

Efecto del Tween® 80 sobre la bioprecipitación de carbonato de calcio por *Bacillus cereus*

Effect of Tween® 80 on calcium carbonate bioprecipitation mediated by *Bacillus cereus*

Darly Yuliana Aristizábal Vásquez*, Gerardo Andrés Caicedo Pineda**,
María Consuelo Prada Fonseca***, Ana Elisa Casas Botero****, Hader Vladimir Martínez Tejada*****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.62007

Resumen

Se llevaron a cabo procesos de biosíntesis de carbonato de calcio, empleando una cepa de *Bacillus cereus*, aislada de los jardines de la Universidad Pontificia Bolivariana (Medellín, Colombia). Se evaluó el efecto disgregante del Tween® 80 a tres concentraciones: 0.00% p/v, 0.25% p/v y 0.50% p/v. Los experimentos se monitorizaron por 6 días con mediciones de pH y análisis mineralógicos a los precipitados finales por microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X y espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier. El Tween® 80 tuvo un papel importante como desaglomerante de las estructuras de carbonato formadas por los microorganismos. Aunque los ensayos con el surfactante presentaron menor formación de precipitado, las concentraciones evaluadas no inhibieron el crecimiento bacteriano. Adicionalmente, este compuesto favoreció la formación de vaterita incrementando su proporción en comparación con la calcita (alrededor del 98%, utilizando Tween® 80 al 0.50% p/v).

Palabras clave: Tween® 80; biomineralización; *Bacillus cereus*; calcita; vaterita.

Abstract

This research presents the sprinkling effect of Tween® 80 for three concentrations (0.00% w, 0.25% w y 0.50% w) in a processes of calcium carbonate biosynthesis. The assays used a culture of *Bacillus cereus*, isolated from the gardens of the Universidad Pontificia Bolivariana (Medellin, Colombia). The experiments were monitored for 6 days measuring pH as well as through mineralogical analyses for precipitates using scanning electron microscopy, X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy. Tween® 80 had an important role as deagglomerate, decreasing the precipitation of biomineralized-carbonate structures (generated by bacteria). It was also found that the evaluated concentrations did not inhibit the bacterial growth. Additionally, Tween® 80 favored the production of vaterite, increasing its ratio in comparison to calcite (around 98% by using 0.50% w of Tween® 80).

Keywords: Tween® 80; biomineralization; *Bacillus cereus*; calcite; vaterite.

Recibido: enero 16 de 2017

Aprobado: mayo 23 de 2017

* Estudiante Ingeniería Biomédica, Instituto Tecnológico Metropolitano, Calle 73 No. 76A - 354, vía al Volador (Medellín-Colombia), darlyvasquez1994@gmail.com.

** Ph.D. Ingeniería – Ciencia y Tecnología de los Materiales, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Avenida Central del Norte 39-115, Escuela de Química (Tunja-Colombia), gerardo.caicedo@uptc.edu.co.

*** MSc. Ingeniería de Materiales y Procesos, Biofenix S.A.S., circular 1 #70-01, Bloque 8, Laboratorio de Biofenix (Medellín-Colombia), mcpradafonseca@gmail.com.

**** Ph.D. Ingeniería Metalúrgica, Universidad Pontificia Bolivariana, circular 1 #70-01 (Medellín-Colombia), ana.casas@upb.edu.co.

***** Ph.D. Ingeniería Mecánica, Universidad Pontificia Bolivariana, circular 1 #70-01 (Medellín-Colombia), hader.martinez@upb.edu.co.

Introducción

Los carbonatos de calcio de diferentes morfologías y tamaños han despertado el interés de muchos investigadores en los últimos años, puesto que han demostrado excelentes propiedades que han impactado la industria biomédica. Ejemplos de esto puede ser sensores ópticos y electrónicos, la catálisis, dispositivos para almacenamiento de energía, pigmentos magnéticos, entre otros (Sung *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). El carbonato de calcio (CaCO_3) es uno de los minerales que puede formar compuestos híbridos orgánicos/inorgánicos con estructura y propiedades controladas. Dichas propiedades pueden ser la estructura del cristal, el tamaño de la partícula y la morfología del mineral. La característica morfológica es la que puede establecer la propiedad de la partícula, definiendo así también su aplicación (Stocks-Fischer *et al.*, 1999).

En la biosíntesis de carbonato de calcio, algunos de los microorganismos más conocidos pertenecen al género *Bacillus spp.* (Bachmeier *et al.*, 2002; Dupraz *et al.*, 2009). Se ha documentado el impacto de estos microorganismos en diversos procesos geológicos, evaluando su potencial para precipitar vaterita o calcita (Mitchell *et al.*, 2013; Sung *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Lo anterior, da pie a pensar en aplicar los mecanismos de mineralización bacteriana en procesos a nivel industrial, debido a que es un proceso innovador el cual se puede ejecutar bajo condiciones ambientales (Daskalakis *et al.*, 2015; Montoya *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2016).

