistencia al deterioro por sal y baja absorción de agua después del tratamiento. También se conservó la porosidad de la muestra a diferencia de los métodos convencionales (Micallef *et al.* 2016). Uno de los más recientes trabajos realizados con *B. subtilis* es el de Andreolli *et al.* donde demostraron que estas cepas tienen la capacidad de formar una capa consolidante sobre piedra caliza (Andreolli *et al.* 2020).

Un proyecto propuesto por el Instituto Nacional de Patrimonio Cultural del Ecuador busca inicialmente restaurar una colección de esculturas denominado “Las Cuatro Estaciones” [ver Figura 2], talladas en mármol

blanco, e importadas en 1890, las cuales forman parte del patrimonio cultural del Ecuador. Agentes medioambientales y antropogénicos han contribuido al deterioro de estas piezas históricas [ver insertos en Figura 2]. Similares efectos negativos se evidencian en fachadas, murales, mausoleos, iglesias, etc., que se encuentran en todo el territorio ecuatoriano y que han sido declarados patrimonio nacional o patrimonio cultural de la humanidad (Peralta and Moya 2007). En este estudio, 2 cepas bacterianas locales se analizaron como posibles microorganismos bioformadores de carbonatos sobre muestras de rocas carbonáticas. La decisión del estudio y aplicación de *B. subtilis* se debe, en gran medida a 3 factores principales: (i) al ser una bacteria ampliamente estudiada y puesto que esta cepa no es patogénica (Piggot 2009) garantizamos la seguridad de quienes trabajaran con la misma, que en términos generales serán restauradores con poca o ninguna formación en microbiología, (ii) puesto que uno de los factores para el tratamiento de las piezas depende de si estas son micro o macro porosas y sabiendo que *B. Subtilis* mide entre 2 a 6  $\mu\text{m}$  de largo y menos de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro podemos asegurar un máximo efecto de protección al trabajar con piezas que contengan poros mayores a 2  $\mu\text{m}$  de radio (De Muynck *et al.* 2011), y (iii) este es un estudio inédito realizado en Ecuador y prueba por primera vez que se pueden utilizar cepas endémicas, las cuales están adaptadas a las condiciones ambientales (e.g., presión atmosférica, temperatura, humedad), para la bioprecipitación de  $\text{CaCO}_3$ , reduciendo el tiempo de obtención de las bacterias además del costo total de restauración al no ser importadas. Los resultados obtenidos sientan las bases para la biorrestauración de patrimonio cultural en Ecuador con énfasis en las esculturas carbonáticas (e.g., mármol, travertino).



**Figura 2.-** “Las Cuatro Estaciones”, esculturas en mármol blanco. Palacio de la Circasiana, Quito.

## Metodología

Todos los reactivos fueron obtenidos de casas comerciales. La incubación se realizó en Memmert Incubator Oven INB200 código: E208.0092. El recubrimiento de las cepas bacterianas se realizó en una cabina de bioseguridad (SterilGARD®) modelo: SG403A-HE de The Baker Company. La agitación de las muestras incubadas se realizó en un agitador alternativo 2506 de MaxQ™. El recuento de UFC se realizó en un contador de colonias CC-1 de BOECO. La esterilización se realizó en autoclave modelo 25x-1 de ALL AMERICAN. Los cristales se secaron en un horno eléctrico de convección OSK-95000 de OBAWA SEIKI. La espectrometría de infrarrojo se realizó en un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier FT / IR-4200 tipo A de JASCO, equipado con fuente de luz estándar, detector TGS, resolución  $4\text{ cm}^{-1}$ , trabajando en una longitud de onda de 600 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Los difractogramas se obtuvieron en un difractor de rayos X D8-Advance de BRUKER. Las imágenes SEM-EDS se obtuvieron en un microscopio electrónico de barrido en tándem EDS, JEOL IT300 XMAN1 de Oxford Instrument utilizando alto vacío y condiciones de presión cambiantes según las muestras, detector / SED / LVSED / BED-C.

Dos cepas bacterianas etiquetadas como RTB-017 y JK-1, entregadas por la Universidad Central del Ecuador, fueron identificadas con bases en su morfología y pruebas bioquímicas. Entre las pruebas se utilizó tinción de Gram, test de citrato, reducción de nitrato, test de catalasa, test de rojo metilo y test de Voges-Proskauer. Finalmente, estas pruebas fueron comparadas con los resultados reportados en la bibliografía.

## Medios de cultivo

El medio B4 modificado (B4M)(Márcia Aiko *et al.* 2011) se preparó con extracto de levadura (1g), glucosa (1g) y acetato de calcio monohidratado (5g) por litro de agua desionizada. El medio fue esterilizado en una autoclave a  $120^{\circ}\text{C}$  por 20 min. Cuando se alcanzó la temperatura ambiente fue guardado en el refrigerador a  $9.4^{\circ}\text{C}$  para posterior experimentación.

## Cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC)

Usando el procedimiento reportado por la Universidad de Vermont (Allen, no date) las UFC fueron calculadas utilizando los siguientes parámetros. 0.05 mL de una sexta dilución serial fueron plantados sobre agar nutritivo utilizando un asa de Digralsky, posteriormente fue incubada durante 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  (test por triplicado). Las colonias fueron contadas utilizando un contador de colonias. Los platos contables que sirven para hacer el cálculo poseen más de 30 colonias y menos de 300. Factor de dilución de la muestra (FDM) es calculado si la muestra fue diluida, previo a las diluciones seriales. Factor de dilución individual por tubo (FDIT) indica la dilución

presente en cada tubo individual, en este caso 2 mL del medio con microorganismos fueron diluidos en 8 mL de agua destilada. Factor de dilución total de serie (FDTS) indica la dilución total de todos los tubos combinados, para el caso actual se diluyó 6 veces. Factor de dilución del Sembrado (FDS) indica la cantidad de muestra sembrada en la placa de Petri. Factor de dilución Final (FDF) expresa la dilución total, tomando en cuenta todos los factores y se calculó el  $\text{FDF} = \text{FDM} \times \text{FDTS} \times \text{FDS}$ . Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL) es el cálculo final regresivo para obtener la concentración de la muestra original.

## Carbonatogénesis cualitativa

Una vez calculadas las UFC/mL, Erlenmeyers con 50 mL del medio de cultivo B4M fueron inoculados con 200  $\mu\text{L}$  de la cepa RTB-017, conteniendo  $\approx 8.8 \times 10^6$  UFC/mL, luego se cubrió la boca de cada Erlenmeyer con papel aluminio y pequeños orificios fueron elaborados para permitir la entrada y salida de aire, mientras que los controles negativos permanecieron estériles. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado. La incubación tuvo lugar en un baño de arena previamente esterilizada y luego añadida a un recipiente de metal colocada sobre una placa calefactora, regulada a  $40^{\circ}\text{C}$ . La temperatura de la arena fue comprobada utilizando un termómetro de mercurio hasta conseguir  $37^{\circ}\text{C}$  en algunos puntos de todo el recipiente. Los Erlenmeyers fueron colocados y cubiertos con la arena hasta alcanzar el volumen del medio. La plancha calefactora junto con la arena y los Erlenmeyers fueron colocados sobre un agitador, esto con el fin de obtener condiciones dinámicas 24/7. Finalmente, todo el conjunto fue cubierto con película de embalaje con el fin de evitar contaminación externa y pequeños agujeros fueron elaborados nuevamente para permitir la salida de gas y vapor. Tras 6 días de incubación, finalmente se hizo una separación de la materia orgánica presente en cada Erlenmeyer y los cristales precipitados.

## Separación de los cristales

Para realizar la separación de los cristales de carbonato desde la matriz orgánica, el medio fue transferido desde los Erlenmeyers a vasos de precipitación, aquellos cristales adheridos a la superficie de cristal fueron removidos usando una varilla de vidrio. A continuación, se realizó un filtrado al vacío de las muestras utilizando filtros Whatman, seguido de múltiples lavados con agua destilada. Los filtros Whatman que contenían los cristales fueron colocados dentro de agua caliente y con una suave agitación los cristales y la matriz orgánica restante fueron liberados. Se retiró el filtro Whatman, se añadió agua destilada y los vasos de precipitación fueron puestos en reposo, con el fin de permitir que los cristales precipiten, a continuación, el sobrenadante es decantado. Este proceso se repite hasta que los cristales sean visibles a través del vaso de precipitación. A continuación, ya sin matriz

orgánica presente, los cristales fueron filtrados utilizando papel filtro normal y secados en la estufa a 40°C durante 30 min. Finalmente, los cristales fueron guardados en tubos Eppendorf para posterior análisis.

### Pruebas de consolidación sobre muestras de rocas carbonáticas

Se utilizaron pequeñas muestras de rocas carbonáticas para probar la consolidación de los bioprecipitados de carbonato de calcio. Las muestras fueron cortadas con dimensiones de 3 cm x 2 cm x 0.5 cm. Después fueron pesadas y esterilizadas en el autoclave a 120°C por 20 min previo al tratamiento. Las pruebas de consolidación se llevaron a cabo sumergiendo las muestras en Erlenmeyer con 50 mL de medio de cultivo B4M, los cuales fueron inoculados con 1 ml de la cepa RTB-017, con una densidad igual a  $2.74 \times 10^8$  células/mL, precultivado durante 48 horas a 25°C. Se realizó un experimento idéntico sin inocular como control. Los Erlenmeyer fueron cubiertos con papel aluminio y fueron incubados a 30° C y agitación 24/7 en el sistema utilizado para la carbonatogenesis cualitativa. Se midió el pH antes y después del tratamiento, y después de 23 días se retiraron las muestras de los Erlenmeyer, se lavaron varias veces con agua destilada y se secaron en la estufa a 40°C por 4 horas hasta que se estabilice su peso. Finalmente se pesaron las muestras y se analizaron mediante SEM-EDS y DRX.

### Resultados y Discusión

#### Cálculo de las unidades formadoras de colonia por mililitro

Después de la incubación, los platos contables presentaron 111 colonias en promedio. FDM permanece con un valor de 1 puesto que no hubo dilución previa. FDIT = 2/10, puesto que 2 mL de muestra se diluyeron en 8 mL de solución salina. FDTS fue calculado a partir de la dilución total de los 6 tubos, entonces  $\left(\frac{2}{10}\right)^6 = \frac{1}{15625}$  con PDF =  $\frac{0.05 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$ .

