



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOMINERALIZANTE Y CONSOLIDANTE
DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS AISLADAS DE ROCAS
CALCÁREAS.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO EN:
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA:

BIOL. VIVIANA MARCELA GUTIÉRREZ FORONDA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. SUSANA DEL CARMEN DE LA ROSA GARCÍA

EN CODIRECCIÓN:

DR. SERGIO ALBERTO GÓMEZ CORNELIO

VILLAHERMOSA, TABASCO, NOVIEMBRE 2025

Declaración de Autoría y Originalidad

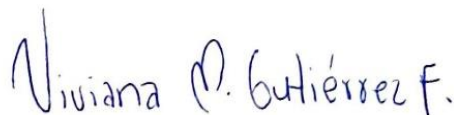
En la Ciudad de Villahermosa, el día 31 del mes de octubre del año 2025, el que suscribe, Viviana Marcela Gutiérrez Foronda, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales con número de matrícula 222G25002, adscrito a la División Académica de Ciencias Biológicas, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autora de la Tesis presentada para la obtención del grado y titulada **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOMINERALIZANTE Y CONSOLIDANTE DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS AISLADAS DE ROCAS CALCÁREAS”** dirigida por la Dra. Susana Del Carmen De la Rosa García y el Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio.

DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Villahermosa, Tabasco a 31 de octubre 2025



Viviana Marcela Gutiérrez Foronda



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**



Villahermosa, Tab., a 20 de Octubre de 2025

ASUNTO: Autorización de Modalidad de Titulación

**C. LIC. MARIBEL VALENZIA THOMPSON
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E**

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, **autoriza a la C. VIVIANA MARCELA GUTIÉRREZ FORONDA** egresada de la Maestría en **CIENCIAS AMBIENTALES** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS**, la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis de Maestría denominado **"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOMINERALIZANTE Y CONSOLIDANTE DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS AISLADAS DE ROCAS CALCÁREAS"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

C.c.p. - Expediente Alumno de la División Académica
C.c.p.- Interesado





**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**

OCTUBRE 20 DE 2025

**C. VIVIANA MARCELA GUTIÉRREZ FORONDA
PAS. DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 74 al 77 del Cap. IV del Reglamento General de Estudios de Posgrado de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOMINERALIZANTE Y CONSOLIDANTE DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS AISLADAS DE ROCAS CALCÁREAS"**, asesorado por la Dra. Susana del Carmen de la Rosa García y Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado integrado por la Dra. Erika Escalante Espinosa, Dra. Ana Rosa Rodríguez Luna, Dra. Susana del Carmen de la Rosa García, Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio y Dra. Claudia Araceli García Solís.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR**

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

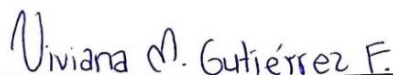
Carta de Cesión de Derechos

Villahermosa, Tabasco a 31 de octubre de 2025

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTORA y/o AUTORES en la producción, creación y/o realización de la obra denominada "**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOMINERALIZANTE Y CONSOLIDANTE DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS AISLADAS DE ROCAS CALCÁREAS**"

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un período de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

COLABORADORES



Biol. Viviana Marcela Gutiérrez Foronda

EGRESADA



Dra. Susana Del Carmen De la Rosa Garcia

DIRECTORA



Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio

CODIRECTOR

TESTIGOS



Dra. Erika Escalante Espinosa



Dra. Ana Rosa Rodríguez Luna



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

Villahermosa, Tabasco a 16 de octubre de 2025

C. VIVIANA MARCELA GUTIÉRREZ FORONDA
EGRESADA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
PRESENTE

En cumplimiento de los lineamientos de la Universidad, y por instrucciones de la Dirección de Posgrado, se implementó la revisión de los trabajos recepcionales (tesis), a través de la plataforma Turnitin iThenticate para evitar el plagio e incrementar la calidad en los procesos académicos y de investigación que se desarrollan en esta División Académica. Esta revisión se realizó en correspondencia con el Código de Ética de la Universidad, el Reglamento General de Estudios de Posgrado, el Código Institucional de Ética para la Investigación y con los requerimientos para los posgrados registrados en el SNP de la SECIHTL.

Por este conducto, hago de su conocimiento que, con el objetivo de fortalecer y enriquecer el programa de posgrado, se realizó la revisión del documento en la plataforma iThenticate, obteniendo el reporte de originalidad, el índice de similitud y se emitieron las siguientes sugerencias y recomendaciones para dar seguimiento en el documento de tesis del proyecto de investigación: ***Evaluación de la actividad biomíneralizante y consolidante de bacterias carbonatogénicas aisladas de rocas calcáreas.***

OBSERVACIONES:

1. **El índice de similitud general obtenido fue de 06%**, el cual se ubica dentro del estándar de tolerancia de acuerdo a las Políticas y Lineamientos para el uso y manejo del Software Antiplagio de la UJAT. Se demuestra el nivel de originalidad del documento y de la investigación.
2. Aun que el índice de similitud obtenido indica coincidencias con 31 fuentes de consulta (5% de fuentes de internet y 1% de publicaciones), éstas se refieren a frases en las secciones de Marco conceptual, Antecedentes, y Métodos principalmente. Lo anterior no demerita el documento de tesis, pero se recomienda a la sustentada y su directora de tesis revisar las oraciones identificadas con similitud y ajustarlas a una redacción propia en la medida de lo posible, e incluir las citas y referencias pertinentes conforme al formato APA vigente.



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

3. Se solicita a la sustentante ajustar la portada del documento, atendiendo las indicaciones del numeral I, artículo 13 de los Lineamientos Institucionales para la elaboración de la tesis (ver anexo 1 de dicho documento).
4. **Se adjunta el informe de originalidad de la tesis** obtenido a través de la herramienta Turnitin iThenticate.
5. Finalmente, se le solicita a la C. VIVIANA MARCELA GUTIÉRREZ FORONDA, integrar en la versión final de su tesis, este oficio y el informe de originalidad con el porcentaje de similitud de Turnitin iThenticate de acuerdo con lo señalado en los Lineamientos Institucionales para la elaboración de tesis de posgrado.

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"
DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR
UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

C.C.P. Dra. Susana del Carmen De la Rosa García. Directora de tesis.
Archivo




KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400 y 6401, e-mail: direccion.dacbiol@ujat.mx

Usar papel reciclado economiza energía, evita contaminación y despilfarro de agua y ayuda a conservar los bosques

www.ujat.mx

Viviana Marcela Gutierrez Foronda

Evaluación de la actividad biomineralizante y consolidante de bacterias carbonatogénicas aisladas de rocas calcáreas

 Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117512859807

Fecha de entrega

14 oct 2025, 2:03 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

16 oct 2025, 11:32 a.m. GMT-6

Nombre del archivo

TESIS MCA DE VIVIANA GUTIERREZ-14-10-25-1.pdf

Tamaño del archivo

7.5 MB

130 páginas

35,446 palabras

206,845 caracteres

6% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...




Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Coincidencias menores (menos de 16 palabras)

Exclusiones



- ▶ N.º de fuentes excluidas
- ▶ N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 6%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
77 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares dentro del alfabeto.
-  **Texto oculto**
613 caracteres sospechosos en N.º de páginas
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

DEDICATORIA

“Muchas cosas se encontrarán no al alcance de cualquiera, sino, exclusivamente, para el que de verdad esté familiarizado con la naturaleza y sus obras... armoniza conmigo todo lo que para ti es armonioso, ¡oh, mundo! ningún tiempo oportuno para ti es prematuro ni tardío para mí. Es fruto para mí todo lo que producen tus estaciones, ¡oh naturaleza! de ti procede todo, en ti reside todo, todo vuelve a ti”.

Marco Aurelio.

Este trabajo de investigación está dedicado a la curiosidad de mis padres, al apoyo de mis hermanos y sobrina, al conocimiento, empatía y comprensión de mis asesores en tiempos difíciles y, a la compañía emocional de mi esposo, mis suegros y mis gatos. También me gustaría incluir especialmente a la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL) y a la secretaría de ciencia, humanidades, tecnología e innovación (SECIHTI) por brindarme el espacio y el apoyo económico para poder desarrollar conocimiento; a mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Aplicada (LABMIA) por las risas, el intercambio intelectual y la amistad y, por último, a la memoria de mi papá y de mis gatos trascendidos a otro estado de la materia durante este proceso.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada durante los estudios de maestría.

Al proyecto “Dilucidando la función de los microorganismos sobre el patrimonio cultural edificado: protección o deterioro”. Fuente de financiamiento: CONAHCYT Ciencias de frontera 2023 CF-2023-I-556.

Al proyecto “Sustainable COnservation and REstoration of built cultural heritage (score) 101007531. Fuente de financiamiento: H2020-MSCA-RISE-2020”

Al Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH) por los permisos y facilidades de acceso a los sitios arqueológicos de Chichén Itzá y Calakmul para la exposición de los experimentos realizados, así como a la Dra. Claudia Araceli García Solís por las gestiones realizadas para ello.

A la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBio) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) por el apoyo institucional y el uso de sus instalaciones.

Al Laboratorio Nacional de Ciencias para la investigación y conservación del patrimonio cultural / Centro de Investigación en Corrosión (LANCIC - CICORR) de la Universidad Autónoma de Campeche (UACAM) por el apoyo en la realización de las pruebas químico y físico-mecánicas.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Mérida, por el apoyo en la realización de las pruebas de Difracción de rayos x (DRX) y el microscopio electrónico de barrido (SEM).

A mi directora de tesis, la Dra. Susana Del Carmen De la Rosa García, y a mi co-director de tesis, el Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio, por su sabiduría, asesoría, tiempo de revisión, y por ser ambos una gran inspiración para mí.

Al comité revisor, la Dra. Claudia Araceli García Solís, la Dra. Erika Escalante Espinosa, y la Dra. Ana Rosa Rodríguez Luna por sus valiosas sugerencias y comentarios para llevar a cabo esta investigación, y por el tiempo invertido.

A la Dra. Cinthia García Mendoza de la División Académica de Ingeniería y Arquitectura (UJAT), y al M. en C. Andrés Medel Sánchez Lara por el apoyo en el análisis de los resultados de FTIR y el ensamblaje del genoma bacteriano, respectivamente. Y a la M. en C. Stephania Lázaro Mass por su aportación en el análisis de la síntesis de biominerales bacterianos (DRX y SEM).