Varios estudios han mostrado el impacto de ciertos parámetros sobre la cristalización de carbonatos de calcio y el control de la morfología (incluyendo la estructura, tamaño y forma), lo cual es importante pues cada vez se buscan partículas uniformes y de tamaños micro o nanométricos (Henderson *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 2001). Los mecanismos de biomineralización pueden ser afectados por factores como la sobresaturación de iones de calcio, la disponibilidad de nutrientes o fuentes de energía bacteriana en el medio de cultivo (carbono, nitrógeno, oxígeno disuelto, minerales, entre otros) y la relación estequiométrica entre ellos, el pH, la temperatura (Bachmeier *et al.*, 2002; Dupraz *et al.*, 2009; Mitchell *et al.*, 2013). Por lo tanto, este proceso puede ser manipulado de varias formas. Una de ellas es el uso de aditivos como el Tween® 80, tensoactivo que actúa sobre la mineralización del carbonato de calcio, controlando su morfología cristalina.

El polioxietileno-80-sorbitán monooleato (Tween® 80) se ha reconocido como un desaglomerante en procesos de síntesis química, físicos y biológicos. influyendo sobre

la morfología de las partículas de carbonato de calcio más reducidas y uniformes, al actuar sobre planos cristalinos específicos del mineral, inhibiendo el crecimiento en esas zonas, sin afectar la reacción de precipitación (Sung *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, en este estudio se evaluó qué efecto tiene el Tween® 80 a tres concentraciones: 0.00% p/v, 0.25% p/v y 0.50% p/v, sobre la bioprecipitación de carbonato de calcio, empleando una cepa de *Bacillus cereus*. De antemano, se tuvo presente que este compuesto no inhibe el crecimiento bacteriano e incluso puede contribuir a que las células presenten una mayor estabilidad térmica de las enzimas dentro de este microorganismo (Evans & Abdullah, 2012; Nakahara *et al.*, 1979). Se emplearon técnicas de caracterización mineralógica con el fin de confirmar los cambios morfológicos y el tipo de mineral obtenido.

Materiales y métodos

Microorganismo

Se utilizó una cepa de *Bacillus cereus* U1/UPB, aislada de material terroso procedente de los jardines de la Universidad Pontificia Bolivariana (Medellín, Colombia) y conservada en el Cepario del Laboratorio de Biofenix S.A.S. Se identificó molecularmente por el Laboratorio del Centro Nacional de Secuenciación Genómica (CNSG) de la Universidad de Antioquía, utilizando la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se realizó la extracción de ADN y la amplificación del gen 16S, la secuenciación del gen 16S y el análisis filogenético. La cepa tuvo una adaptación previa al proceso de biomineralización de carbonato de calcio al medio M3 modificado (0.50% de acetato de calcio y 0.40% de tripton), en varias etapas consecutivas, con duración de 6 días cada una, hasta no observar variaciones entre réplicas, respecto a valores como pH y la cantidad de precipitado generado.

Los inóculos para cada cultivo bacteriano a diferentes concentraciones en peso de Tween® 80 (0.00%, 0.25% y 0.50%) se prepararon en Erlenmeyer de 250 mL, usando un volumen de trabajo de 100 mL y una relación de 1 mL de inóculo bacteriano por cada 9 mL de medio M3 modificado (con la respectiva concentración de Tween® 80 evaluada). Las cepas se incubaron por 6 días en un agitador orbital, a una temperatura de $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y una velocidad de agitación de $180 \text{ rpm} \pm 2 \text{ rpm}$.

Ensayos de bioprecipitación de carbonato de calcio

Cada ensayo fue preparado en Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen de trabajo de 100 mL y una relación de 1 mL de inóculo bacteriano por cada 9 mL de me-

dio de cultivo M3 modificado, variando la concentración de Tween® 80 (porcentajes en peso): 0.00%, 0.25% y 0.50%. Cada ensayo tuvo su respectiva réplica y control abiótico (sin presencia de microorganismos). Todos los experimentos fueron incubados por 6 días a las mismas condiciones de temperatura y agitación utilizadas en la preparación de los inóculos.

Los experimentos se monitorizaron con mediciones de pH, utilizando un pH-metro HACH HQ 30d. Al finalizar cada ensayo, se calculó la cantidad de precipitado producido, para lo cual se tomó 80 mL de cada erlenmeyer y se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos. Pasado ese tiempo, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 4 veces con agua destilada y 4 más con alcohol al 90%, agitando en vórtex por 1 minuto y nuevamente centrifugando a 3500 rpm. Posteriormente, se secaba la muestra a temperatura ambiente. El producto final se utilizó para determinar la cantidad de precipitado formado por litro de medio, dividiendo el peso obtenido sobre el volumen inicial empleado.

Análisis mineralógicos

Se estableció la composición mineralógica de las muestras mediante difracción de rayos X (XRD), análisis por espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Para todos los análisis, se utilizaron las muestras sin someterse a ningún proceso de tamizaje, ni se utilizó alguna mezcla en polvo para la purificación del precipitado. Tampoco se usó ninguna transformación de tamaño de partícula.