Reemplazando valores de  $\text{FDF} = \frac{1}{1} \times \frac{1}{15625} \times \frac{5}{100} = \frac{1}{312500}$

Finalmente, la regresión final nos indica  $\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = 111 \times$

$$\frac{1}{\frac{1}{312500}} = 34687500 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = 3.5 \times 10^7 \text{ UFC/mL.}$$

#### Resultados de las pruebas bioquímicas

De acuerdo con los resultados reportados por (Steinberg *et al.* 2016) la observación bajo microscopio de las colonias bacterianas presenta márgenes ondulados, largos e irregulares, adicionalmente la tinción debe dar como resultado una bacteria Gram positiva en forma de varilla [ver Figura 3]. Esta descripción coincide perfectamente con nuestros hallazgos. Los resultados de las pruebas bioquímicas fueron comparados con resultados bibliográficos (Slepecky and Hemphill 2006; Awais *et al.* 2007), reforzando la suposición de que los

microorganismos aislados son *Bacillus Subtilis*. Solo la cepa RTB-017 coincidió con todos los resultados esperados, por lo tanto, la cepa JK-1 fue descartada de las pruebas de carbonatogénesis cualitativa [ver Tabla]

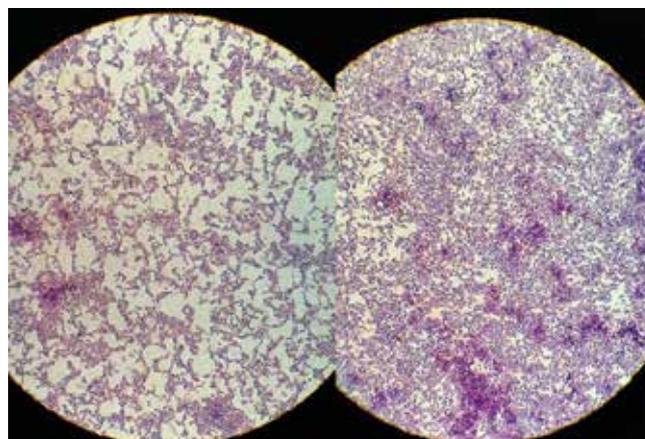


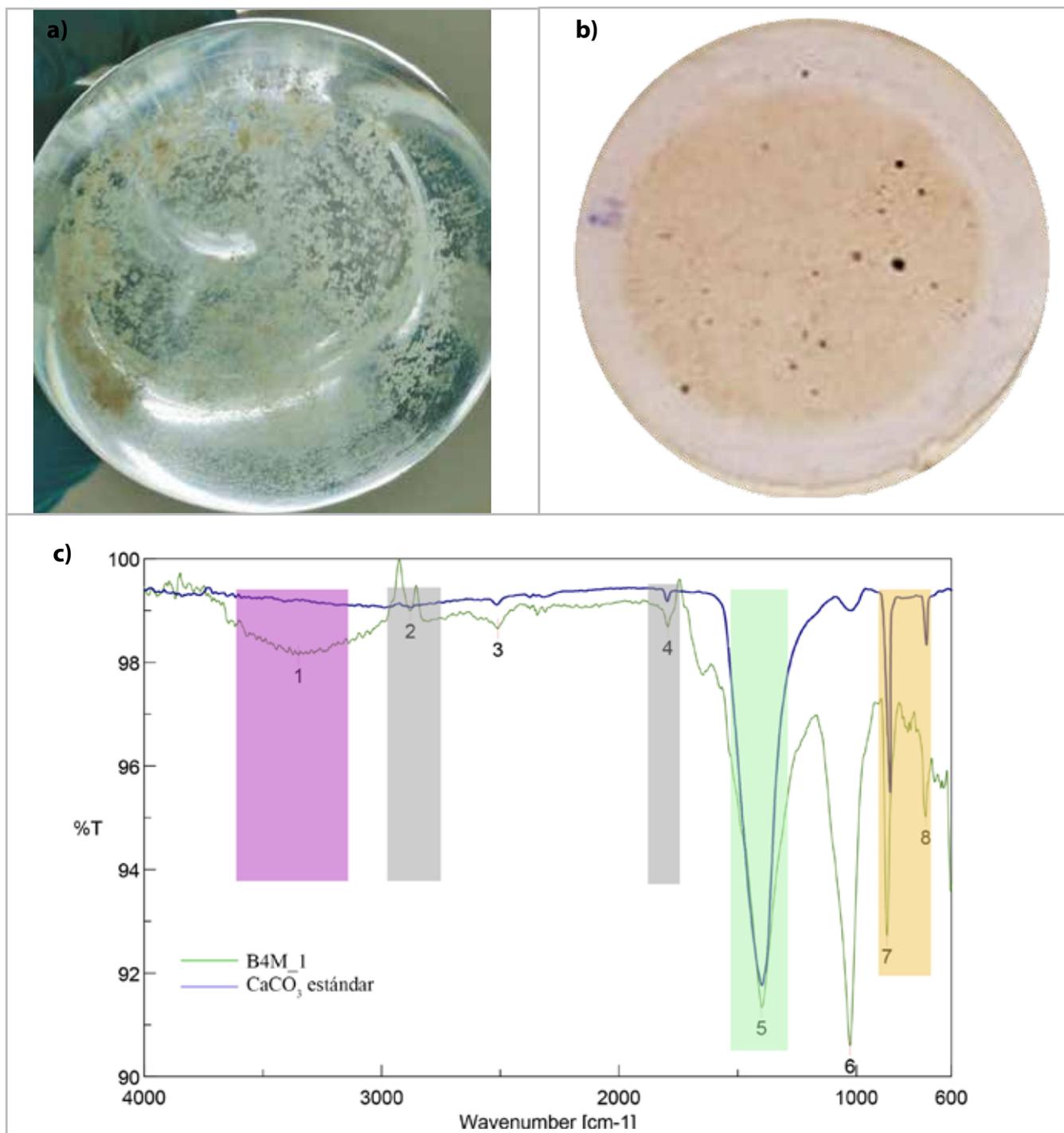
Figura 3.- Aislado RTB-017 después de tinción de Gram.