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	3
2.1.	MARCO CONCEPTUAL.....	3
2.1.1.	DETERIORO	3
2.1.2.	BIODETERIORO Y BIOPROTECCIÓN.....	4
2.1.3.	BIOMINERALIZACIÓN Y CARBONATOGÉNESIS.....	6
2.1.4.	BIOCEMENTACIÓN	11
2.1.5.	HIDRÓLISIS DE UREA	13
2.1.6.	DESAMINACIÓN OXIDATIVA	15
2.1.7.	BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS	15
2.1.8.	CONSERVACIÓN DE MONUMENTOS HISTÓRICOS.....	17
2.1.9.	MÉTODOS CONVENCIONALES DE CONSOLIDACIÓN	19
2.1.10.	ROCA CALIZA	22
2.2.	ANTECEDENTES.....	24
3.	JUSTIFICACIÓN.....	27
4.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	28
5.	HIPÓTESIS	28
6.	OBJETIVO GENERAL	29
6.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
7.	METODOLOGÍA	30
7.1.	UBICACIÓN DEL ESTUDIO, SITIOS DE MUESTREO	30
7.2.	PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE PROBETAS PÉTREAS EN OXPÉMUL.....	31
7.3.	AISLAMIENTO DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS	32
7.3.1.	OXPEMUL.....	32
7.3.2.	CHICHÉN ITZÁ.....	33
7.4.	SELECCIÓN DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS	33
7.4.1.	ENSAYO DE ACTIVIDAD UREOLÍTICA	33
7.4.2.	ENSAYO DE PRECIPITACIÓN DE CARBONATO DE CALCIO	34
7.5.	ENSAYO DE BIOCONSOLIDACIÓN EN ARENA Y SASCAB	34
7.6.	CARACTERIZACIÓN DE LOS CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO.....	35
7.7.	IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS.....	35
7.7.1.	SECUENCIACIÓN DEL GENOMA.....	36
7.7.2.	EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS SECUENCIAS.	36
7.7.3.	ENSAMBLAJE DE GENOMAS Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD.	36

7.7.4.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO	37
7.8.	BIOENSAYO EN LITOTIPO CONCHUELA	37
7.9.	APLICACIÓN DEL BIOTRATAMIENTO <i>IN SITU</i> , LITOTIPO CHICHÉN ITZÁ.....	38
7.9.1.	PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE PROBETAS CHICHÉN ITZÁ.....	39
7.10.	ANÁLISIS QUÍMICOS Y FÍSICO-MECÁNICOS	41
7.10.1.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	41
7.10.2.	DUREZA SUPERFICIAL	41
7.10.3.	PARÁMETROS CROMÁTICOS (COLOR)	42
7.10.4.	RUGOSIDAD	42
7.10.5.	ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR). .	43
7.10.6.	VELOCIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA	43
8.	RESULTADOS.....	44
8.1.	AISLAMIENTO DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS	44
8.2.	ENSAYO DE ACTIVIDAD UREOLÍTICA:	47
8.3.	ENSAYO DE PRECIPITACIÓN BIOGÉNICA DE CARBONATO DE CALCIO	48
8.3.1	PRECIPITACIÓN EN AEMC	48
8.3.2.	PRODUCCIÓN DE CRISTALES EN MEDIO B4.....	51
8.3.3.	PRODUCCIÓN DE CRISTALES EN CCP	55
8.3.4.	ELECCIÓN DE LAS MEJORES CEPAS:.....	55
8.4.	ENSAYO DE BIOCONSOLIDACIÓN.....	57
8.5.	SELECCIÓN DE MEJORES CEPAS PARA BIOENSAYO	64
8.5.1.	ANÁLISIS DE DUREZA SUPERFICIAL EN BIOCONSOLIDACIÓN	66
8.6.	CARACTERIZACIÓN DE LOS CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO	67
8.7.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	72
8.7.1.	EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS SECUENCIAS CRUDAS	72
8.7.2.	FILTRADO Y LIMPIEZA DE SECUENCIAS.....	72
8.7.3.	ENSAMBLAJE DE GENOMAS Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD.	72
8.7.4.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO	73
8.8.	ENSAYO PRELIMINAR EN PROBETAS LITOTIPO CONCHUELA	79
8.9.	ENSAYOS DE BIOCONSOLIDACIÓN <i>IN SITU</i>	80
8.10.	OBSERVACIONES AL ESTEREOSCOPIO Y EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.....	82
8.11.	PRUEBAS FÍSICO MECÁNICAS.....	87
8.11.1.	RUGOSIDAD	87
8.11.2.	DUREZA SUPERFICIAL	88
8.11.3.	VELOCIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA	89
8.11.4.	COLORIMETRÍA.....	90

8.11.5. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	92
9. DISCUSIÓN	95
10. CONCLUSIONES	102
11. REFERENCIAS CITADAS	104

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas con la mejor producción de cristales en el medio AEMC.....	50
Tabla 2. Cepas con mejor desempeño en la precipitación de cristales en el medio B4	54
Tabla 3. Caracterización de las cepas con mayor capacidad biomineralizante.....	56
Tabla 4. Resultados del ensayo de bioconsolidación en sascab y arena en medios CCP y M-3P.	58
Tabla 5. Observaciones de bioconsolidación de la cepas seleccionadas.....	60
Tabla 6. Minerales Identificados por cepa en diferentes medios de cultivo.....	67
Tabla 7. Resumen de la calidad de las secuencias después de la limpieza y filtrado con Trimmomatic.	72
Tabla 8. Resumen de métricas de QUAST en base al ensamblado genómico basado en Minia	73
Tabla 9. Resumen de la evaluación de la calidad del ensamblado genómico según CheckM...	73
Tabla 10. Resumen de los estadísticos dDDH obtenidos con TYGS	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mineralización Controlada Biológicamente (MCB).....	8
Figura 2. Mineralización Inducida Biológicamente (MIB).....	10
Figura 3. Precipitación de carbonatos inducida por microorganismos (MICP).	14
Figura 4. Bacterias usadas para concreto autoreparable	17
Figura 5. Sitio Arqueológico de Oxpemul	30
Figura 6. Sitio Arqueológico de Chichén Itzá.....	31
Figura 7. Probetas expuestas en el sitio arqueológico de Oxpemul	32
Figura 8. Aislamiento bajo condiciones de esterilidad de bacterias carbonatogénicas.	32
Figura 9. Panorámica de los puntos de muestreo en el sitio arqueológico de Chichén Itzá.....	33
Figura 10. Ensayo de bioconsolidación en arena y sascab	35
Figura 11. Bioensayo en conchuela.....	38
Figura 12. Disposición de los tratamientos aplicados a las probetas.....	39
Figura 13. Fotografías al estereoscopio de las probetas litotipo Chichén Itzá.....	39
Figura 14. Preparación del bioensayo.....	40
Figura 15. Aplicación del tratamiento.....	40
Figura 16. Instalación de los bastidores.....	41
Figura 17. Equipos LANCIC- CICORR	42
Figura 18. Equipos LANCIC- CICORR	43
Figura 19. Proceso de aislamiento de bacterias a partir de las probetas expuestas	44
Figura 20. Detalle de morfologías coloniales bacterianas	45
Figura 21. Diversidad de la biomasa bacteriana aislada	46
Figura 22. Diferentes tonalidades de 114 colonias bacterianas	46
Figura 23. Disolución de carbonato de calcio en el medio AEMC.	46
Figura 24. Actividad Ureolítica de las cepas aisladas	47
Figura 25. Clasificación de la actividad ureasa según la intensidad observada.....	48
Figura 26. Morfologías cristalinas observadas en medio AEMC	49
Figura 27. Tipos de cristales en AEMC a los 15 días de crecimiento bacteriano.....	49
Figura 28. Formación de biolitos o productos biogénicos en AEMC a partir del día 30	50
Figura 29. Diversidad morfológica de cristales y biolitos observados en el medio B4.....	51

Figura 30. Tipos de cristales observado en medio B4 a los 15 días de crecimiento..	51
Figura 31. Particularidades morfológicas de los cristales observados en B4.	52
Figura 32. Diversidad de morfologías y estructuras cristalinas asociadas con cepas bacterianas biomineralizantes. Aglomeraciones o sitios de nucleación	53
Figura 33. Cristales observados a simple vista en medio B4.	53
Figura 34. Cristales en CCP	55
Figura 35. Tinción de Gram de las mejores cepas biomineralizantes	56
Figura 36. Algunos cristales producidos por las mejores cepas biomineralizantes en B4.	57
Figura 37. Evidencia del ensayo de bioconsolidación en sascab utilizando M-3P	59
Figura 38. Diferentes niveles de bioconsolidación en el ensayo con medio M-3P.	59
Figura 39. Observaciones de color y textura en ensayo de bioconsolidación en sascab con medio CCP	60
Figura 40. Evidencia fotográfica de bioconsolidación de cepas bacterianas en arena y sascab, utilizando medio M-3P y CCP	61
Figura 41. Mejores cepas precipitadoras de cristales, en agar y medio líquido (B4M y M-3P).	65
Figura 42. Comparación de dureza superficial en bioconsolidación de sascab.	66
Figura 43. Producción de diferentes polimorfos del carbonato de calcio en la cepa OX4-8C en diferentes medios de cultivo.	68
Figura 44. Micrografías SEM de cristales en M-3P	69
Figura 45. DRX del medio M3-P + sascab. Comparación entre dos bacterias y el control.	71
Figura 46. Árbol filogenético de la cepa CHJM-1	74
Figura 47. Árbol filogenético de las cepas OX8C y CK4-1.	75
Figura 48. Árbol filogenético de la cepa OX1-1.	76
Figura 49. Árbol filogenético de las cepas CHGM7-2 y CK1-3C	77
Figura 50. Cambios inducidos por <i>Arthrobacter</i> sp. (OX4-8C) en M-3P en probetas de litotipo conchuela tratadas (21 días)	79
Figura 51. Cambios inducidos por <i>Sphingomonas</i> sp. (CHJM-1) sobre litotipo conchuela en medio M-3P (21 días).	80
Figura 52. Cambio inducido por (CHL4-1), sobre la probeta litotipo conchuela en medio B4M (21 días)	80
Figura 53. Pérdida de masa por tratamiento y sitio de exposición.	82
Figura 54. Observaciones en litotipos Chichén Itzá expuesto por seis meses	83

Figura 55. Observaciones al estereoscopio de las probetas con <i>Arthrobacter</i> sp. (OX4-8C)	84
Figura 56. Observaciones al estereoscopio de las probetas con <i>Sphingomonas</i> sp. (CHJM-1)	85
Figura 57. Observaciones en SEM.....	86
Figura 58. Comparación de rugosidad entre tratamientos y sitios de exposición.....	87
Figura 59. Comparación de rugosidad entre tratamientos por sitio de exposición con respecto al control litotipo (reverso de la roca sin tratamiento).....	88
Figura 60. Comparación de dureza superficial entre tratamientos y sitios de exposición.....	88
Figura 61. Comparación de dureza superficial entre tratamientos por sitio de exposición con respecto al control litotipo (reverso de la roca sin tratamiento)	89
Figura 62. Comparación de la velocidad de absorción de agua (expresada en segundos) entre tratamientos y sitios de exposición.....	90
Figura 63. Comparación de velocidad de absorción de agua (en segundos) entre tratamientos por sitio de exposición con respecto al control litotipo (reverso de la roca sin tratamiento).	90
Figura 64. Colorimetría en probetas tratadas y expuestas en Oxpemul y Chichén Itzá.....	92
Figura 65. Espectros FTIR de las probetas expuestas en los sitios arqueológicos	94

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOMINERALIZANTE Y CONSOLIDANTE DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS AISLADAS DE ROCAS CALCÁREAS

RESUMEN

El patrimonio histórico edificado enfrenta un deterioro continuo debido a factores bióticos y abióticos, lo que resalta la necesidad de desarrollar estrategias de conservación sustentables y efectivas. La precipitación de carbonatos inducida por microorganismos (MICP) es una tecnología innovadora con potencial en la bio restauración. En esta investigación, se evaluó la capacidad biomineralizante de 114 bacterias carbonatogénicas autóctonas aisladas de dos sitios arqueológicos mayas (Oxpemul y Chichén Itzá) mediante su crecimiento en diferentes medios de cultivo. Se determinó su actividad ureolítica y el potencial de 22 cepas para la consolidación de arena y sascab, empleando medios líquidos (CCP, B4 y M-3P). Posteriormente, se analizó la capacidad de restauración de estas bacterias en roca caliza (litotipo Chichén Itzá) bajo condiciones *in situ*, evaluando cinco tratamientos a través de ensayos fisicoquímicos y mecánicos. Nueve cepas destacaron en todo el proceso, precipitando minerales como calcita, aragonita, vaterita, hidroxiapatita y wedelita. De estas, las cepas *Arthrobacter sp.* (OX4-8C) y *Sphingomonas sp.* (CHJM-1) fueron las seleccionadas para los ensayos de exposición *in situ* durante seis meses en los sitios arqueológicos, demostrando una mayor efectividad cuando se encontraban en el medio nutritivo M-3P. La cepa *Arthrobacter sp.* (OX4-8C) mostró la mejor actividad en todas las etapas experimentales, especialmente en el sitio de Oxpemul, de donde fue originalmente aislada, posicionándola como una candidata prometedora para la bioconservación de estructuras calcáreas en ambientes tropicales.