Para XRD, el precipitado se analizó en un difractómetro marca Rigaku Miniflex II, con radiación K_{α} mediante el método paso a paso, en el intervalo 2θ entre 5° y 70° , tamaño del paso de 0.05° , con un tiempo de conteo de 50 segundos. Los minerales presentes

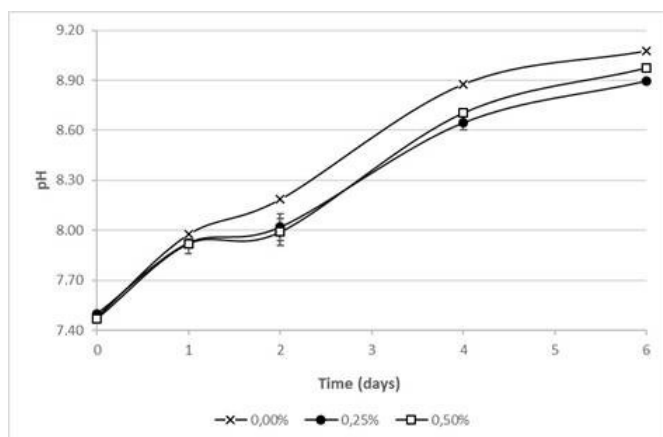


Figura 1. pH vs. tiempo durante el proceso de bioprecipitación de calcio a diferentes concentraciones de Tween® 80.

en el precipitado fueron cuantificados mediante refinamiento de Rietveld, cuyas simulaciones y cálculos se llevaron a cabo en el programa X'Pert HighScore Plus®, las bases de datos PDF-4-2012 y *American Mineralogist Crystal Structure Database* (Downs & Hall-Wallace, 2003). Los análisis de FTIR se hicieron en un espectrómetro marca Thermo Scientific Nicolet, utilizando el modo ATR con la muestra pura, con un intervalo de número de onda entre 400 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} y 32 barridos, a una resolución espectral de 4 cm^{-1} . En el caso de SEM, la muestra fue recubierta con una fina capa de plata. La técnica de recubrimiento "sputtering" o pulverización catódica se realizó con un equipo DENTON VACUUM DESK IV. El análisis se hizo en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL JSM-6490LV, con un voltaje de 20 kV. Adicionalmente, se utilizó una microsonda de Rayos X - EDS, referencia INCA PentaFETx3 Oxford Instruments, para hacer los análisis microquímicos de la muestra.

Resultados

Ensayos de bioprecipitación de carbonato de calcio

La figura 1 muestra el comportamiento del pH para todos los ensayos. En general, se evidenció un aumento en los valores de pH por encima de 8.9. El ensayo sin adición de Tween® 80 mostró un incremento continuo en los valores de pH, en contraste a los ensayos con Tween® 80 que no presentaron una variación significativa entre los días 1 y 2 de proceso. No obstante, todos los ensayos presentaron una tendencia similar en los días siguientes, indicando que hubo crecimiento bacteriano en todos los experimentos. Por otra parte, los controles negativos, no evidenciaron cambios en los valores del pH, manteniendo el mismo valor inicial durante todo el proceso (datos no mostrados).

La figura 2 muestra la cantidad de carbonato de calcio sintetizado por la cepa *Bacillus cereus*. El ensayo sin adición del surfactante (0.00%) mostró mayor precipitación (3.23 g/L), en comparación a los demás ensayos, los cuales obtuvieron una producción similar, alrededor de 2.90 g/L.

Análisis mineralógicos

La figura 3 muestra los difractogramas de rayos X para los precipitados obtenidos en los ensayos. Todos evidenciaron picos asociados a vaterita y calcita. No obstante, el ensayo con Tween® 80 al 0.50% mostró mayor intensidad en los picos asociados a vaterita y casi no se evidenciaron picos asociados a calcita.

Mediante el refinamiento Rietveld de los difractogramas, la tabla 1 constata las proporciones semicuantitativas de las fases cristalinas de vaterita y calcita en

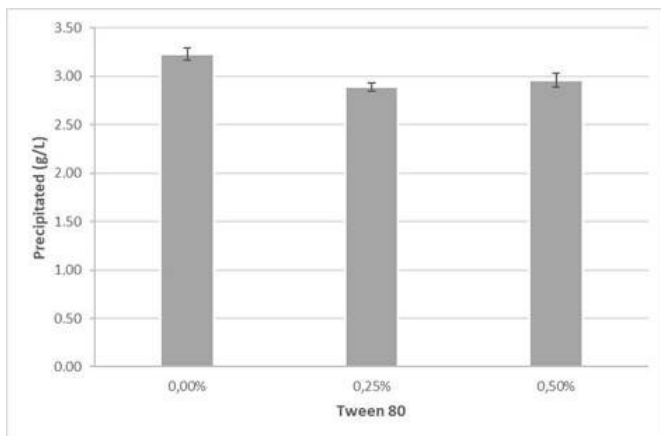


Figura 2. Bioprecipitado de carbonato de calcio sintetizado por *Bacillus cereus*, empleando las concentraciones de Tween® 80 (0.00%,0.25%,0.50%).

todos los precipitados, con un perfil residual ponderado (*weighted residual profile*: R_{wp}) por debajo del 10%, el cual no difería más del 20% respecto al perfil residual esperado (*residual expected*: R_{exp}). Estos parámetros determinaron que los modelos de refinamiento fueron buenos para aceptar los valores obtenidos (Kniess *et al.*, 2012; McCusker *et al.*, 2011). La proporción de calcita fue menor, en la medida que incrementaba la concentración de Tween® 80, disminuyendo a la mitad al emplear 0.25%, mientras que con una concentración de 0.50%, el porcentaje de calcita fue de 1.6%.

