

# Crecimiento de Cristales de $\text{CaCO}_3$ , como Resultado de la Actividad Microbiológica en Suelos

/ LAURA MORALES (1,\*), J.A. LÓPEZ-GONZÁLEZ (2), EDUARDO GARZÓN (1), ANTONIO GIMÉNEZ (1) Y ENRIQUE ROMERO (3)

(1) Departamento de Ingeniería Rural. Universidad de Almería. La Cañada de San Urbano 04120, Almería (España).

(2) Departamento de Biología Aplicada. Universidad de Almería. La Cañada de San Urbano 04120, Almería (España).

(3) Departamento de Ingeniería del Terreno, Cartografía y Geofísica. Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona (España).

## INTRODUCCIÓN.

La utilización de bacterias y otros microorganismos en los diversos campos de la ingeniería es un área de investigación que ha ido adquiriendo gran interés en los últimos años (Gray 2001, Weiner y Addadi 1997).

En este sentido, la inclusión de soluciones biotecnológicas a partir de la formación bacteriana de cristales de calcita, ha permitido tanto mejorar las propiedades hidráulicas (Dennis y Turner, 1998) como mecánicas del suelo (Whiffin et al., 2007; Van Paassen et al., 2007; Al-Thawadi, 2008; DeJong et al., 2010), así como restaurar rocas calizas pertenecientes a monumentos (Tiano et al., 1999; Rodríguez et al., 2003), empleo en biorremediación (Fujita et al. 2000, Warren et al. 2001), tratamiento de aguas residuales (Hammes et al. 2003), refuerzo y reparación de grietas de hormigón (Ramachandran et al 2001; Bang et al., 2001) y sellado selectivo para la recuperación de petróleo (Ferris y Setehmeir 1992; Gollapudi et al 1995; Nemati y Voordouw 2005).

Esto se puede obtener con la acción de las bacterias degradadoras de urea que producen amonio a partir de la hidrólisis de ésta, creando unas condiciones alcalinas necesarias para la precipitación de carbonato de calcio (Flórez y Lizcano, 2006).

Sobre este punto se presentan los resultados mineralógicos, químicos y estructurales obtenidos para una muestra de suelo areno limo-arcilloso procedente del sudeste de la Península Ibérica (suelo natural B-5), sobre el que se lleva a cabo un tratamiento microbiológico (suelo tratado BT-5) y en el que se estudia el crecimiento de cristales de  $\text{CaCO}_3$ , para un posterior uso en obras de ingeniería,

concretamente en obras lineales y estabilización de taludes.

## METODOLOGÍA.

Para provocar la precipitación de cristales de carbonato cálcico en los suelos investigados, se emplea un microorganismo de la familia Bacillaceae. Los microorganismos se adicionan a los suelos junto con el agua de compactación y las muestras se dejan envejecer en cámara húmeda a 30°C durante 7 días. Después, la acción microbiológica se frena mediante un tratamiento térmico, que consiste en un incremento de la temperatura.

Para llevar a cabo el estudio del crecimiento de cristales, se han desarrollado diferentes ensayos de caracterización mineralógica, mediante Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM), junto con análisis químico por Espectroscopia de Energías Dispersivas de Rayos X (EDX), así como difracción de Rayos X (XRD). Algunas muestras se contrastan con resultados obtenidos en el microscopio óptico.

También se realiza un estudio de las propiedades microestructurales del suelo, antes y después del tratamiento microbiológico, mediante Porosimetría por Intrusión de Mercurio (MIP).

Los ensayos llevados a cabo se han realizado a partir de unas condiciones iniciales establecidas. Parten de un Proctor normal (UNE 103500: 1994), correspondiente a una densidad seca óptima ( $\rho_d$ ) y una humedad comprendida entre la óptima  $\omega_{\text{ópt}}$  y la óptima menos el 2% ( $\omega_{\text{ópt}} - 2\%$ ). De manera que se trabaja en el lado seco del plano de compactación (grados de saturación menores de 80%), en el que los suelos presentan una mayor rigidez,

permeabilidad saturada y tienden a desarrollar colapso durante el mojado a tensiones elevadas (Prapaharan et al. 1991).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

El análisis mineralógico y químico del suelo B-5, mostró la predominancia de Silicio y Aluminio, lo que se asocia al cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) libre identificado por DRX, a la Albita ( $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ ) y a la Microclina ( $\text{KAlSi}_3\text{O}_8$ ). Sin embargo para el suelo tratado BT-5, se detecta además calcio, el cual se asocia con diferentes polimorfos del  $\text{CaCO}_3$  (principalmente cristales amorfos y calcita observados con las técnicas de SEM y FESEM) (Fig.1).