Palabras claves: Biomineralización, Bioconsolidación, Roca caliza, Monumentos históricos, Deterioro.

ABSTRACT

The built cultural heritage faces continuous deterioration due to biotic and abiotic factors, highlighting the need to develop sustainable and effective conservation strategies. Microbially induced carbonate precipitation (MICP) is an innovative technology with potential in bioremediation, which is why in this research, the biomineralizing capacity of 114 autochthonous carbonatogenic bacteria isolated from two Mayan archaeological sites (Oxpemul and Chichén Itzá) was evaluated by growing them in different culture media. We determined the ureolytic activity and the potential of 22 strains for sand and sascab consolidation using liquid media (CCP, B4 and M-3P). Subsequently, the restoration capacity of these bacteria in limestone rock (Chichén Itzá lithotype) was analyzed under *in situ* conditions, evaluating five treatments through physicochemical and mechanical tests. Nine strains stood out during the entire process, precipitating minerals such as calcite, aragonite, vaterite, hydroxyapatite and weddellite. Of these, the strains *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) and *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) were selected for *in situ* exposure for six months at the archaeological sites, showing higher activity when they were in the M-3P nutrient medium. The *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) strain showed the greatest activity across all experimental stages, especially at the Oxpemul site, where it was originally isolated, positioning it as a promising candidate for the bioconservation of calcareous structures in tropical environments.

Keywords: Biomineralization, Bioconsolidation, Limestone, Historical monuments, Deterioration.

1. INTRODUCCIÓN

Los monumentos históricos representan un componente fundamental del patrimonio cultural de una nación. México cuenta con una gran variedad de estructuras arquitectónicas que persisten hasta nuestros días, constituyendo un testimonio tangible de su riqueza ancestral. Estas edificaciones además de su valor histórico, desempeñan un papel crucial en el desarrollo económico, social y turístico del país, por lo que su conservación resulta prioritaria. Entre los vestigios más emblemáticos se encuentran las construcciones prehispánicas, que sufren un constante deterioro a consecuencia de diversos factores que causan la meteorización de la roca (Elert et al., 2021). Entre los factores deteriorantes se encuentran los físicos como humedad, temperatura y viento; los químicos como la contaminación atmosférica, y los agentes biológicos como hongos, algas, cianobacterias, líquenes y bacterias, sin embargo, estas últimas pueden jugar un papel ambivalente y contrastante en la roca, ya sea deteriorándola o protegiéndola (Lee y Little, 2022).

Una gran diversidad de grupos microbianos, principalmente bacterias, hongos, y microalgas, habitan los diferentes microambientes de las rocas, formando comunidades que colonizan las superficies (epilíticas), grietas, poros y fisuras (endolíticas), y utilizan los depósitos minerales como fuente de nutrimento; jugando así un papel relevante en los ciclos biogeoquímicos (Tatis-Castro y Barbosa-López, 2012; Garces-Manosalva, 2023). Tienen la capacidad de interactuar y modificar el sustrato mineral donde habitan, generando transformaciones, y en ocasiones la meteorización o desintegración del material pétreo (Soffritti et al., 2019). Las rocas de importancia histórica como los monumentos no están exentos a estos procesos (Jroundi et al., 2017; Elert et al., 2021), en algunos casos pasa desapercibido, pero cuando el daño es excesivo, se compromete la integridad de la roca, y en consecuencia la estructura pierde su valor cultural, monetario y turístico (Pyzik et al., 2021).

De los diversos grupos microbianos que integran las biopelículas adheridas a las superficies rocosas, las bacterias son de gran relevancia y su impacto es innegable, ya que alteran las propiedades fisicoquímicas, y tienen comportamiento contrastante, pues algunas causan o participan en el biodeterioro o meteorización de la roca, proceso clave en la formación de los suelos (Samuels et al., 2020), mientras que otras participan en la formación de nuevos minerales que pueden contribuir en la reparación del material pétreo. En este último caso, destacan las bacterias involucradas en el ciclo del nitrógeno, las más conocidas son aquellas con actividad ureolítica. Estas bacterias son capaces de hidrolizar enzimáticamente la urea, lo que resulta en

la producción de amonio y carbono inorgánico disuelto (CO_2), lo que incrementa el pH y favorece la precipitación del carbonato de calcio (CaCO_3) en presencia de iones de calcio solubles (Cameotra y Dakal, 2012; Zhao et al., 2019; García-Avelino, 2021). Este proceso conocido como biomineralización (González-Muñoz et al., 1996; Wu et al., 2021), da lugar a la formación de un biocemento que contribuye a la consolidación natural de la roca.

Se ha demostrado que las intervenciones con microorganismos son útiles en la restauración, cuando los métodos químicos y mecánicos tradicionales fallan o presentan baja efectividad a corto plazo (Pyzik et al., 2021). Actualmente, se emplean resinas sintéticas como tratamiento, que se polimerizan dentro de los poros del sustrato pétreo, sin embargo, estas producen una capa superficial rígida que se deteriora con el tiempo y se desprende junto con la pérdida de elementos decorativos superficiales como grabados, relieves o inscripciones, requiriendo mantenimientos periódicos. Además, algunas de estas técnicas usan disolventes orgánicos que contribuyen a la contaminación (Castanier et al., 2000; Benabidi-Parra, 2023). En consecuencia, esta baja efectividad de los métodos convencionales ha llevado a la búsqueda de nuevos tratamientos de conservación que sean duraderos y compatibles con el medio ambiente.

Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó y determinó la actividad biomineralizante de bacterias carbonatogénicas (productoras de CaCO_3) aisladas en su mayoría de probetas de roca expuestas a condiciones naturales en los sitios arqueológicos de Oxpeumul (Campeche) y Chichén Itzá (Yucatán). Se analizó el tipo y la cantidad de cristales de CaCO_3 producidos en diferentes medios de cultivo. Además, se evaluó la capacidad consolidante de las cepas más prometedoras utilizando dos sustratos diferentes (arena y sascab). Paralelamente, se realizó una evaluación *in situ* para analizar los efectos de la inoculación y la estimulación del crecimiento bacteriano en probetas de roca caliza (Conchuela y Chichén Itzá), midiendo (en el litotipo Chichén Itzá) el nivel de protección y consolidación mediante pruebas químicas y físico-mecánicas. Este estudio propone una técnica sustentable para la bioconservación y consolidación de materiales rocosos con valor histórico, basada en el aislamiento de comunidades bacterianas autóctonas y la selección de cepas con actividad ureolítica o con capacidad para formar carbonato de calcio biogénico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. MARCO CONCEPTUAL

2.1.1. DETERIORO

El deterioro se define como el cambio indeseable en las propiedades físicas y químicas de un material determinado, es una pérdida de la capacidad estructural como resultado de la acción de agentes externos y depende del tipo de estructura, el material constitutivo, y las condiciones ambientales (Sánchez-Silva y Rosowsky, 2008; Patil et al., 2021). En el caso de las rocas, la meteorización es el principal causante de este problema. Se refiere a la descomposición o disolución de los minerales y rocas, a través de una variedad de factores físicos, químicos y biológicos (Nichols, 2009; Krklec et al., 2020). Debe diferenciarse de la erosión, ya que la meteorización descompone y debilita la roca, haciéndola susceptible al transporte de material fraccionado por agentes como el agua y el viento, lo que da lugar a la erosión (Samuels et al., 2020).

Los principales factores físicos que afectan a las rocas son: la humedad que favorece la corrosión, las altas temperaturas que favorece la proliferación de hongos, las altas precipitaciones, la luz (que afecta los pigmentos) y el viento; así como los agentes químicos, que son los contaminantes atmosféricos como los gases de azufre (SO_x), gases de nitrógeno (NO_x), dióxido de carbono (CO₂), partículas atmosféricas, lluvia ácida y el deterioro por acción de sales, que causan una pérdida importante en las propiedades físico-mecánicas y estéticas de la roca (Tatis-Castro y Barbosa-López, 2012; Camacho y Yovera, 2022). Esto es particularmente drástico en ambientes cálidos y húmedos como la zona maya en Mesoamérica, donde sitios arqueológicos, estructuras excavadas, y monumentos de roca están expuestos a fuertes condiciones climáticas y antropogénicas que exacerbaban la meteorización (Elert et al., 2021). Con el aumento de la población y la expansión de las ciudades, estos lugares sufren de un desarrollo acelerado que transforma el entorno, favoreciendo el deterioro del paisaje urbano histórico (PUH) (UNESCO, 2011). Otros factores antrópicos invasivos son el mal uso de los monumentos por vandalismo o manipulación inapropiada, intervenciones de restauración deficientes, y la falta de mantenimiento (De Lerma-Perdomo, 2020) y con ello las sustancias contaminantes que aceleran los procesos de deterioro. Todo lo anterior condiciona y favorece al mismo tiempo la proliferación de microorganismos, que a su vez causan biodeterioro (Gu y Katayama, 2021), y la composición de esta comunidad va a depender de la biorreceptividad, es decir, de la capacidad que tiene un material para ser colonizado por un microorganismo.

2.1.2. BIODETERIORO Y BIOPROTECCIÓN

De los grupos microbianos que conforman las comunidades establecidas en las superficies rocosas, son de importancia relevante las bacterias, algas y hongos (Liu et al., 2022). Estos forman biopelículas, que son comunidades multiespecies estructuradas con diversas funciones metabólicas; que incluyen microorganismos fotótrofos, quimiolitótrofos, y quimioorganotrofos (Soffritti et al., 2019). Las biopelículas epilíticas han sido implicadas en daños a monumentos de roca, incluida la decoloración, cambios físicos, químicos y mecánicos provocados por incrustaciones, corrosión por ácidos biogénicos, complejación y liberación de cationes, mineralización secundaria y (re)cristalización; llamado categóricamente “biodeterioro” (Liu et al., 2020). Además, los monumentos también se ven afectados por la presencia y actividad sobre el material de pequeños animales, plantas y aves.