La figura 4 muestra los espectros de FTIR para todos los precipitados y la tabla 2 muestra la identificación de las bandas y su respectiva asignación (Daskalakis *et al.*, 2015; DePaula *et al.*, 2013; Montoya *et al.*, 2005; Patil *et al.*, 2014; Saikia & Das, 2014; Sevcík *et al.*, 2015; Silverstein *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2016; Trushina *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2010). Se corroboró la presencia de calcita y vaterita en todos los precipitados. La banda a 713 cm^{-1} indica la presencia de calcita en los ensayos 0.00% T80 y 0.25% T80, siendo el ensayo sin adición de Tween® 80 donde se presentó en mayor intensidad. La banda a 1087 cm^{-1} , asociada a vaterita, se muestra con mayor amplitud en los ensayos con

Tabla 1. Porcentaje de calcita y vaterita en fase cristalina de los precipitados obtenidos en los ensayos a diferentes concentraciones de Tween® 80.

Ensayo	Calcita	Vaterita
0.00% T80	32.40%	67.60%
0.25% T80	16.30%	83.70%
0.50% T80	1.60%	98.40%

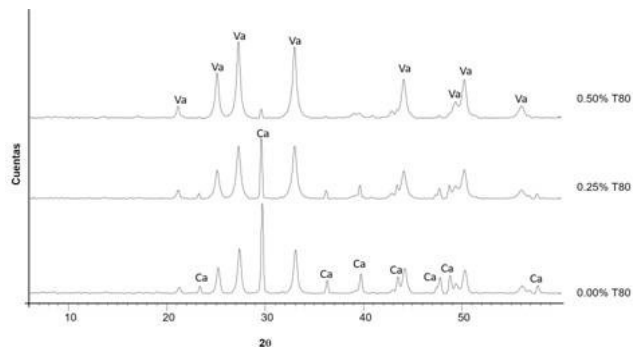


Figura 3. Difractogramas de los precipitados para cada ensayo a diferentes concentraciones de Tween® 80. Va: Vaterita, Ca: Calcita.

Tween® 80, probablemente asociado a la mayor concentración de este polimorfo en dichos ensayos. La banda a 1707 cm^{-1} hace referencia a vestigios de materia orgánica, posiblemente proveniente de alguno de los compuestos del medio de cultivo o de alguno de los productos del metabolismo de los microorganismos. La banda a $1648\text{-}1653\text{ cm}^{-1}$ revela la presencia de humedad natural o alguna pequeña fracción de carbonato hidratado y la banda a $3282\text{-}3287\text{ cm}^{-1}$ indica las interacciones O-H, probablemente correspondientes al alcohol remanente de la etapa de lavado o a absorción de humedad, cuando se secó a temperatura ambiente.

La figura 5 muestra las imágenes obtenidas a partir de microscopía electrónica de barrido. El ensayo sin adición de Tween® 80 presentó formaciones de carbonato de calcio tipo corazas huecas, biomineralizadas a partir de la morfología bacilar de las bacterias. En contraste, en los ensayos con adición de Tween® 80 se observó disgregación o desaglomeración de estas estructuras (figuras 5b y 5c), así como películas de carbonato de calcio depositadas (figuras 5d y 5e). Sin embargo, la figura 5f indica que algunas de las cora-

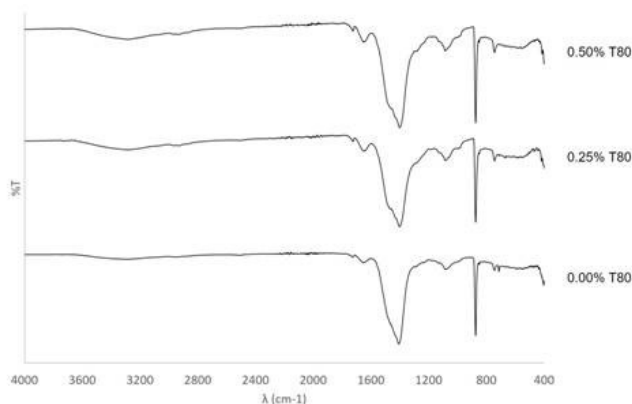


Figura 4. Espectros de FTIR de los precipitados para cada ensayo a diferentes concentraciones de Tween® 80.

Tabla 2. Bandas de los espectros de FTIR de los precipitados obtenidos en los ensayos a diferentes concentraciones de Tween® 80.