Test	RTB -017	Referencia	JK1
Citrato	+	+	-
Reducción de nitrato	+	+	+
Catalasa	+	+	+
Rojo de metilo	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+

Tabla 1.- Resultados de pruebas bioquímicas

#### Caracterización fisicoquímica de los carbonatos precipitados en medio acuoso

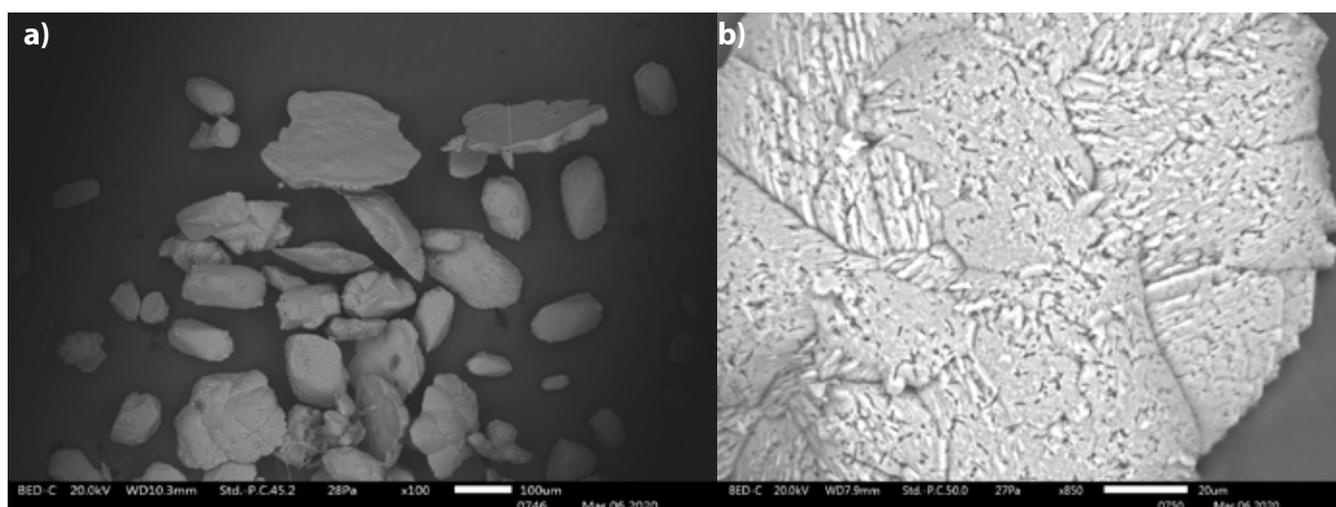
La muestra codificada como B4M\_1 fue caracterizada utilizando FT-IR, DRX y SEM-EDS. Observaciones iniciales muestran que los cristales precipitados del medio B4M muestran un color crema claro [ver Figura 4a y 4b]. La espectrometría por infrarrojo fue realizada utilizando muestras en polvo sin previa preparación. Los cristales fueron colocados directamente en el detector del FT-IR y el espectro obtenido fue comparado con carbonato de calcio estándar. CO<sub>2</sub> medioambiental fue eliminado del espectro final. Tanto el carbonato de calcio estándar como bioprecipitado mostraron las mismas señales presentes [ver Figura 4c]. Para la muestra B4M1, la señal en 1400 cm<sup>-1</sup> corresponde a la vibración de tensión de C-O (área verde) y las señales alrededor de 707 y 873 cm<sup>-1</sup> corresponden a la vibración de flexión dentro y fuera del plano (área naranja), bandas características de la calcita. La banda ancha entre ~2700 y ~3600 cm<sup>-1</sup> corresponden a la vibración de tensión de O-H debido a la presencia de agua (área rosada). Las bandas menores en 1795 cm<sup>-1</sup>, ~2875 cm<sup>-1</sup> y el primer sobretono en ~2990 cm<sup>-1</sup> corresponde al doble enlace C=O (área gris). Los análisis mediante DRX muestran que la cepa RTB-017 en medio B4M fue capaz de producir exclusivamente calcita.



**Figura 4.-** (a) Cristales bioprecipitados en el fondo de un Erlenmeyer después de varios lavados con agua destilada, (b) filtro Whatman después de filtración al vacío de los cristales precipitados, y (c) espectro de absorción FT-IR de las muestras B4M\_1 (verde), comparada con CaCO<sub>3</sub> estándar (azul).