Las cianobacterias y clorofitas como *Gloeocapsa*, *Phormidium*, *Chorococcus*, *Chlorella*, *Stichococcus* y *Chlorococcus* son géneros pioneros que contribuyen al biodeterioro principalmente estético. La mayoría de las biopelículas contienen tantas cianobacterias y algas, que son la principal biomasa fototrófica de los monumentos que, al morir, proporcionan la materia orgánica esencial para que crezcan los heterótrofos, contribuyendo a que los hongos y otros heterotróficos comiencen a colonizar la piedra y acelerar la descomposición de la misma (Negi y Sarethy, 2019), pues se ha demostrado que el biodeterioro biofísico en la roca se debe principalmente a la penetración de las hifas fúngicas entre los granos cristalinos en rocas calizas y dolomíticas (Gadd, 2007; Chen et al., 2021); también se ha reportado el daño por Actinobacterias, especialmente del género *Streptomyces*, su papel biodeteriorante se debe principalmente a precipitaciones indeseables que forman capas superficiales que ocultan las pinturas y dañan el relieve y, además, algunas cepas excretan compuestos cromóforos como la melanina, actinorrodinas y de tipo carotenoides, que cambian el tono natural de las superficies colonizadas con manchas de varios colores (Akmal et al., 2020). Otro de los daños causados por el biodeterioro microbiano es la producción de ácidos orgánicos. Los aniones de estos ácidos reaccionan con los cationes presentes en los minerales de la piedra, generando sales solubles que migran hacia la superficie a través de los poros. Este proceso, bastante común, se conoce como eflorescencia. Al cristalizar, estas sales ejercen estrés físico sobre la matriz pétreo, lo que ocasiona fisuras, desprendimientos y debilitamiento estructural del material. (Negi y Sarethy, 2019).

Sin embargo, y pese a los daños reportados por los microorganismos, la “bioprotección” también es posible, pues pueden jugar roles ambivalentes. Las biopelículas, por ejemplo, pueden desempeñar un papel positivo en la regulación de cambios térmicos y de humedad para mitigar la expansión y contracción de la roca o protegiendo las superficies de los impactos directos de las gotas de lluvia y la abrasión del viento (Liu et al., 2022), además, algunos microorganismos pueden realizar procesos favorables de biomineralización y contribuir al fortalecimiento de las edificaciones, lo cual dependerá de los factores a los que este expuesto el monumento. Se ha reportado, por ejemplo, que microorganismos como las bacterias, especialmente del género *Bacillus*, pueden precipitar minerales como el CaCO_3 , sirviendo como bioconsolidante y/o bioprotector de la roca caliza (Chaparro-Acuña et al., 2018; Pyzik et al., 2021). La precipitación del carbonato de calcio por diversas especies bacterianas se atribuye en la mayoría de los casos reportados a un mecanismo impulsado con la ayuda de la enzima ureasa. En condiciones optimizadas (pH, temperatura, humedad, entre otras), la reacción que desencadena la hidrólisis de la urea se puede controlar para promover la precipitación de carbonato de calcio de unión dura llamado “biocemento” (Cameotra y Dakal, 2012; Anbu et al., 2016).

Se puede considerar entonces que la función que cumplen los agentes biológicos en la roca, como las rutas metabólicas, cristalización y cementación, dependerá del microorganismo que la colonice y su dominancia, y como se ha mencionado anteriormente, la colonización por microorganismos en los monumentos puede ser nociva o destructiva, sin embargo, su potencial bioprotector ha sido poco explorado. Así, mientras el biodeterioro denota cambios indeseables en las propiedades de un material por acción de organismos, la “biorremediación” o “bioprotección” utiliza organismos para mitigar el deterioro ocasionado por la exposición al medioambiente. Y en el caso de la roca, los microorganismos seleccionados y estimulados de manera correcta, se pueden utilizar como consolidantes naturales que ayudan a proteger o revertir el deterioro. No obstante, es importante aclarar que, para la biología el “biodeterioro” y “biodegradación” no son sinónimos. La biodegradación se refiere a los procesos deseables mediante los cuales los organismos degradan sustancias complejas en sustancias más simples y puede ser un proceso esencial para algunas estrategias de biorremediación (Lee y Little, 2022), mientras que el biodeterioro es el daño causado por microorganismos a las superficies en las cuales se depositan, sin aportar ningún producto que ayude a su conservación.

Recientemente, se ha reconocido y estudiado el papel de los microorganismos en la bioconservación, restauración de monumentos y obras construidas con roca caliza, probando su

efectividad y favoreciendo la “autocuración” del material sin causar efectos indeseables (Jroundi et al., 2017); por lo que la búsqueda de microorganismos capaces de realizar procesos de bioremediación debe seguir siendo explorada, pues es una herramienta sustentable, promovida por la naturaleza, que puede ser usada para la planificación eficaz de la conservación del patrimonio histórico. Sin embargo, se requiere entender los procesos de biomineralización para identificar entre los efectos del biodeterioro (agentes biológicos) y aquellos del deterioro físico o químico en los sustratos pétreos, permitiendo así revertir los daños causados por ambos tipos de deterioro y optimizar las estrategias de restauración y conservación.

2.1.3. BIOMINERALIZACIÓN Y CARBONATOGÉNESIS

La biomineralización es el proceso mediante el cual los seres vivos, tanto procariotas como eucariotas, intervienen en la formación de minerales (Camacho y Yovera, 2022). Es un mecanismo de creación de minerales biogénicos como carbonatos, silicatos, fosfatos, entre otros (Gadd, 2010; Coronado, 2022). Los animales son los principales organismos biomineralizantes, seguidos por las bacterias, las plantas vasculares, los hongos y los protozoos (González-Muñoz et al., 1996). Según Camacho y Yovera (2022), la biomineralización es una herramienta biotecnológica que depende de varios factores, pero principalmente de las características del organismo biomineralizante y de las condiciones físico-químicas del medio donde se va a desarrollar la interacción, factores como la textura del material, la presencia y densidad de materia orgánica, la humedad, la temperatura, el pH y la aireación, entre otros.

La biomineralización puede ser controlada biológicamente (MCB), es decir, un proceso en el que los organismos controlan la nucleación y el crecimiento del mineral, o inducida biológicamente (MIB), donde la deposición mineral depende del medio ambiente (Castro-Alonso et al., 2019; Lee y Little, 2022). En los procesos de biomineralización, el papel principal de las bacterias es su habilidad de crear ambientes alcalinos caracterizados por un pH alto y el aumento de carbono inorgánico disuelto; esto ocurre a través de sus actividades fisiológicas, debido a algunos atributos de las bacterias, por ejemplo, su carga natural negativa que atrae los iones de calcio, y que hacen de ellas sitios ideales para la nucleación y posterior formación de minerales (Camacho y Yovera, 2022); y esta capacidad de las bacterias para establecer sitios de nucleación se explica también por la presencia de exopolisacáridos (EPS), que son macromoléculas de carbohidratos y proteínas que se sintetizan por enzimas bacterianas. Así, diferentes especies de bacterias pueden producir diferentes tipos de cristales, en diferentes cantidades y usando diferentes sustratos.

Según Valencia-González et al. (2015) uno de los procesos de biomineralización es la “carbonatogénesis” que es la síntesis de minerales de carbonato, y puede darse por tres mecanismos diferentes: 1) fotosíntesis, 2) reducción del sulfato y 3) aquellos que involucran el ciclo del nitrógeno, más específicamente, la amonificación de aminoácidos, reducción del nitrato y degradación de la urea. La biomineralización por fotosíntesis se basa en la utilización metabólica del CO_2 disuelto, que se equilibra con el HCO_3^- y el CO_2 alrededor de la bacteria, tal reducción induce un cambio en el equilibrio del bicarbonato y consecuentemente un aumento en el pH del medio; mientras que, en la reducción del sulfato, la reacción comienza con la disolución del yeso y la materia orgánica puede ser consumida por la bacteria sulfato reductora y el azufre y el CO_2 metabólico son liberados. Y por último se tiene la forma de precipitación que involucra el ciclo del nitrógeno, aquí la producción de CO_2 metabólico y amoníaco (NH_3) en presencia de iones de calcio resulta en la liberación de amonio y en la precipitación de carbonato.

La carbonatogénesis es entonces un proceso que ocurre como resultado de reacciones bioquímicas entre iones y compuestos bajo condiciones óptimas, dicho proceso es inducido por microorganismos, que permiten la precipitación de carbonato de calcio, y puede ocurrir de forma autótrofa o heterótrofa (Heirman et al., 2003). En la precipitación autotrófica, la producción de carbonato es promovida por bacterias metanogénicas no metilotróficas, anoxigénicas y oxigénicas, que utilizan dióxido de carbono en forma gaseosa o disuelta que se origina en una variedad de fuentes, incluidas la respiración y la fermentación, así la utilización de CO_2 en un ambiente rico en calcio favorece la precipitación de carbonato; mientras que la producción por bacterias heterótrofas se logra mediante dos mecanismos diferentes, activo y pasivo (Frankel y Bazylinski, 2003; Cameotra y Dakal, 2012; Cosmidis y Benzerara, 2022). La precipitación activa del carbonato se produce por intercambios iónicos a través de la membrana, por un mecanismo aún poco conocido, mientras que en la carbonatogénesis pasiva, la actividad bacteriana induce cambios químicos en el microambiente, lo que conduce a la acumulación de carbonato y iones de bicarbonato y a la precipitación de partículas sólidas. La precipitación pasiva es inducida por varias vías metabólicas del ciclo del azufre y del nitrógeno (Soffritti et al., 2019). El proceso de carbonatogénesis se rige por cuatro factores, 1) concentración de calcio, 2) concentración de carbonato, 3) pH y 4) presencia de sitios de nucleación (Al-Thawadi, 2011; Cameotra y Dakal, 2012; Qin et al., 2020).

Existen casos conocidos de carbonatogénesis bacteriana para los dos tipos de biomineralización (MCB y MIB), dicho proceso de carbonatación ocurre durante la fase exponencial y termina

aproximadamente después del comienzo de la fase estacionaria, y las vías de biomineralización pueden ser activas o pasivas dependiendo del costo de energía (células metabólicamente viables). En la mayoría de los casos, la carbonatogénesis activa parece comenzar primero, y ser seguida después, por la pasiva que induce el crecimiento y las modificaciones de las partículas producidas inicialmente. Así mismo, los procesos de biomineralización se pueden distinguir en función de su localización en la célula intra o extracelular, aunque la carbonatogénesis bacteriana a menudo se ha considerado como extracelular (Görger et al., 2021).

Mineralización Controlada Biológicamente (MCB)

En la mineralización biológicamente controlada, los minerales se forman sobre y dentro de las matrices orgánicas y en las vesículas de la célula, permitiendo que el organismo ejerza un grado de control sobre la nucleación, la composición, la localización, el crecimiento y la morfología de los minerales (Achal y Mukherjee, 2015; Castro-Alonso et al., 2019), además, pueden sintetizar minerales en una forma específica dependiendo de la especie, independientemente de las condiciones ambientales (Fouladi et al., 2023). El mineral que se forma se aísla primero del ambiente exterior por una barrera a través de la cual los iones no pueden difundirse libremente (Camacho y Yovera, 2022). Este proceso puede ocurrir extra, inter o intracelularmente (Fig. 1), y el grado de control varía según la especie microbiana (Castro-Alonso et al., 2019; Cosmidis y Benzerara, 2022). Un ejemplo de esto es la formación de magnetita por bacterias magnetotácticas, que tienen control sobre la fase mineral y su biosíntesis en el magnetosoma, a nivel de genes (Arias et al., 2017; Cosmidis y Benzerara, 2022).

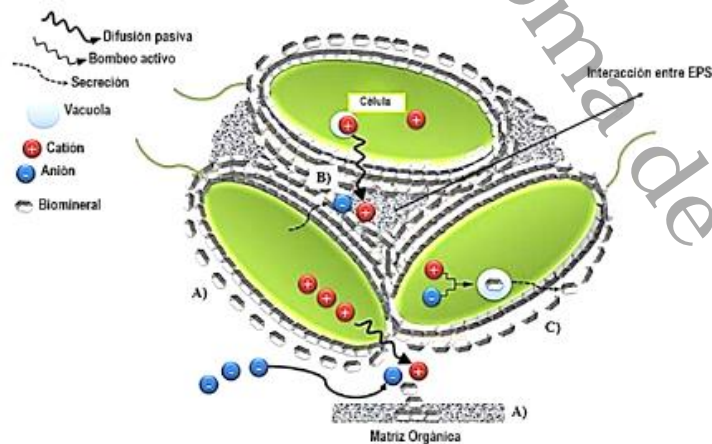


Figura 1. Mineralización Controlada Biológicamente (MCB). Tomado de Castro-Alonso et al. (2019).