Banda (cm ⁻¹)	Asignación	Ensayos
713	CO ₃ ²⁻ asociado a calcita	0.00% y 0.25%
745	CO ₃ ²⁻ asociado a vaterita	Todos
874	CO ₃ ²⁻ de carbonatos	Todos
1087	CO ₃ ²⁻ asociado a vaterita	Todos
1400-1402 [†]	CO ₃ ²⁻ asociado a calcita	Todos
1430	CO ₃ ²⁻ asociado a vaterita	Todos
1648-1653 [†]	H-OH	Todos
1707	C=O (orgánico)	Todos
3282-3287 [†]	O-H (alcohol)	Todos

[†]Los ensayos tienen solo una banda que está entre estos valores, los cuales representan una misma asignación.

zas todavía se mantuvieron definidas y además se evidenciaron partículas esféricas, relacionadas con la vaterita (figura 5f).

A partir de los análisis de SEM, se hicieron análisis microquímicos sobre las estructuras de carbonato de calcio obtenidas en los ensayos. La figura 6 hace referencia a los precipitados obtenidos en los ensayos sin adición de Tween® 80. Al compararse con las relaciones atómicas ideales de carbonato de calcio (20% Ca: 20% C: 60% O), da indicio de que dichas partículas,

o sus alrededores, presentan componentes de materia orgánica, posiblemente proveniente de algunos compuestos precipitados, producto de los mecanismos de reacción del microorganismo o vestigios de las bacterias que estaban dentro de las estructuras.

La figura 7 muestra el análisis microquímico realizado sobre una película de carbonato formada en el ensayo en el cual se adicionó 0.25% de Tween® 80. La proporción atómica entre el calcio y el carbonato es aproximadamente de 1:1, denotando que se obtuvie-

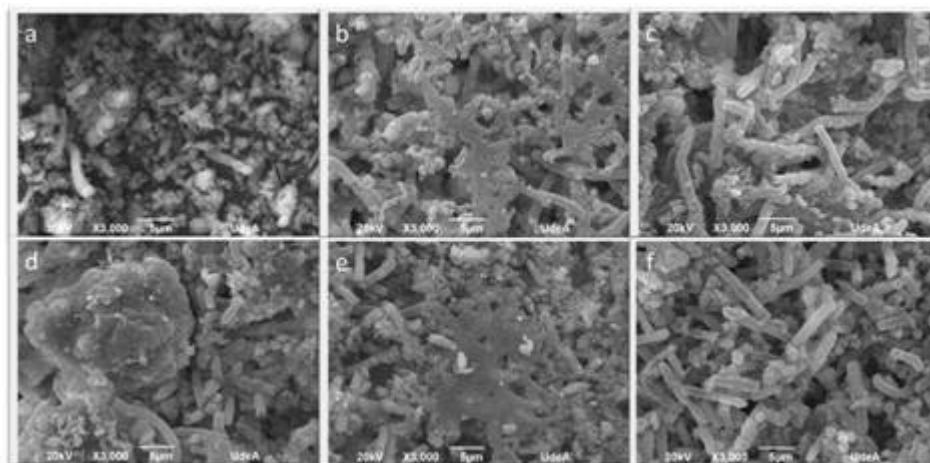


Figura 5. Imágenes de SEM de precipitados para ensayos a diferentes concentraciones de Tween® 80. (a) 0% Tween® 80, (b) 0.25% de Tween® 80, recubrimientos biominederalizados aglomerados, (c) 0.25% de Tween® 80, corazas biominederalizadas y partículas esféricas de vaterita, (d) 0.25% de Tween® 80, películas de carbonato aglomeradas, (e) 0.50% de Tween® 80, películas de carbonato aglomeradas y (f) 0.50% de Tween® 80, recubrimientos biominederalizados definidos.

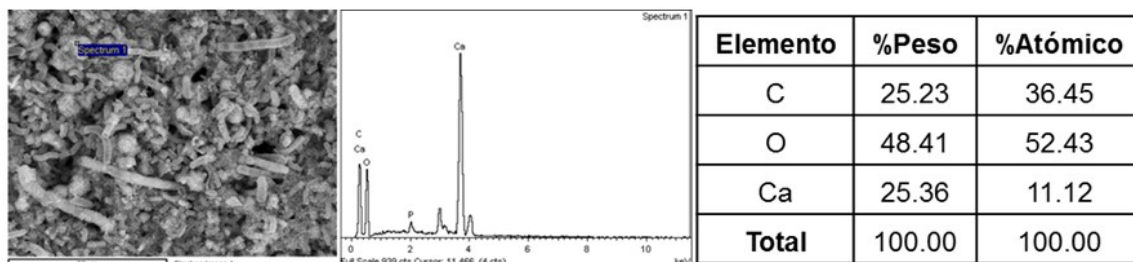


Figura 6. Análisis microquímico sobre partículas que recubren los recubrimientos de los microorganismos biomineralizados (0.00% Tween® 80).

ron partículas de mayor pureza, que las obtenidas en el ensayo sin adición de Tween® 80 (figura 6).