Para estudiar la morfología de los cristales y su composición, utilizamos SEM/EDS. Las muestras fueron montadas en cinta de carbón. Algunos de los cristales fueron despegados del fondo de los Erlenmeyers utilizando una varilla de vidrio, por lo tanto, la presencia de cristales planos puede explicarse a través de su cristalización en las paredes del vidrio [ver Figura 5a]. La magnificación en la observación del precipitado permitió encontrar pequeños agujeros presentes en

todos los cristales, revelando que la superficie celular bacteriana también sirvió como sitio de nucleación [ver Figura 5b]. *Bacillus subtilis* incubado en el medio B4M produjo cristales blanquecinos, redondeados y planos, con un tamaño máximo observado de 200  $\mu\text{m}$ . El análisis semicuantitativo mediante EDS del precipitado muestra en su composición elemental la presencia de Ca, C y O corroborando la bioformación de cristales de carbonato de calcio [ver Tabla 2].



**Figura 5.-** Micrografías SEM de los cristales de  $\text{CaCO}_3$  obtenidos de la muestra B4M\_1 con (a) magnificación x100, y (b) magnificación x850.

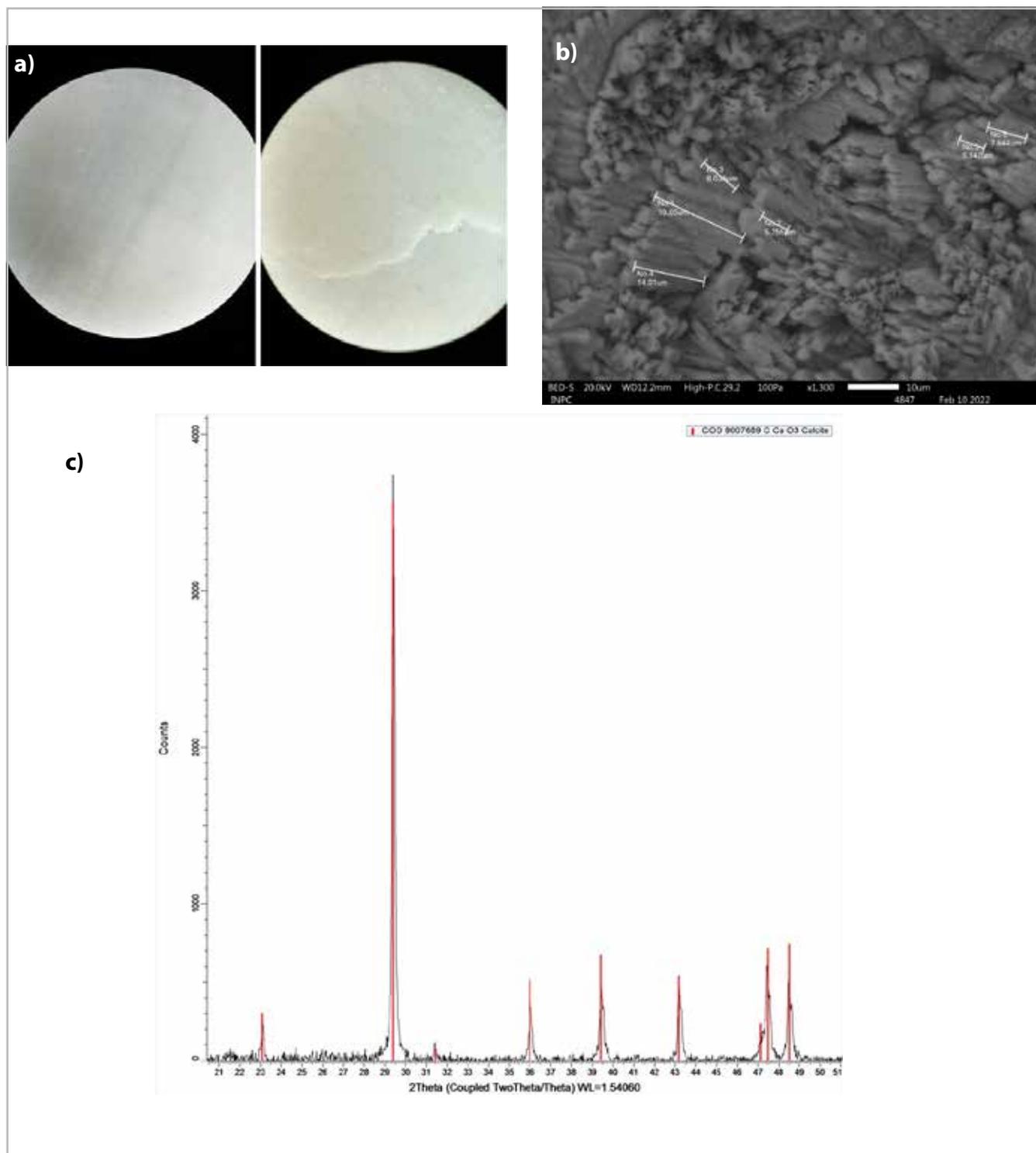
Elemento	% m/m				
	Espectro 25	Espectro 26	Espectro 27	Espectro 28	Espectro 30
C	27,79	19,11	20,86	16,67	16,67
O	52,22	50,08	34,87	49,86	49,51
Ca	19,78	30,33	43,68	32,93	33,34
Otros	0,21	0,48	0,60	0,54	0,48
Total	100	100	100	100	100