En la mineralización extracelular, la célula produce una matriz que se convertirá en el lugar donde se producirán los minerales y podrá transferir constituyentes a la matriz por medio de dos mecanismos: 1) bombeando cationes a través de la membrana y a sus alrededores, los cuales se mueven por difusión pasiva a través de fluido extracelular al sitio de mineralización, 2) cuando los cationes se concentran dentro de la célula (como iones) en vesículas enviadas a través de la membrana y luego descompuestas por precursores en la matriz orgánica. Estos mecanismos se distinguen por la nucleación fuera de la célula (Qin et al., 2020; Ruiz-Oviedo, 2020; Weiner y Dove, 2003).

En la mineralización intercelular, en algunos organismos unicelulares, la pared celular actúa como una barrera que aísla el sitio de mineralización. Estas superficies orgánicas sirven como sustrato para la nucleación y el crecimiento de biominerales, proceso que puede conducir a la formación de estructuras mineralizadas o exoesqueletos. El control iónico y de los fluidos celulares regula el tipo de biomineral, su morfología y extensión (Ruíz-Oviedo, 2020; Weiner y Dove, 2003).

La mineralización intracelular ocurre dentro de vesículas o vacuolas especializadas que dirigen la nucleación de biominerales dentro de la célula, por lo que esta tiene un alto grado de control sobre las concentraciones de aniones y cationes que forman los componentes biominerales (Weiner y Dove, 2003; Ruíz-Oviedo, 2020; Cosmidis y Benzerara, 2022).

Mineralización Inducida Biológicamente (MIB)

La mineralización inducida biológicamente es un proceso en el cual la formación del mineral se da por cambios en la sobresaturación del sistema ocasionados por la captación o la excreción de diferentes metabolitos que reaccionan con compuestos en el ambiente (Fig. 2a), aquí la participación de los microorganismos en la composición, localización y nucleación de minerales es limitada (Achal y Mukherjee, 2015; Castro-Alonso et al., 2019). Frankel y Bazylinski, (2003) mencionan dos mecanismos: uno pasivo mediante la unión inespecífica de cationes y reclutamiento de aniones en solución, y otro activo relacionado con la actividad redox directa, o mediante la formación de subproductos catiónicos o aniónicos, donde los minerales formados suelen tener tamaños y morfologías diferentes, siendo comunes los óxidos como la magnetita, goethita, hematita, ferrihidrita y manganeso, así como los carbonatos, fosfatos, sulfatos y sulfuros.

Los biominerales MIB se forman debido a alteraciones químicas del entorno, inducidas por la actividad metabólica de los organismos (Wu et al., 2021). Este proceso de bioprecipitación, cuando es inducido por microbios se conoce como precipitación de carbonatos inducida por microorganismos (MICP) y actúa como una tecnología innovadora de biomineralización sustentable (Zhang et al., 2023). El proceso de MICP realiza la precipitación de carbonatos en una solución sobresaturada en un microambiente, durante el proceso, los microorganismos generan productos metabólicos (CO_3^{2-}) que reaccionan con los iones (Ca^{2+}), lo que resulta en la precipitación de CaCO_3 (Omeregje et al., 2018). Recientemente, numerosas estrategias MICP se han desarrollado utilizando diferentes microorganismos, incluida la precipitación de calcita mediante hidrólisis de urea de bacterias ureolíticas, la formación de carbonatos mediante hidrólisis de asparagina de *Bacillus megaterio* y precipitación de sulfuro mediante reducción con sulfato de bacterias reductoras de sulfato (Wu et al., 2021). Entre estas estrategias, la biomineralización ureolítica es la más utilizada para numerosas aplicaciones como el hormigón autorreparable y la biorremediación del suelo (Fig. 2b).

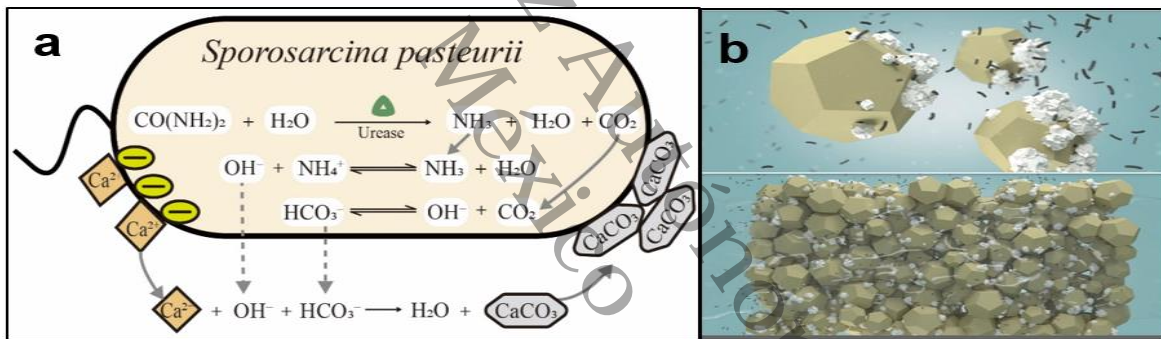


Figura 2. a) Mineralización Inducida Biológicamente (MIB), catalizada por la bacteria *Sporosarcina pasteurii* que usa la urea como sustrato para desencadenar la reacción. Tomado de Wu et al. (2021) **b)** Representación esquemática de las células bacterianas (negras) afectando los granos del suelo (marrones) e induciendo la formación de cristales de calcita (blancos). Tomado de Zhang et al. (2023).

El proceso de precipitación de calcita inducida microbiológicamente (MICP) produce cristales de CaCO_3 que muestran alta resistencia y tienen un menor impacto negativo en el medio ambiente, la tecnología MICP se ha utilizado también para mitigar la erosión de las costas y la contaminación por metales pesados. Un desafío para la aplicación de MICP es el costo total, incluida la producción de biomasa, sin embargo, el coste de MICP es comparable con técnicas como el “jet grouting” (Zhang et al., 2023); si bien los costos iniciales de MICP pueden ser más altos que los de algunos métodos tradicionales, los beneficios a largo plazo y los menores costos

de mantenimiento pueden convertirlo en una solución más rentable en el futuro, particularmente para proyectos pequeños y medianos (Fouladi et al., 2023).

2.1.4. BIOCEMENTACIÓN

La mayoría de los reportes que se tienen de precipitación microbiana generalmente se refieren a MIB ya que la formación del mineral ocurre de forma extracelular, y es una de las prácticas verdes más destacadas, que utiliza el metabolismo de los microorganismos para producir minerales de carbonato de calcio que tiene una extraordinaria capacidad para fortalecer, curar y proteger los materiales de construcción (Achal y Mukherjee, 2015; Rahman et al., 2015; García-Avelino, 2021), utilizando la biodeposición de carbonato como aglomerante para reparar vacíos, es decir, biocementando. Varios estudios han demostrado (Piñar et al., 2010; Jroundi et al., 2017; Zulaika et al., 2021) que la MICP puede ser empleada para mejorar las propiedades mecánicas de los materiales y se ha propuesto como una herramienta autosustentable de biorremediación, usándose en aplicaciones tecnológicas que incluyen refuerzo e inmovilización de contaminantes peligrosos en los suelos, eliminación de metales tóxicos de aguas residuales contaminadas, secuestro de CO₂, disminución de la porosidad/permeabilidad y mejora de la resistencia a la compresión del concreto, entre otros (De Muynck et al., 2010; Chaparro-Acuña et al., 2018; Nayanthara et al., 2019).

Se han propuesto diferentes especies bacterianas con la finalidad de precipitar carbonatos en ambientes alcalinos ricos en iones Ca²⁺, donde principalmente cuatro grupos de microorganismos están involucrados en el proceso, como son los organismos fotosintéticos (cianobacterias y algas), los que emplean ácidos orgánicos, los que participan en el ciclo del nitrógeno y las bacterias sulfato-reductoras (Braissant et al., 2007). Las vías metabólicas dependen del microorganismo y de las condiciones ambientales, así como de los nutrientes disponibles. Además de las vías metabólicas, las bacterias y los hongos también puede influir en la precipitación de carbonato de calcio al proporcionar sitios de nucleación (Lee y Little, 2022). No obstante, todas las vías van a requerir de una fuente externa de calcio, que puede ser suministrado por el medio o puede resultar del material de soporte al que está unida la bacteria (Ruíz-Oviedo, 2020). La hidrólisis de la urea [CO(NH₂)₂] es a menudo la ruta seleccionada para aplicaciones prácticas porque el proceso requiere una sola enzima: la ureasa, que proporciona una rápida precipitación de carbonato en comparación con otras vías (Chaparro-Acuña et al., 2018).

El CaCO_3 es uno de los minerales más abundantes en la tierra, y su precipitación es un fenómeno común en aguas marinas, sedimentos, agua dulce, suelos y otros ambientes. Adolphe et al. (1990) fueron los pioneros en utilizar la MICP para la restauración de roca ornamental. Hoy en día, este biomaterial se conoce como “bioconcreto” o “biocemento”, el cual se ha usado en la industria de la construcción como hormigón autorreparable que, bajo las condiciones adecuadas, los agentes microbianos presentes en la matriz del cemento pueden rellenar las fisuras una vez que se han producido.

Se ha demostrado que la adición bacteriana a matrices cementosas es una técnica prometedora de autocuración, que se consigue agregando cápsulas como estrategia de protección para el microorganismo. Estas capsulas tienen algún material específico que proporciona nutrientes y que contiene una bacteria generalmente del género *Bacillus*, que puede permanecer inactiva durante décadas. Así, cuando las cápsulas se rompen con el agrietamiento del hormigón y hay humedad, las bacterias se activan y producen calcita. Para ello, los microorganismos utilizados deben ser capaces de soportar la alta alcalinidad del cemento y la presión de la compresión (Pacheco et al., 2022).

El biocemento mantiene la integridad estructural y prolonga la longevidad en las construcciones; esta técnica no sólo garantiza el rendimiento de las estructuras de hormigón, sino que también ayuda a mitigar la liberación de CO_2 a la atmósfera al reducir la necesidad de producción de cemento (Fouladi et al., 2023), reduciendo la porosidad al reparar fisuras y grietas en su fase inicial. Hay experimentos que demuestran que el cierre de grietas utilizando esta técnica se redujo hasta en un 0,46 mm de ancho (Wiktor y Jonkers, 2011). En este caso la actividad metabólica ya sea vía producción de ureasa y/o oxidación de carbono heterótrofo, inicia con la precipitación de carbonato de calcio que curará la estructura, aumentando la durabilidad de los materiales de concreto en ambientes húmedos (Rodrigues-dos Santos et al., 2023).