Discusión

Es importante señalar que la medición de pH muestra de manera indirecta el crecimiento celular en este proceso en particular y permite dar a entender de forma cualitativa cómo los microorganismos actúan dentro del proceso. El aumento en los valores de pH (figura 1) puede ser explicado por el CO₂, que se produce a partir de la amonificación generada por la actividad metabólica microbiana, lo cual alcaliniza el medio y contribuye a la cementación de carbonato de calcio (figura 2), en presencia de la sal de acetato (Liang *et al.*, 2013). Por otra parte, la tendencia a estabilizar este valor, en los últimos días de proceso, podría deberse a un agotamiento de la fuente de carbono (triptona) y los iones de calcio (acetato de calcio) disponibles en el medio y necesarios para que se dé la respiración celular (Stocks-Fischer, Galinat, & Bang, 1999; Wong, 2015).

Los recubrimientos biomineralizados de carbonato de calcio (figura 5) se pudieron generar a partir de la interacción estequiométrica de los iones Ca²⁺ del medio con grupos CO₃²⁻ cargados, presentes en la membrana externa de la bacteria, permitiendo la deposición mineral y generando paredes bacilares (figuras 5 y 6) (Douglas & Beveridge, 1998; Komala & Khun, 2013).

Después de la precipitación, la segunda etapa implicaría el aumento de la concentración de carbonato de calcio y la saturación de la superficie celular, generando una aglomeración y precipitación fuera de la célula (figura 7), la cual no es controlada por el microorganismo, sino por el ambiente físico-químico de la superficie, alrededor de cada bacteria (Douglas & Beveridge, 1998).

Teniendo en cuenta los resultados de EDS (figuras 6 y 7), el mayor valor de precipitado en el ensayo sin adición de Tween® 80 (figura 2), podría estar relacionado con una porción de materia orgánica que precipitó junto al carbonato, la cual pudo provenir de algún subproducto del medio. Sin embargo, con base en las investigaciones preliminares, relacionadas con la cristalización de carbonato de calcio bajo diferentes condiciones, este hecho también pudo estar relacionado con la propagación y metabolismo del microorganismo que favorece la síntesis del mineral de interés, ya que, al no tener agregado el Tween® 80, este podría segregar metabolitos que acelerarían la hidratación de CO₂, regulando las concentraciones de CO₂ y HCO₃⁻ y modificando el pH del medio (Matahwa *et al.*, 2008; Parks, 2009; Stocks-Fischer *et al.*, 1999).

Aunque los ensayos con adición de Tween® 80 presentaron alrededor de 10% menos peso de precipitados que el ensayo sin el aditivo (figura 2), la morfología y el tamaño de partícula obtenido fue diferente (figura 5), así como se pudo evidenciar un producto

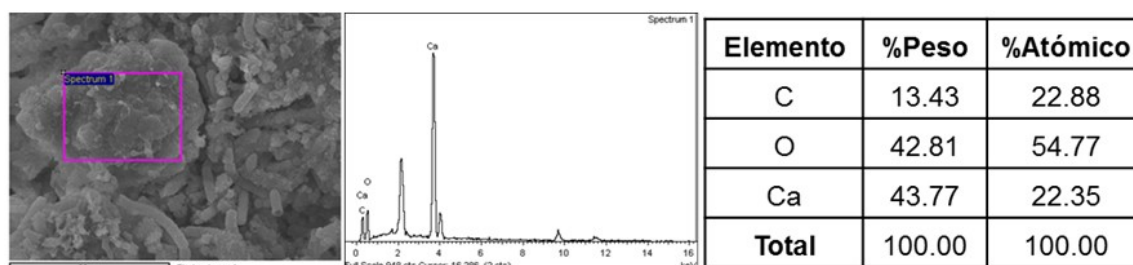


Figura 7. Análisis microquímico sobre partículas que recubren los recubrimientos de los microorganismos biomineralizados (0.25% Tween® 80).

de mayor pureza (figura 7). El Tween® 80 es un aditivo alimentario con acción detergente emulsionante, el cual pudo actuar como un agente dispersante en el proceso de producción de carbonato de calcio, contribuyendo a disgregar cúmulos o las estructuras biomineralizadas de los microorganismos. En investigaciones sobre síntesis química de calcita, se ha encontrado que este tensoactivo no iónico tiene un efecto significativo sobre la morfología de los cristales, ya que se adsorbe y forma enlaces con una cara cristalina específica, inhibiendo el crecimiento del mineral en esa zona, pero sin afectar la reacción entre los iones Ca^{2+} y el CO_3^{2-} hidratado, lo cual solo induciría a un cambio de la forma, pero no del producto (Patil *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2008).

En cuanto a las variaciones de las proporciones de vaterita y calcita, observadas en los análisis de XRD (tabla 1), estas contrastan con los resultados obtenidos en procesos de síntesis química, donde se ha evidenciado que la inclusión de Tween® 80 solo promueve una leve formación de vaterita (con predominio de calcita) y, además, este polimorfo tendería a desaparecer y transformarse en calcita (Patil *et al.*, 2014).

La estabilidad de la biovaterita podría explicarse por el efecto de los microorganismos sobre la formación de carbonato, gracias a la producción de biomoléculas por la pared celular de las bacterias, donde compuestos iónicos de fósforo, grupos carboxílicos o polisacáridos presentes en ella juegan un papel importante en coordinar la orientación del calcio y el carbonato (Daskalakis *et al.*, 2015).