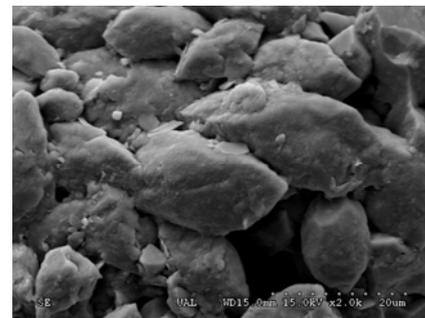


Fig 1. Imagen obtenida con SEM (x2000), donde se observan cristales romboédricos de calcita y cristales amorfos en el suelo BT-5.

Las imágenes de los minerales de carbonato obtenidas a través de SEM y FESEM, son contrastadas con un análisis cualitativo de EDX que pone de manifiesto la presencia de carbono, oxígeno y calcio en altas cantidades, lo que ratifica la aparición de cristales de  $\text{CaCO}_3$  en el suelo tratado microbiológicamente, no habiéndose detectado con anterioridad en el suelo natural B-5 (Fig 2).

**palabras clave:** microorganismos, precipitación, cristales, suelo.

**key words:** microorganisms, precipitation, crystal, soil.

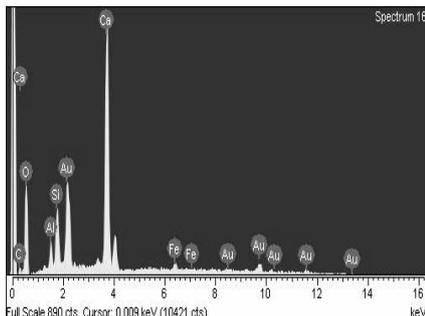


fig 2. Análisis EDX obtenido para los cristales presentados en la fig.1.

Estos cristales también son detectados en el microscopio óptico. Se observa como los cristales crecen en el área localizada en torno a los microorganismos como consecuencia de la sobresaturación de carbonatos y alcalinización del medio, condición necesaria para que el  $\text{CaCO}_3$  precipite. Es posible que esta alcalinización del medio se deba al movimiento de los cationes de calcio entre la membrana celular de la bacteria y su entorno (Hammes y Verstraete, 2002). También se observan diferentes estructuras cristalinas como consecuencia de diferentes procesos de sobresaturación. Los cristales de calcita aparecen como consecuencia de un proceso lento de precipitación química con un bajo nivel de sobresaturación de carbonatos, mientras que en el caso de los cristales amorfos la precipitación química se lleva a cabo bajo un alto nivel de sobresaturación y a una velocidad más elevada (Al-Thawadi, 2008).

En algunos casos es fácil identificar las bacterias calcificadas, puntos de nucleación, como consecuencia de esa sobresaturación de la membrana celular (fig. 3).

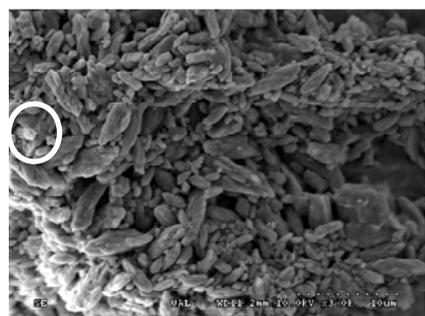


fig 3. Imagen SEM (x3000). Suelo BT-5. Detalle de calcita con forma cúbica, situada en un entorno de cristales amorfos de  $\text{CaCO}_3$  y bacterias calcificadas.

En cuanto a las propiedades microestructurales, la comparación entre los datos obtenidos para las muestras B-5 y BT-5, muestran que el

efecto de las bacterias se hace patente con una disminución de la porosidad en el rango  $3\mu\text{m} - 30\mu\text{m}$ .

Además, la energía de compactación es menos efectiva reduciendo los poros de mayor tamaño. El pico de los poros más grandes para BT-5 está en torno a los  $200\mu\text{m}$ , mientras que para el suelo natural, compactado con igual humedad y energía, está en torno a  $50\mu\text{m}$  (Morales et al. 2010).

Como conclusión del trabajo presentado se puede decir que la precipitación de cristales de carbonato cálcico, tiene lugar en los espacios porosos del suelo, que presentan un tamaño superior a las dimensiones de los microorganismos ( $1\mu\text{m}-2\mu\text{m}$ ). Es decir, los cristales precipitados actúan de material de relleno, sellando determinados poros. Como consecuencia, la función de distribución del tamaño de los poros cambia para el rango de  $3\mu\text{m}-30\mu\text{m}$ , de forma que en el suelo tratado tiende a desaparecer o ser más pequeño.