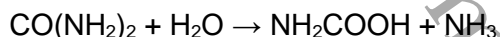
La finalidad más importante del bioconcreto es que sea sustentable y que no requiera su reparación después de haber sido agregado en una construcción, ya que las bacterias utilizadas, principalmente del género *Bacillus*, pueden sobrevivir de 50 a 200 años en la estructura, garantizando las propiedades de autorreparación, mejorando la resistencia y disminuyendo la permeabilidad del concreto. Es preciso destacar que el uso de bacterias del género *Bacillus* en construcción se debe a su pared celular gruesa, la cual le permite sobrevivir en condiciones extremas como las del concreto (el fraguado, por ejemplo) y algunas bacterias llegan a formar endosporas que les facilita reactivarse cuando las condiciones son adecuadas. Una de las

limitantes del bioconcreto es que los resultados comparativos son escasos debido a que no se ha estudiado a profundidad en alguna aplicación existente en infraestructura, sino sólo en lapsos cortos en laboratorio (Hernández-Piedrazul et al., 2022).

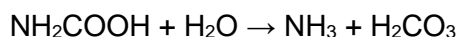
2.1.5. HIDRÓLISIS DE UREA

Las bacterias productoras de ureasa han atraído una gran atención en la biorremediación, debido a su bajo costo y alta eficiencia para desencadenar la cementación al precipitar una gran cantidad de cristales de CaCO_3 que pueden ser usados en diferentes ámbitos para unir partículas y rellenar poros. Generalmente, el CaCO_3 producido por diferentes bacterias ureolíticas difiere en el tipo de cristal y la morfología, esto se atribuye principalmente a las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), diferentes especies de bacterias producen EPS que varían mucho en sus propiedades bioquímicas, lo que en consecuencia da como resultado diversos tipos de morfología de cristales durante el proceso MICP (Tang et al., 2020). La precipitación de calcita (polimorfo del CaCO_3) ocurre como un subproducto del metabolismo microbiano (Chahal et al., 2011, Carter et al., 2023), y el método más usado para lograr esta precipitación es mediante la hidrólisis de urea. Las ureasas son un grupo de enzimas que hidrolizan la urea produciendo amoníaco y dióxido de carbono, el amoníaco producido aumenta el pH y el CO_2 se transforma en iones de carbonato, conduciendo a su precipitación (Chaparro-Acuña et al., 2018; Røyne et al., 2019; Görge et al., 2021).

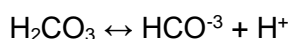
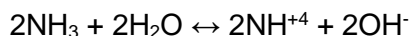
El proceso, descrito por Achal (2015) comienza cuando un mol de urea intercelular se hidroliza a 1 mol de amoníaco (NH_3) y 1 mol de ácido carbámico (NH_2COOH).



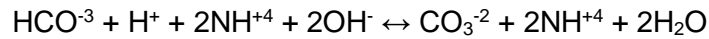
El mol resultante del ácido carbámico puede hidrolizarse espontáneamente para formar un mol adicional de amoníaco y ácido carbónico (H_2CO_3).



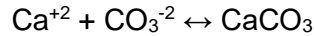
En presencia de agua, el amoníaco y el ácido carbónico reaccionan para formar 2 moles de iones de amonio (NH_4^+) e hidróxido (OH^-).



Los iones de hidróxido creados son responsables de aumentar el pH general del medio, cambiar el equilibrio de bicarbonato a favor de la formación de iones de carbonato (CO_3^{2-}).



En presencia de iones de calcio (Ca^{2+}), los iones de carbonato precipitan como cristales de carbonato de calcio (CaCO_3).



Se forma una monocapa de calcita. La monocapa aumentará la afinidad de las bacterias con la superficie, lo que dará como resultado la producción de capas adicionales de calcita. Los cristales formados estarán adheridos a la superficie bacteriana, que sirve como sitio de nucleación, dado que está cargada negativamente y atrae y une iones Ca^{2+} que conducen a la deposición de biominerales (Fig. 3)

Los mecanismos relacionados con una enzima dependen en gran medida de la temperatura del entorno, y dado que las bacterias también son sensibles, optimizar la temperatura para MICP es crucial cuando se trata de su aplicación en el ecosistema. Múltiples estudios han demostrado que la temperatura ideal para MICP es de 30 °C a 35 °C, mientras que el pH óptimo al que se produce la ureólisis está constantemente en debate, ya que diferentes grupos de bacterias tienen un pH diferente para liberar la enzima ureasa. Sin embargo, un tecnicismo compartido entre todos los estudios sobre la ureólisis es que la liberación de dióxido de carbono y la producción de amoníaco aumentan el pH, lo que ayuda a mantener un pH adecuado para MICP (Rajasekar et al., 2021). Los géneros típicos y más estudiados de bacterias productoras de ureasa son *Bacillus* y *Sporosarcina* (Tang et al., 2020).

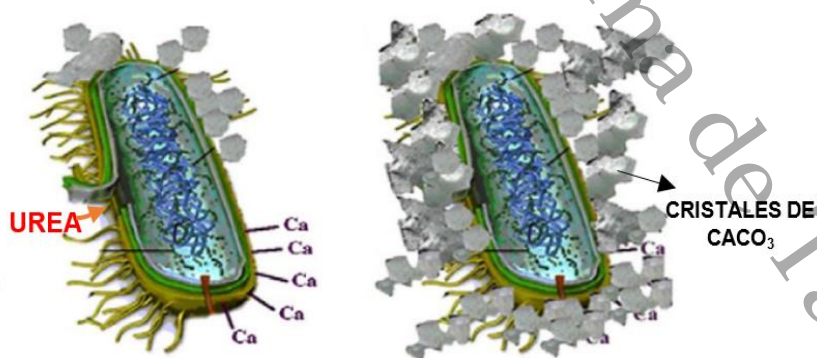
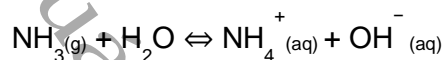


Figura 3. Precipitación de carbonatos inducida por microorganismos (MICP), utilizando la urea como sustrato para desencadenar la reacción, los cristales se adhieren a la bacteria por los sitios de nucleación. Tomado y modificado de Tang et al. (2020).

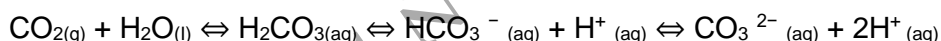
2.1.6. DESAMINACIÓN OXIDATIVA

Esta es una técnica que no usa como sustrato a la urea, es un método patentado por González Muñoz et al. (2008) que busca la protección y consolidación de materiales de construcción y ornamentales, mediante la activación de la microbiota, esto se favorece introduciendo en la solución un componente orgánico como única fuente de carbono y nitrógeno. Esta fuente orgánica se refiere exclusivamente a una mezcla de aminoácidos con lo que se evita el problema derivado de la producción de ácidos como resultado del metabolismo de los azúcares. Es crucial que la solución orgánica-inorgánica no contenga carbohidratos como fuente de carbono.

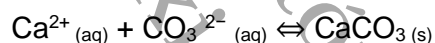
La desaminación oxidativa de los aminoácidos genera amoníaco extracelular elevando el pH del medio conforme a la siguiente reacción química:



Esta subida del pH de la solución provoca, por tanto, una alcalinización del medio:



En presencia de calcio, se produce la precipitación de carbonato cálcico, de acuerdo con la siguiente reacción:



Si la fuente de calcio introducida en la solución es acetato cálcico, el acetato forma el par acético/acetato que actúa tamponando la solución e impidiendo bajadas de pH que pudieran detener el proceso de precipitación de CaCO_3 e incluso disolver el carbonato previamente formado o el del propio material tratado. Es importante que la solución no contenga otras sales salvo carbonatos y/o tampón fosfato.

2.1.7. BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS

Las bacterias presentan muchas vías metabólicas y liberan con frecuencia gran cantidad de productos al ambiente y, son a menudo, el centro de una gama extensa de procesos, incluyendo la mineralización. Las bacterias carbonatogénicas son aquellas que tienen la habilidad de producir CaCO_3 , compuesto químico que tiene la particularidad de presentar tres variantes polimórficas cristalinas (calcita, aragonita y vaterita), la configuración más estable de todas ellas, a presión y temperatura ambiente es la calcita, la segunda variedad la aragonita y la tercera la vaterita (Gonzalez-Muñoz et al., 1996; Dhami et al., 2013; Sun et al., 2025). La calcita es la fase

preferida de precipitación de carbonato de calcio para aplicaciones MICP, por su estabilidad y su efecto de unión macroscópica, mientras que la vaterita es una forma cristalina metaestable y se transforma fácilmente en calcita; también se ha reportado el buen efecto de cementación de la aragonita, pero se necesitan más estudios, en particular investigaciones microscópicas para su validación (Tang et al., 2020).

Por otra parte, Hammes et al. (2003) durante un estudio de precipitación de CaCO_3 microbiano ureolítico, observaron diferencias morfológicas en los agregados de cristales precipitados dentro de colonias bacterianas cultivadas en agar. Las bacterias ureolíticas son capaces de formar distintos tipos de cristales según la especie y el medio en el que se encuentren, se ha descrito que depende de la concentración de EPS y de la materia orgánica lo que influiría en su formación. El tamaño de los cristales también es un factor clave, los cristales de CaCO_3 precipitados por el metabolismo ureolítico son generalmente grandes y menos solubles que los precipitados en condiciones abióticas (Arias et al., 2017). Se ha reportado que mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), tanto especies del género *Streptomyces* como los de *Bacillus* producen calcita, ya que los de estos últimos se caracterizan generalmente por una forma esférica, mientras que los precipitados por *Streptomyces* tienen forma de placas planas, ramificadas, y alargadas (Rautaray et al., 2004; Li et al., 2011). Aunque los precipitados no se limitan exclusivamente a esas configuraciones, es dependiendo de la especie y de las condiciones experimentales, manifestando diversas formas cristalinas.

La precipitación de carbonatos ocurre en muchas especies de bacterias, se ha reportado mayormente en las del género *Pseudomonas*, *Bacillus* (especialmente *Bacillus pasteurii*-renombrada ahora como *Sporosarcina pasteurii*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, y *Bacillus amyloliquefaciens*), también en el género *Vibrio*, *Streptomyces*, en bacterias reductoras de sulfato, cianobacterias, *Myxobacteria* y *Halobacillus*, así como *Acinetobacter sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Cupriavidus metalidurans*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Desulfovibrio desulfuricans* (Soffritti et al., 2019; Gebru et al., 2021; Pyzik et al., 2021). El filo Proteobacteria incluye géneros reductores de sulfato y azufre, es decir que reducen el sulfato y el azufre a sulfuro, respectivamente, así como reductores de nitratos a nitrógeno gaseoso u óxido nitroso, que tienen una gran capacidad para eliminar o limpiar sales de sulfato o nitrato de las superficies de roca, entre estas también podemos encontrar a *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Thiobacillus sp.*, *Myxococcus sp.*, *Micrococcus sp.* (Cameotra y Dakal, 2012). En la industria del concreto autocurable, según artículos publicados entre 2000 y 2021 y recopilados por Huang et

al., 2022, se han empleado diferentes tipos de microorganismos como cianobacterias y bacterias como *Synechococcus*, *Prochlorococcus*, *Bacillus alkalinitrilicus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cohnii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus pasteurii*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium* y *Diaphorobacter nitroreducens*, *Bacillus cereus*, *Desulfovibrio brasiliensis* y *Desulfovibrio vulgaris*, entre otras (Fig. 4).