De acuerdo con los resultados obtenidos, fue posible evidenciar la formación de carbonatos de calcio en todos los experimentos, independiente de la concentración de Tween® 80 empleada. Esto indica posiblemente que las células pueden crecer, desarrollarse y formar carbonatos de calcio de manera tal que este aditivo no es un inhibidor celular, por lo menos a las concentraciones evaluadas en este estudio. Adicionalmente, este tensoactivo pudo incrementar el rendimiento en la formación de los compuestos necesarios para la estabilización de la vaterita, sin afectar la síntesis bioquímica de la bacteria, obteniéndose una biomineralización de carbonatos de mejor calidad con una morfología controlada, reducida y uniforme, ya que los análisis de FTIR (figura 4) y EDS (figura 7) mostraron presencia poco significativa de componentes adsorbidos sobre el precipitado, diferentes al carbonato de calcio (Dupraz *et al.*, 2009; Evans & Abdullah, 2012; Weiner & Dove, 2003).

Conclusiones

El proceso de biomineralización de carbonato de calcio mediado por *Bacillus cereus*, permite, en su mayoría, la formación de estructuras en forma de coraza con morfología bacilar y centro hueco, las cuales se componen de partículas de carbonato de calcio (vaterita-calcita). No obstante, incluir el tensoactivo Tween® 80 en el medio de cultivo puede ayudar a disgregar dichas formaciones, en el caso que se consideren indeseables en algún tipo de proceso específico, actuando además como agente de dispersión, en procesos que puedan ser ejecutados comercialmente, ayudando a la formación de partículas de menor tamaño y de mejor calidad.

Aunque los microorganismos utilizados en este proyecto tuvieron mayor tendencia a formar partículas de carbonato de calcio en forma de vaterita, siempre existe un porcentaje de calcita en el precipitado final. Sin embargo, el Tween® 80 contribuyó a incrementar la proporción de biovaterita, indicando su capacidad de modificar algunas condiciones del bioproceso que favorezcan este fenómeno. Futuras investigaciones podrían centrarse en evaluar qué parte del proceso es la que afecta el surfactante, por ejemplo, su efecto sobre las enzimas que forman los subproductos que ayudan a estabilizar la proporción de vaterita.

Cabe señalar que la vaterita es de gran importancia dentro del área de la medicina, ya que tiene muchas aplicaciones dentro de la industria biomédica, en la preparación de drogas y cosmética, siendo apreciado por sus propiedades cristalinas particulares. De acuerdo a las concentraciones de Tween® 80 evaluadas, puesto que con 0.50% se obtuvo un 98% de biovaterita, una concentración ligeramente superior podría ser suficiente para obtener un mineral de mayor pureza.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Biofenix S.A.S. donde se llevó a cabo la investigación y la Corporación Ruta N (Medellín), la Universidad Pontificia Bolivariana y Biofenix S.A.S. quienes financiaron el proyecto "Bionanohealth", convenio 082C-2015.

Referencias bibliográficas

- Bachmeier, K. L., Williams, A. E., Warmington, J. R., & Bang, S. S. (2002). Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*, 93(2), 171-181.
- Daskalakis, M. I., Rigas, F., Bakolas, A., Magoulas, A., Kotoulas, G., Katsikis, I., Karageorgis, A. P., & Mavridou, A.