**Tabla 2.-** Composición química de la muestra B4M\_1

### Consolidación de carbonatos de calcio sobre muestra de roca carbonática

Después de analizar los resultados de los experimentos preliminares probando el crecimiento de la cepa RTB017 y su capacidad de precipitar carbonatos de calcio en el medio B4M, se realizaron experimentos para probar la capacidad de la cepa de producir carbonatos de calcio en la consolidación de muestras de rocas carbonáticas. Para ello se utilizaron pequeñas muestras, previamente esterilizadas, que fueron sumergidas en Erlenmeyers con 50 mL de medio de cultivo B4M, inoculados con 1 mL de la cepa que contenía una densidad igual a  $2.74 \times 10^8$  células/mL precultivado durante 48 horas (Bang, Galinat and Ramakrishnan 2001). Así como en los experimentos preliminares, se recreó un sistema para proporcionar condiciones de temperatura  $30^\circ\text{C}$  y agitación 24/7. Después de 23 días, se retiraron las muestras del medio, se secaron y pesaron. Los resultados muestran un incremento en el peso de la muestra de 53.7 mg y un cambio en el pH de la solución de 6.55 a 8.24 lo cual se atribuye a la formación de carbonatos de calcio en el medio (García-González *et al.* 2017). Las muestras control mantuvieron

su peso y pH inicial. Además, se puede observar una capa blanquecina, densa y homogénea de cristales de carbonato de calcio sobre la superficie de la muestra [ver Figura 6a]. En un estudio realizado por M. I. Daskalakis *et al.* aislaron dos de cepas pertenecientes a la familia *Bacillus* para probar la precipitación de carbonatos de calcio en la biorrestauración de piedra ornamental (Daskalakis *et al.* 2013). Los resultados mostraron un incremento de 17.0 mg para *B. licheniformis* después de 15 días y de 97.0 mg para *B. cereus* después de 20 días. Entonces, el valor obtenido del incremento de peso para la cepa RTB017 se encuentra dentro de ese rango. No obstante, se debe tener en cuenta las condiciones y medios en los cuales se realizaron los experimentos, así como la composición, estructura y porosidad de la muestra. Mediante el análisis en SEM se puede apreciar cristales con forma hexagonal y romboédrica [ver Figura 6b], característico para calcita (Dick *et al.* 2006). Los cristales precipitados tienen un tamaño que va desde  $5 \mu\text{m}$  a  $20 \mu\text{m}$ . Para el análisis en DRX, una parte del recubrimiento formado sobre la muestra fue retirado con un bisturí. Los resultados corroboran la formación de cristales de calcita mencionado anteriormente [ver Figura 6c].



**Figura 5.-** (a) Microfotografía (aumento x20) de la superficie de la muestra de roca carbonática antes (izquierda) y después (derecha) del tratamiento de PCIM, (b) micrografía electrónica de barrido de los cristales de calcita (aumento x1300), y (c) difractograma de rayos X del bioprecipitado comparado con la calcita.

### Conclusiones

Tras la verificación mediante pruebas bioquímicas podemos concluir que la cepa bacteriana local RTB-017 pertenece al género *Bacillus*, específicamente a la especie *Bacillus subtilis*, un microorganismo no patógeno. Después de inducir la precipitación de carbonato de calcio en medio B4M, se pudo comprobar la

producción de cristales blanquecinos, esta característica es muy importante al tratar una pieza patrimonial para restauración. Finalmente, se realizaron pruebas de consolidación sobre muestras de rocas carbonáticas resultando en la formación de una capa estable blanquecina de calcita. Este hallazgo es clave para futuros trabajos en la consolidación de estructuras patrimoniales (e.g., Las Cuatro Estaciones) usando bacterias locales no

patógenas que forman precipitados de carbonato de calcio sobre superficies carbonáticas.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a Michelle Mármol y Johanna Ramírez por su apoyo brindado en SEM-EDS y DRX, respectivamente. También, agradecemos a la Mgs. Eliana Barba del Laboratorio de Zoonosis y Jhan Karla Piluacán del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador por las cepas bacterianas suministradas. Al INPC por su apoyo al proyecto "Desarrollo de materiales para la restauración del Patrimonio Cultural"