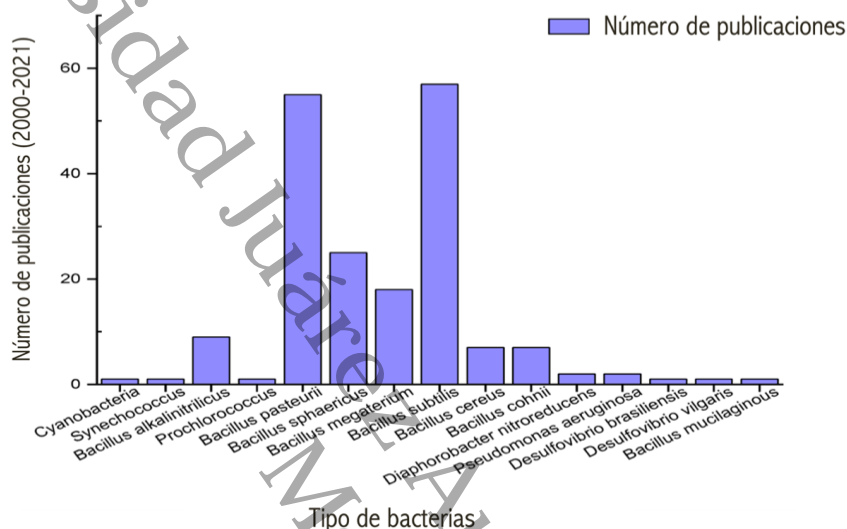


Figura 4. Bacterias usadas para concreto autorreparable (2000-2021). Gráfico tomado de Huang et al. (2022).

2.1.8. CONSERVACIÓN DEL PATRIMONIO CULTURAL TANGIBLE

Se considera patrimonio cultural a los monumentos (obras arquitectónicas, de escultura o de pintura), a los conjuntos (grupos de construcciones) o a los lugares o sitios (obras del hombre u obras conjuntas del hombre y la naturaleza) que tengan un valor universal excepcional desde el punto de vista histórico, estético, etnológico o antropológico (UNESCO 1972).

En el ámbito de los monumentos históricos, se define como conservación a todas aquellas medidas o acciones que tienen como objetivo salvaguardar el patrimonio cultural tangible, asegurando su accesibilidad a generaciones presentes y futuras (Trujillo-García, 2021). Según el Comité Internacional para la Conservación, que es un comité dentro del Consejo Internacional de Museos (ICOM-CC, 2008), la conservación tiene como finalidad proteger distintos espacios y puede llevarse a cabo de manera preventiva, curativa o mediante restauración. La conservación preventiva comprende medidas destinadas a impedir o reducir posibles daños en el futuro. En cambio, la conservación curativa consiste en intervenciones directas sobre un bien o conjunto de bienes culturales, con el propósito de frenar los procesos de deterioro que ya se encuentran en

curso. Finalmente, la restauración se aplica únicamente a un bien individual en estado estable, y busca favorecer su apreciación, comprensión y funcionalidad; esta última solo se realiza cuando el bien ha perdido parte de su valor, significado o función, y generalmente implica cambios en su apariencia.

En muchos países se han promulgado leyes e instituciones para la conservación y protección del patrimonio cultural en su respectivo ámbito territorial. En México por ejemplo esta: “La ley Federal sobre Monumentos y Zonas Arqueológicas, Artísticas e Históricas” (1972), que enfatiza la investigación, protección, conservación, restauración y recuperación tanto de los monumentos arqueológicos, artísticos e históricos como de las zonas que los albergan. De esta forma, la preservación del patrimonio edificado se vuelve una necesidad cultural y de transmisión de conocimiento, dado su valor histórico, arqueológico y educativo, el cual además se transforma en un recurso turístico y, por consiguiente, adquiere un valor económico adicional. Es bien sabido que México es uno de los 10 países que más turistas internacionales reciben, en gran medida atraídos por los destinos de ciudades con patrimonio cultural e histórico. Además de contar con varios sitios destacados como patrimonio, y cuando se “patrimonializa” un sitio, indudablemente también se “turistifica” (Trujillo-García, 2021). Además, en 2010, el Centro Internacional de Estudios para la Conservación y la Restauración de los Bienes Culturales (ICCROM) junto con el Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH) establecieron un convenio de cooperación con el fin de poner en marcha programas orientados a la conservación del patrimonio cultural en América Latina y el Caribe. Dichas iniciativas estuvieron enfocadas en la conservación del papel y de la piedra en México, ya que, pese a la relevancia del patrimonio en piedra, en el país existen pocas publicaciones dedicadas a su cuidado y aún menos sobre los principios y criterios aplicados en estos procesos (Jáidar et al., 2025).

En la conservación, se deben considerar muchos factores antes de hacer una intervención, como el material del que está hecha la obra, el entorno, el grado de deterioro y su propósito original, además de los valores estéticos, históricos, culturales y religiosos (Benabidi-Parra, 2023). Las intervenciones de conservación-restauración surgen del análisis específico del deterioro de los monumentos realizados en piedra y del juicio crítico para llevar a cabo su intervención, enmarcados bajo criterios específicos como inocuidad, retratabilidad, compatibilidad, por lo que se han probado muchos tratamientos.

Actualmente se usan varios métodos de conservación en las rocas que sufren biodeterioro, ya sean métodos **físicos** como las radiaciones que afectan directamente la replicación genética o

alteran físicamente al organismo, y en los casos más complejos se utilizan tecnologías y equipos especializados, como la criogenia, el láser o la limpieza a presión, en los **mecánicos** como el uso de bisturí, espátula, cepillo, aspiradoras, entre otros para la remoción manual de los organismos, y **químicos** como la fumigación con gases, o aplicación de productos orgánicos o inorgánicos mediante pinceladas, aplicación de compresas, e inyecciones; se da también el uso de alcohol o xilol, tensoactivos, papetas, geles y microemulsiones (Jáidar et al., 2025). Por su simplicidad, los métodos mecánicos son usados frecuentemente pero no ofrecen resultados de larga duración, mientras que los métodos físicos no están muy difundidos debido al alto costo y riesgo para los operarios, de igual forma los métodos químicos pueden ocasionar problemas de toxicidad en las personas y alteraciones en las propiedades de los materiales a tratar (Sameño-Puerto, 2018; Soffritti et al., 2019). Considerando lo anterior, muy pocos tratamientos han resultado completamente satisfactorios, algunos arrojando resultados poco eficientes, acelerado alteraciones en términos de textura, resistencia física y apariencia estética en la roca (Cameotra y Dakal, 2012; Jroundi et al., 2021). Y cuando se trata de intervenciones en bienes culturales, estas deben regirse por el principio de mínima intromisión, privilegiando técnicas que impliquen la menor molestia posible. Los materiales empleados deben ser compatibles físico-química y biológicamente con el original, de modo que no alteren su naturaleza. Es indispensable, a su vez, que su composición, comportamiento y envejecimiento estén bien estudiados, y que se realicen pruebas antes de aplicarlos (Jáidar et al., 2025).

Se hace énfasis, a su vez, en que uno de los factores más importantes en la conservación del patrimonio edificado es mantener la cohesión de la roca, es decir, que los componentes mantengan una unión o adhesión estable entre sí, de lo contrario la estructura puede sufrir un deterioro muy rápido, pues los componentes al perder la cohesión y estar "individuales" pueden desprenderse fácilmente, y la roca puede empezar a desmoronarse. Para restaurar la fuerza cohesiva es necesario utilizar un consolidante, que cumpla con ciertas características, como ser estable y resistente a largo plazo (incluso en condiciones adversas al aire libre), además, debe penetrar profundamente en la piedra y distribuirse uniformemente por todo el material y, por último, debe tener un impacto mínimo en la apariencia de la roca (Benabidi-Parra, 2023).

2.1.9. MÉTODOS CONVENCIONALES DE CONSOLIDACIÓN

Los tratamientos convencionales para la conservación y consolidación están concebidos para ser aplicados a materiales homogéneos con una composición, textura y porosidad uniformes como el hormigón, sin embargo, la piedra es un material heterogéneo, con un grado de

penetración y distribución diferente, lo que conlleva diferente durabilidad y receptividad de los tratamientos. Generalmente, los métodos de protección llevan una secuencia: primero se identifica el mecanismo o tipo de deterioro, luego se realiza la limpieza seguida de una consolidación y, por último, se protege la piedra para evitar un nuevo deterioro (Rivas-Pavón, 2021).

La consolidación tiene como finalidad devolverle o aumentar la cohesión al material pétreo que, debido a los procesos de deterioro sufridos, se encuentra en un estado escasamente compacto, la consolidación, entonces, proporciona una mayor resistencia mecánica a la piedra (De Lerma-Perdomo, 2020). Por tanto, se define como consolidante a aquel material que penetra la roca y mejora su cohesión. Según Benabidi-Parra (2023), existen dos categorías principales de consolidantes: los inorgánicos y los sintéticos, entre los inorgánicos se encuentran los consolidantes a base de cal, mientras que los sintéticos incluyen polímeros acrílicos, epoxis y poliésteres. Los más empleados son los polímeros sintéticos, que pueden aplicarse en forma de polímeros disueltos, o en forma de monómeros que después se polimerizan en el interior de la piedra, sellando espacios (McNamara y Mitchell, 2005; Sameño-Puerto, 2018). El problema con este tipo de consolidantes es que tienden a producir una capa superficial que se deteriora con el tiempo, se desprende y, requiere mantenimiento constante, además, algunos pueden ser tóxicos y usan solventes que contribuyen a la contaminación (Castanier et al., 2000). Adicionalmente, son susceptibles a sufrir alteraciones por los rayos del sol, o las precipitaciones; en contraste, otros consolidantes como los alcoxi-silanos o alquilsilanos, a base de silicio (Elerter et al., 2021) son resistentes a los cambios climáticos, pero forman una biopelícula que cumple más un uso protector que consolidante. Mientras que los consolidantes inorgánicos (hidróxido, anhídridos) a pesar de proporcionar una mayor duración y resistencia tienen como inconveniente que logran poca penetración y, por lo tanto, baja acción consolidante, además tienen una tendencia a la formación de sales y cambio de color en la superficie (Sameño-Puerto, 2018; Rivas-Pavón, 2021).

En México, las condiciones ambientales y las características de los materiales han obligado a adaptar los métodos de conservación, ya que muchos de los consolidantes exitosos en Europa —como polímeros sintéticos, resinas epóxicas, silicones o silicatos— resultaron inadecuados en intervenciones *in situ*. Su incompatibilidad con los sustratos, la falta de conocimiento sobre sus propiedades y su uso indiscriminado provocaron deterioros en lugar de estabilización. Solo en contextos controlados, como museos, estos productos ofrecieron mejores resultados. Ante estas

limitaciones, el hidróxido de calcio se ha consolidado como el material más eficaz para la piedra caliza y el silicato de etilo para piedras volcánicas, prácticas que aún se mantienen. Este caso evidencia la necesidad de evaluar cada producto según el clima, el contexto y la compatibilidad con los bienes (Magar, 2019; Jáidar et al., 2025). Además, se ha reportado que la mayoría de estos procesos tradicionales, independientemente de su naturaleza, tienen algunos efectos secundarios. Por ejemplo, los polímeros orgánicos como el aceite de linaza producen una costra negra oscura en el material y la parafina de cera absorbe partículas de polvo (Guía, 2015). Generalmente, la eficiencia de los métodos de conservación y protección no es permanente y siempre existe la preocupación por futuras operaciones de reparación y mantenimiento, pues algunos métodos y materiales pueden ser riesgosos para quienes los aplican y, por otro lado, es una acción irreversible en muchos casos para el monumento (Ershad-Langroudi et al., 2019).