- (2015). Vaterite bio-precipitation induced by *Bacillus pumilus* isolated from a solutional cave in Paiania, Athens, Greece. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 99, 73–84.
- De Paula, S. M., Huila, M. F. G., Araki, K., & Toma, H. E. (2010). Confocal Raman and electronic microscopy studies on the topotactic conversion of calcium carbonate from *Pomacea lineata* shells into hydroxyapatite bio-ceramic materials in phosphate media. *Micron*, 41(8), 983–989.
- Douglas, S., & Beveridge, T. J. (1998). Mineral formation by bacteria in natural microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 26(2), 79–88.
- Downs, R. T., & Hall-Wallace, M. (2003). The American Mineralogist crystal structure database. *American Mineralogist*, 88(1), 247–250.
- Dupraz, S., Parmentier, M., Ménez, B., & Guyot, F. (2009). Experimental and numerical modeling of bacterially induced pH increase and calcite precipitation in saline aquifers. *Chemical Geology*, 265(1–2), 44–53.
- Evans, E. C., & Abdullah, A. (2012). Effect of Surfactant Inclusions on the Yield and Characteristics of Protease from *Bacillus subtilis*. *The Publishing House of the Romanian Academy, Series B*, 2, 108–112.
- Henderson, G. E., Murray, B. J., & McGrath, K. M. (2008). Controlled variation of calcite morphology using simple carboxylic acids. *Journal of Crystal Growth*, 310(18), 4190–4198.
- Kniess, C. T., Cardoso de Lima, J., & Prates, P. B. (2012). The Quantification of Crystalline Phases in Materials: Applications of Rietveld Method. in *Sintering - Methods and Products*, ISBN: 978-953-51-0371-4, 293–316.
- Komala, T., & Khun, T. C. (2013). Calcite-Forming Bacteria Located in Limestone Area of Malaysia. *Journal of Asian and Scientific Research*, 3(5), 471–484.
- Liang, A., Zhu, Y., & Ditttrich, M. (2013). CaCO₃ biomineralization on cyanobacterial surfaces: Insights from experiments with three *Synechococcus* strains. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 600–608.
- Liu, J., Liu, Y., Kong, Y., Yao, J., & Cai, Y. (2013). Formation of vaterite regulated by silk sericin and its transformation towards hydroxyapatite microsphere. *Materials Letters*, 110, 221–224.
- Matahwa, H., Ramiah, V., & Sanderson, R. D. (2008). Calcium carbonate crystallization in the presence of modified polysaccharides and linear polymeric additives. *Journal of Crystal Growth*, 310(21), 4561–4569.
- McCusker, L. B., Von Dreele, R. B., Cox, D. E., Loue, D., & Scardi, P. (1999). Rietveld refinement guidelines. *Journal of Applied Crystallography*, 32, 36–50.
- Mitchell, A. C., Phillips, A., Schultz, L., Parks, S., Spangler, L., Cunningham, A. B., & Gerlach, R. (2013). Microbial CaCO₃ mineral formation and stability in an experimentally simulated high pressure saline aquifer with supercritical CO₂. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 15, 86–96.
- Montoya, C., Márquez, M. A., López, J., & Cuervo, C. (2005). Caracterización de cristales de calcita bioprecipitada por un aislamiento nativo de *Bacillus subtilis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 19–25.
- Nakahara, Y., Mizuguchi, M., & Miyata, K. I. (1979). Effects of surfactants on CaCO₃ spheres prepared by interfacial reaction method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 68(3), 401–407.
- Parks, S. (2009). Kinetics of Calcite Precipitation By Ureolytic Bacteria Under Aerobic and Anaerobic Conditions. E.E.U.U.: Montana State University, p 93.
- Patil, V. J., Patil, U. D., Bhoge, Y. E., & Kulkarni, R. D. (2014). Facile Synthesis of Calcium Carbonate Nanoparticles using Solution Spray Reactor System. *International Journal of Applied Engineering Research*, 9(10), 1261–1270.
- Saikia, J., & Das, G. (2014). Framboidal vaterite for selective adsorption of anionic dyes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(2), 1165–1173.
- Sevcík, R., Pérez-Estébanez, M., Viani, A., Sasek, P., & Mácová, P. (2015). Characterization of vaterite synthesized at various temperatures and stirring velocities without use of additives. *Powder Technology*, 284, 265–271.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Bryce, D. L. (2014). Spectrometric Identification of Organic Compounds, 8th Edition. Wiley Online Library, p 474.
- Simanjuntak, W., & Sembiring, S. (2011). The use of the Rietveld method to study the phase composition of cordierite (Mg₂Al₄Si₅O₁₈) ceramics prepared from rice husk silica. *Makara, Sains*, 15, 97–100.
- Singh, M., Kumar, V. S., Waghmare, S. A., & Sabale, P. D. (2016). Aragonite-vaterite-calcite: Polymorphs of CaCO₃ in 7th century CE lime plasters of Alampur group of temples, India. *Construction and Building Materials*, 112, 386–397.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K., & Bang, S. S. (1999). Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1563–1571.
- Sung, H. K., Hirasawa, I., Kim, W. S., & Chang, K. C. (2005). Morphological control of calcium carbonate crystallized in reverse micelle system with anionic surfactants SDS and AOT. *Journal of Colloid and Interface Science*, 288(2), 496–502.
- Trushina, D. B., Bukreeva, T. V., Kovalchuk, M. V., & Antipina, M. N. (2015). CaCO₃ vaterite microparticles for biomedical and personal care applications. *Materials Science and Engineering C*, 45, 644–658.
- Wada, N., Kanamura, K., & Umegaki, T. (2001). Effects of Carboxylic Acids on the Crystallization of Calcium Carbonate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 233(1), 65–72.
- Wang, F., Xu, Z., Zhang, Y., Li, J., Nian, S., & Zhou, N. (2016). Green synthesis and bioactivity of vaterite-doped beta-dicalcium silicate bone cement. *Ceramics International*, 42(1), 1856–1861.
- Wang, Y.-Y., Yao, Q.-Z., Zhou, G.-T., & Fu, S.-Q. (2013). Formation of elongated calcite mesocrystals and implication for biomineralization. *Chemical Geology*, 360–361, 126–133.
- Weiner, S., & Dove, P. (2003). An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in Mineralogy*, 54, 1–29.
- 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, 5–17.
- Zhang, C., Zhang, J., Feng, X., Li, W., Zhao, Y., & Han, B. (2008). Influence of surfactants on the morphologies of CaCO₃ by carbonation route with compressed CO₂. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 324, 167–170.
- Zhou, G.-T., Guan, Y.-B., Yao, Q.-Z., & Fu, S.-Q. (2010). Biomimetic mineralization of prismatic calcite mesocrystals: Relevance to biomineralization. *Chemical Geology*, 279, 63–72.