## Referencias

- AL-THAWADI, S. M. (2011). 'Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand', *Journal of Advanced Science and Engineering Research*, 1. Available at: <https://www.sign-ific-ance.co.uk/dsr/index.php/JASER/article/view/26>.
- ALLEN, T. (no date) Serial Dilution Problem # 1. Available at: <https://www.uvm.edu/~btessman/calc/serhelp.html>.
- ANDREOLLI, M. *et al.* (2020). 'Bacteria from black crusts on stone monuments can precipitate CaCO<sub>3</sub> allowing the development of a new bio-consolidation protocol for ornamental stone', *International Biodeterioration & Biodegradation*, 153. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105031>.
- AWAIS, M. *et al.* (2007). 'Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by Bacillus SP', *Pakistan Journal of Botany*, 39(4): 1303–1312.
- BANG, S. S., GALINAT, J. K. AND RAMAKRISHNAN, V. (2001). 'Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized Bacillus pasteurii', *Enzyme and Microbial Technology*, 28(4–5): 404–409. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00348-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00348-3).
- CAMAITI, M., BORSELLI, G. AND MATTEOLI, U. (1988). *La conservazione del patrimonio monumentale: Prodotti consolidanti impiegati nelle operazioni de restauro*. 10th edn. Edited by s.e. s.l.: L'edilizia e l'industrializzazione.
- CARRIÓ, V. AND MARCOS, F. (2013). 'Pros and Cons of Restoration', *22nd Symposium for Palaeontological Preparation and Conservation Geological Curators' Group*, (November), 12. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19704.75526>.
- CHAPARRO-ACUÑA, S. P. *et al.* (2018) 'Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: Mechanism and applications of the process', *Acta Agronomica*, 67(2). <https://doi.org/10.15446/acag.v67n2.66109>.
- CHOI, S.-G. *et al.* (2020) 'Review on geotechnical engineering properties of sands treated by microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and biopolymers', *Construction and Building Materials*, 246(118415). <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.118415>.
- DASKALAKIS, M. I. *et al.* (2013) 'Pseudomonas, Pantoea and Cupriavidus isolates induce calcium carbonate precipitation for bioremediation of ornamental stone', *Journal of Applied Microbiology*, 115(2): 409–423. <https://doi.org/10.1111/jam.12234>.
- DICK, J. *et al.* (2006) 'Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by Bacillus species', *Biodegradation*, 17(4): 357–367. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-9006-x>.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, J. *et al.* (2017) 'Quality improvement of mixed and ceramic recycled aggregates by biodeposition of calcium carbonate', *Construction and Building Materials*, 154: 1015–1023. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.08.039>.
- GIORGI, R. *et al.* (2010) 'New Methodologies for the conservation of cultural heritage: Micellar solutions, microemulsions, and hydroxide nanoparticles', *Accounts of Chemical Research*, 43(6): 2. <https://doi.org/10.1021/ar900193h>.
- JOKILEHTO, J. (2005) 'Definition of cultural heritage: references to documents in history', ICCROM Working Group 'Heritage and Society', (January), 4–8.
- JOSEPH, E. (ed.) (2021) *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-69411-1>.
- MÁRCIA AIKO, J. S. *et al.* (2011) 'Effect of culture medium on biocalcification by pseudomonas putida, lysinibacillus sphaericus and bacillus subtilis', *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1517–8382).
- LE MÉTAYER-LEVREL, G. *et al.* (1999). 'Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony', *Sedimentary Geology*, 126(1–4): 25–34. [https://doi.org/10.1016/S0037-0738\(99\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0037-0738(99)00029-9).
- MICALLEF, R. *et al.* (2016). 'Biocalcifying Bacillus subtilis cells effectively consolidate deteriorated Globigerina limestone', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(7): 941–952. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1768-0>.
- DE MUYNCK, W. *et al.* (2011). 'Influence of pore structure on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation', *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19): 6808–6820. <https://doi.org/10.1128/AEM.00219-11>.
- ORTEGA-MORALES, B. O. AND GAYLARDE, C. C. (2021). 'Bioconservation of Historic Stone Buildings—An Updated Review', *Applied Sciences*, 11(12): 5695. <https://doi.org/10.3390/app11125695>.
- ORTEGA-VILLAMAGUA, E., GUDIÑO-GOMEZJURADO, M.

AND PALMA-CANDO, A. (2020). 'Microbiologically Induced Carbonate Precipitation in the Restoration and Conservation of Cultural Heritage Materials', *Molecules*, 25(23): 3–6. <https://doi.org/10.3390/app1112569510.3390/molecules25235499>.

PERALTA, E. AND MOYA, R. (2007). *Quito: Patrimonio Cultural de la Humanidad*. Maxigraf S.A.

PÉREZ, H. F. AND GARCÍA, M. G. (2020). 'Bioprecipitation of calcium carbonate by *Bacillus subtilis* and its potential to self-healing in cement-based materials', *Journal of Applied Research and Technology*, 18(5). <https://doi.org/10.22201/icat.24486736e.2020.18.5.1280>.

PIGGOT, P. J. (2009). 'Bacillus Subtilis', in *Encyclopedia of Microbiology*. 45–56. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00036-5>.

SLEPECKY, R. A. AND HEMPHILL, E. H. (2006). The Genus *Bacillus*-Nonmedical. <https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3>.

SOFFRITTI *et al.* (2019). 'The Potential Use of Microorganisms as Restorative Agents: An Update', *Sustainability*, 11(14). <https://doi.org/10.3390/su11143853>.

STEINBERG, D. *et al.* (2016). 'Bacillus subtilis manual', *Molecular Microbiology*, 1012–1025. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06467.x>.

ZHENG, T. AND QIAN, C. (2020) 'Influencing factors and formation mechanism of CaCO<sub>3</sub> precipitation induced by microbial carbonic anhydrase', *Process Biochemistry*, 91: 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.12.018>.

## Autor/es



**Erick Roberto Ortega**  
[erick.ortega@yachaytech.edu.ec](mailto:erick.ortega@yachaytech.edu.ec)  
Escuela de Ciencias Químicas e Ingeniería,  
Universidad Yachay Tech, Ecuador

Erick Roberto Ortega obtuvo su título de Químico en la Universidad Yachay Tech en 2021. Realizó investigaciones en el Instituto Nacional de Patrimonio Natural (INPC) del Ecuador sobre la bioprecipitación de carbonatos con el objetivo final de restaurar y mantener esculturas que pertenecen al INPC, y en otro proyecto el cual buscaba establecer en una columna geológica los tipos de polen para determinar especies durante períodos temporales. Actualmente investiga de manera independiente el uso de microorganismos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.