El uso de estos microorganismos como herramienta biotecnológica en el campo de la estabilización de suelos, se abre paso como posible cementante natural o como material de relleno del espacio poroso del suelo, de forma que puede variar las propiedades hidro-mecánicas de éstos.

#### REFERENCIAS.

Al-Thawadi, S. (2008) *High strength in-situ biocementation of soil by precipitating locally isolated ureolytic bacteria*. Tesis doctoral. Murdoch University.

Bang, S.S. and Ramakrishnan, V. (2001): "Microbiologically-enhanced crack remediation (MECR)." *Proceedings of the International Symposium on Industrial Application of Microbial Genomes*, Daegu, Korea, 3-13.

DeJong, J.T., Mortensen, B.M., Martinez B.C., Nelson D.C. (2010): *Bio-mediated soil improvement*. *Ecological Engineering*, **36**, 197-210.

Dennis, M.L., Turner, J.P. (1998): *Hydraulic conductivity of compacted soil treated with biofilm*. *J. Geotech. and Geoenviron. Engrg.*, **124**, 120-127.

Ferris, F. G., and L. G. Stehmeier. (1993): *Bacteriogenic mineral plugging*. U.S. patent 5,143,155.

Flórez J. A., Lizcano, A. (2006): *Estabilización de suelos con biocemento*. ICYA 2006-23.

Fujita, Y., F. G. Ferris, R. D. Lawson, F. S. Colwell, and R. W. Smith. (2000) *Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria*. *Geomicrobiol. J.* **17**, 305-318.

Gollapudi, UK., Knutson, CL., Bang, SS.,

Islam, MR. (1995): *A new method for 465 controlling leaching through permeable channels*. *Chemosphere*. **30**, 695-705.

Gray, D. (2001): *Microbial Stabilization*. University of Michigan. Comunicación por Internet

Hammes F. (2002): *Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation* *Environmental Science and Biotechnology*, **1**, (1), 3-7.

Hammes, F., Seka, A., de Knijf, S., Verstraete, W. (2003): *A novel approach to calcium removal from calcium-rich industrial wastewater*. *Water Res.* **37**, (3), 699-704.

Morales, L., Garzón, E., Romero, E. & Jommi, C. (2010) *Effects of a microbiological compound for the stabilisation of compacted soils on their microstructure and hydro-mechanical behavior*. *Conference of Unsaturated Soils*. Edited by Alonso & Gens.

Nemati, M., Voordouw, G. (2005): *Permeability profile modification using bacterially formed calcium carbonate: comparison with enzymic option*. *Proc Biochem*. **40**, 925-933.

Prapaharan, S., White, D.M. & Altschaeffl, A.G. (1991): *Fabric of field- and laboratory-compacted clay*. *J. Geotech. Engrg., ASCE*, **117**, (12), 1934-1940.

Ramachandran, S.K., Ramakrishnan, V., Bang, S.S. (2001): *Remediation of concrete using microorganisms*. *ACI Mater. J.* **98**, 3-9.

Rodríguez Navarro, C., Rodríguez Gallego, M., Chekroun, K. B., Gonzalez Muñoz, M. T. (2003): *Conservation of ornamental stone by Myxococcus xanthus-induced carbonate biomineralization*. *American Society for Microbiology* **69**, (4), 2182-2193.

Tiano, P., Biagiotti, L. Mastromei, G. (1999): *Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation*. *Journal of Microbiological Methods*. **36**, (1-2), 139-145.

UNE 103500 (1994), "Geotecnia. Ensayo de compactación. Proctor normal", AENOR, Madrid.

Van Paassen, L.A., Whiffin, V.S. & Harkes, M.P. 2007. *Immobilization of bacteria to a geological material*. Netherlands. Patent assignee Stichting GeoDelft. EP1798284-A1; WO2007069884-A1.

Warren, L. A., Maurice P. A., Parmar N. and Ferris F. G. (2001): *Microbially mediated calcium carbonate precipitation: implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants*. *Geomicrobiol. J.* **18**, 93-115.

Weiner, S. Addadi, L. (1997): *Design strategies in mineralized biological materials*. *Journal of Materials Chemistry*, **7**, (5), 689-702.

Whiffin, V.S., Van Paassen, L.A., Harkes, M.P. (2007): *Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique*. *Geomicrobiology J.* **24**, (5), 417-423.