**Mariana Arcos**  
[mariana.arcos@yachaytech.edu.ec](mailto:mariana.arcos@yachaytech.edu.ec)  
Escuela de Ciencias Químicas e Ingeniería,  
Universidad Yachay Tech, Ecuador

Mariana Arcos egresada de la carrera de Química en la Universidad Yachay Tech. Fue ayudante de cátedra de Química 1 durante el segundo periodo del 2021 en la Universidad Yachay Tech. Además, es miembro activo del Club de Bienestar Animal Yachay desde 2020. También, fue parte de un grupo de investigación de hemoparásitos en aves para la evaluación de la malaria aviar en un gradiente longitudinal en un bosque seco del Ecuador del 2016 al 2017. Actualmente realiza su tesis de pregrado enfocada a la consolidación de carbonatos de calcio inducidos microbiológicamente sobre muestras de mármol y travertino en conjunto con el Instituto Nacional de Patrimonio Cultural (INPC) de Ecuador.



**Martha Romero Bastidas**  
[martha.romero@patrimoniocultural.gob.ec](mailto:martha.romero@patrimoniocultural.gob.ec)  
Instituto Nacional del Patrimonio Cultural  
(INPC), Quito, Ecuador

Doctora en Química (Universidad Central del Ecuador) y master en Arqueología del Neotrópico (Escuela Politécnica del Litoral). Especialista en análisis de materiales orientado al estudio y caracterización del patrimonio cultural y artístico ecuatoriano, donde aplica instrumentación analítica de laboratorio y portátil como: Microscopía óptica y electrónica, fluorescencia de rayos-X, difracción de rayos-X y micro difracción de Rayos-X, entre otras. Se ha dedicado al estudio de materiales y sus procesos de deterioro que sufre el patrimonio mueble e inmueble. Es investigadora y coordinadora de la unidad de Laboratorio y Análisis del Instituto Nacional de Patrimonio Cultural del Ecuador desde el 2003. Ha sido directora de proyectos de investigación y contraparte en proyectos internacionales.



**Carlos A. Vásquez Mora**  
[carlos.vasquez@patrimoniocultural.gob.ec](mailto:carlos.vasquez@patrimoniocultural.gob.ec)  
Instituto Nacional del Patrimonio Cultural  
(INPC), Quito, Ecuador  
<http://orcid.org/0000-0002-1637-9540>

Químico por parte de la Universidad Central del Ecuador. Master en Diagnóstico y Estado de Conservación de Patrimonio Histórico por la Universidad Pablo de Olavide en Sevilla, España. Es experto en el manejo de técnicas de análisis químico cualitativo, cuantitativo e instrumental con énfasis en la espectroscopia aplicada, uso analítico del sistema de imágenes multispectral (SIM) y caracterización de materiales de naturaleza orgánica. Es el responsable del área de microbiología y bioanálisis, además del manejo de técnicas de prospección magnetométricas aplicadas a la arqueología. Fue ayudante de cátedra en el año 2012 de las asignaturas Química

Ambiental, Química Agrícola, Organometálica, Cinética y Catálisis. De igual manera, participó de la XVI expedición ecuatoriana a la Antártida como investigador científico por parte de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador. Desde el año 2013 hasta la actualidad, se ha desempeñado como asistente de investigación e investigador Químico a tiempo completo en la Dirección de Investigación e Innovación del Instituto Nacional de Patrimonio Cultural del Ecuador (INPC). Ha participado como expositor en varias conferencias sobre temas científicos relacionados al análisis de obras de arte y bienes culturales en varias instituciones públicas y privadas a nivel nacional e internacional. También es cotutor y asesor de varias tesis de pregrado en distintas universidades a nivel nacional.

Artículo enviado el 19/05/2022

Artículo aceptado el 08/06/2022



<https://doi.org/10.37558/gec.v21i1.1119>



**Alex Palma Cando**

[apalma@yachaytech.edu.ec](mailto:apalma@yachaytech.edu.ec)

Grupo de Investigación (GIAMP), Escuela de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Yachay Tech, Ecuador. <http://orcid.org/0000-0002-9270-9599>

Alex Palma Cando (ORCID: 0000-0002-9270-9599) obtuvo su título de Químico en la Universidad Central del Ecuador en 2010. Desde 2011 hasta 2013, realizó sus estudios de Maestría en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) los cuales fueron enfocados en la electroquímica de polímeros conductores y en dispositivos orgánicos fotovoltaicos. Después realizó sus estudios doctorales en la Bergische Universität Wuppertal (BUW, Alemania) bajo la supervisión del Prof. Dr. Ullrich Scherf hasta febrero del 2017 cuando obtuvo su título de doctor (Dr. rer. nat.) con los más altos honores (summa cum laude). Desde abril 2017 se desempeña como profesor tiempo completo en la Escuela de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Yachay Tech impartiendo una variedad de cursos relacionados a la Ciencia de los Materiales, Cinética Química y Química General. Él ha dirigido y participado en diversos proyectos de investigación, y ha tutelado una serie de tesis de pregrado. Es miembro de la Sociedad Internacional de Electroquímica (ISE) y es miembro fundador del Grupo de Investigaciones Aplicadas en Materiales y Procesos (GIAMP). Colabora con instituciones nacionales e internacionales en el desarrollo de diversos proyectos interdisciplinarios como son (i) la carbonatogenesis aplicada a la consolidación de estructuras patrimoniales, (ii) el desarrollo de estructuras poliméricas microporosas con aplicación en dispositivos electrónicos orgánicos y sensores, y (iii) en el desarrollo de inhibidores de corrosión ecoamigables en aleaciones metálicas. Es autor de 23 publicaciones científicas en revistas indexadas y capítulos de libros.