Es indispensable, además, en la consolidación que la tecnología utilizada permita que los materiales se apliquen con la profundidad adecuada en la roca, por lo tanto, los materiales de consolidación o protección deben penetrar a través de las capas dañadas de la superficie y alcanzar las capas dañadas dentro, de lo contrario, puede causar más aplastamiento de la capa superficial y grave daño de los monumentos protegidos en comparación con los no tratados (Luo et al., 2015 y Hansen et al., 2003), pues, aunque parece que se forma una capa sólida sobre la superficie tratada, los esfuerzos mecánicos y la mala calidad de la capa interior pueden presentar un efecto de desprendimiento peligroso para un monumento mal consolidado (Ershad-Langroudi et al., 2019). Al respecto, ha habido avances en los últimos años, se han desarrollado técnicas innovadoras, compatibles con los sustratos pétreos, como las nanopartículas (SiO_2 , TiO_2 , ZnO y Ag), por ejemplo, un consolidante a base de nanopartículas que permite una mayor penetración es el NANORESTORE®, compuesto por hidróxido cálcico disperso en alcohol isopropílico, donde el disolvente permite la penetración en el sistema poroso de la piedra, depositando las nano partículas de cal apagada en las paredes e intersticios de los poros (De Lerma-Perdomo, 2020).

Por otro lado, se ha estado explorando la restauración mediante biodeposición para producir “biocalcina” o biocemento, este último requiere microorganismos capaces de crecer bajo condiciones ambientales de exposición, un medio nutricional acompañante para apoyar el crecimiento del microorganismo, un ambiente alcalino para que se puedan dar las reacciones y un mecanismo de inclusión de la bacteria a las superficies. Se han descrito varias estrategias, incluyendo inmersión, rociado y cepillado (Lee y Little, 2022), aunque se ha reportado que los métodos que han usado microorganismos también tienen sus desventajas, pues su eficacia

depende de las características del sustrato pétreo (p.e., porosidad, mineralogía, nivel de degradación), la presencia de sales solubles, el tipo de microorganismo, carga bacteriana aplicada, y su interacción con la microbiota autóctona (Jroundi et al., 2017). Por tanto, es necesario la búsqueda de estrategias más efectivas, preferiblemente con microorganismos que estén adaptados a la roca a tratar y a las condiciones climáticas del lugar donde se encuentra la estructura.

2.1.10. ROCA CALIZA

La roca caliza, principal material constructivo de los monumentos históricos en la cultura Maya, se clasifica como sedimentaria, de origen fundamentalmente químico u organógeno, formada al menos por un 50% de carbonato cálcico, con porcentajes variables de impurezas. En su interpretación más amplia, el término incluye cualquier material calcáreo que contenga carbonato de calcio como: mármol, creta, travertino, coral y marga. Cada uno de los cuales poseen propiedades físicas distintas (Guerrero-Hernández, 2001; Panchuck, 2021). Las calizas son altamente porosas e hidrófilas, susceptibles al agua, que a menudo penetra en los poros llevando iones nocivos y corrosivos como los cloruro y ácidos (Cameotra y Dakal, 2012; Yan y Wang, 2024). Las propiedades físicas, mineralógicas y químicas de las rocas carbonatadas son ampliamente utilizadas en muchos sectores de la industria, especialmente en la construcción, como agregado o en la producción de cemento, también se utilizan en la industria del hierro y el acero, en la industria química, en la fabricación de vidrio, y en muchos más usos especializados (Harrison, 1993; Okewale et al., 2024).

En la construcción y la escultura se utilizan varios tipos de calizas, distinguiéndose dos categorías: calizas de grano fino, de alta porosidad, y poros pequeños (menos de 10 μm) y caliza biodetrítica de porosidad variable formadas por granos y poros más grandes (más de 10 μm de ancho) (Le Me'tayer-Levrel et al., 1999). Este material se ha utilizado en la construcción de muchos monumentos históricos y esculturas importantes, como las catedrales europeas, templos romanos y griegos, el Taj Mahal y las pirámides, sobre todo en lugares como Mesoamérica, ya que fue un material ampliamente utilizado por las culturas prehispánicas, pero aunque es un material altamente resistente, se ha reportado que es susceptible a los contaminantes ambientales e industriales, las partículas y las cenizas que a menudo se depositan en los monumentos acelerando su deterioro (Cameotra y Dakal, 2012; Tatis-Castro y Barbosa-López, 2012). La piedra fue esencial en las sociedades que habitaron el actual territorio mexicano, utilizada en bienes muebles y arquitectónicos con fines prácticos, rituales y decorativos. Según

la disponibilidad local o mediante comercio e intercambio, se emplearon diversos materiales como caliza, basalto, toba, tezontle, mármol, andesita, arenisca, obsidiana, sílex y alabastro, a menudo combinados o complementados con otros elementos (Jáidar et al., 2025).

Los materiales pétreos utilizados en arquitectura se designan usualmente con el término “piedra natural” (González-Gómez, 2016), que incluye a cualquier material pétreo que después de extraerse de su yacimiento, es susceptible de ser utilizado como elemento constructivo. Dentro de este tipo de material se pueden diferenciar la piedra de construcción, o de cantería (material que puede ser incorporado en la estructura, debido fundamentalmente a su resistencia mecánica) y la piedra o roca ornamental, que se valora más por sus posibilidades decorativas, debido a la belleza que presenta al ser tallada y pulida (Fort-González, 2009; Strzałkowski et al., 2023).

Como se ha mencionado anteriormente, diversas poblaciones de microorganismos se detectan en los materiales de roca y algunos de estos tienen actividades que pueden provocar su degradación. Cualquier organismo que genera ácidos orgánicos (bacterias, hongos, líquenes, etc.), es capaz de disolver carbonatos insolubles, alterando propiedades clave de la roca como la porosidad y la textura superficial, lo que a su vez incrementa la bioreceptividad del material (González-Gómez, 2016). No obstante, la actividad microbiana puede tener un impacto positivo importante en la durabilidad de la roca caliza, siendo relevante entender esta actividad con el fin de seleccionar apropiadamente las estrategias de control y tratamiento para la reparación y restauración de edificios y monumentos (De Turris et al., 2013).

2.2. ANTECEDENTES

En su 17ª sesión en París en 1972, la conferencia general de la UNESCO adoptó la Convención sobre la Protección del Mundo y la Naturaleza. El programa tiene como uno de sus objetivos integrar bajo una lista sitios de valor único excepcional, por sus valores y significados, incluida la relevancia científica y cultural. Las convenciones, recomendaciones y resoluciones internacionales en materia de patrimonio reflejan el valor universal que los pueblos del mundo otorgan a la preservación de bienes culturales y naturales, considerados únicos e insustituibles, sin importar el país al que pertenezcan.

Desde entonces, se han lanzado muchos proyectos y programas para salvaguardar y preservar estos edificios (Cameotra y Dakal, 2012). Un ejemplo de esto es la Recomendación sobre el Paisaje Urbano Histórico (PUH) presentada por la UNESCO en 2011, donde se consideró que los conjuntos históricos urbanos son manifestaciones del patrimonio y la riqueza cultural, y constituyen un testimonio del género humano que debe ser preservado.

Por otra parte, el potencial biorremediador de las bacterias carbonatogénicas se vislumbró en los años 70's, pero recientemente se ha valorado el trabajo de investigación dirigido a aislarlas, para su aplicación en la bioconservación de monumentos y obras de arte talladas en roca (Jroundi et al, 2017; Marvasi et al., 2020). El método de precipitación de CaCO_3 inducida microbiológicamente (MICP) ha sido utilizado en diferentes métodos de biorremediación, ya sea de monumentos, edificios o suelos. Por ejemplo, Castanier et al. (1995), aplicaron la carbonatogénesis bacteriana en morteros o cementos biológicos, que se crean a partir de una mezcla de bacterias, roca caliza finamente molida y medio nutricional en proporciones variables; esta técnica se puede utilizar para fijar piezas pequeñas o para rellenar cavidades en superficies de roca caliza. Después, Le Métayer-Levrel et al. (1999), probaron la capacidad de las bacterias carbonatogénicas para producir recubrimientos de biocalcina sobre edificios y estatuas de roca caliza con el objetivo de estudiar el envejecimiento y revestimiento en diferentes ambientes climáticos, tanto en laboratorio como al aire libre, este estudio obtuvo resultados positivos, no encontrando alteración de color en la superficie, incluso 3.5 años después de haber sido aplicado el biotratamiento, además las estatuas tratadas, mostraban poca degradación y localizada en partes donde el agua de lluvia tendía a acumularse. En este estudio se recubrieron primero los monumentos con un medio que contenía bacterias y después se estimulaba el crecimiento de las carbonatogénicas agregando cada 24 o 48 h un medio nutritivo, método que ha sido usado en estudios posteriores.

Igualmente, se han añadido microorganismos, generalmente del género *Bacillus* directamente a las mezclas de hormigón, este biocemento o hormigón autocurativo contiene esporas bacterianas y nutrientes añadidos durante el proceso de mezclado, en este caso, las esporas germinan cuando se introduce agua, crecen, consumen nutrientes y precipitan CaCO_3 para "curar" las grietas. Cuando las grietas se llenan con carbonato y el agua se desplaza, las bacterias se vuelven inactivas y forman esporas. Si se vuelve a introducir agua, las esporas germinarán y se repetirá el proceso (Lee y Little, 2022). Estas aplicaciones prácticas, ayudan a mitigar el daño producido por la industria del cemento, que representa aproximadamente el 5% de emisiones antropogénicas globales de dióxido de carbono (CO_2), derivado del proceso de calcinación de la roca caliza, este proceso no solo libera una gran cantidad de CO_2 , sino que también implica un alto consumo de energía (Røyne et al., 2019).

Uno de los primeros estudios para mejorar la resistencia a la compresión del cemento basados en MICP fue el realizado por Ramachandran et al. (2001). Este grupo de investigadores experimentó con *Sporosarcina pasteurii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los morteros fueron curados en solución que contenía urea y cloruro de calcio durante 7 días. Se registró en presencia de *S. pasteurii* una resistencia mayor de 65MPa, que fue relativamente más alta que los morteros control (55 MPa). Se ha mencionado que uno de los problemas asociados con el hormigón microbiano es el costo utilizado en el cultivo de células bacterianas, y para superar esto, Achal et al. (2009) reemplazaron los nutrientes comerciales con algunos subproductos industriales como licor madre de lactosa (LML) y licor de maceración de maíz (CSL), obteniendo una mejora del 17 % en la compresión con *S. pasteurii* cultivada en medio LML en comparación con el control (23,2 MPa).

La biocementación también se ha propuesto como una herramienta de biorremediación para disminuir la porosidad/permeabilidad del suelo. Ruiz-Oviedo (2020) usó esta técnica natural en la remediación de ambientes contaminados con metales como el cadmio (Cd), cromo (Cr), mercurio (Hg), plomo (Pb) y metaloides tóxicos como el arsénico (As), obteniendo como resultado disminuciones significativas. En este caso los iones metálicos son convertidos a carbonatos insolubles, lo cual ayuda a disminuir la toxicidad y biodisponibilidad de esos elementos. Mientras que Phua y Røyne, (2018), presentaron un proceso para lograr la cementación por disolución y recristalización de roca caliza, utilizando bacterias productoras de ácidos orgánicos para la disolución de roca caliza y enzima ureasa para la precipitación de carbonato. Sin embargo, para

investigar la factibilidad de los procesos químicos involucrados, presentaron una configuración donde se usó ácido láctico de grado reactivo y ureasa comercial de origen vegetal (*Canavalia ensiformis*).

En cuanto a los métodos más recientes de biomineralización para la protección del patrimonio de roca caliza, Jroundi et al., en 2017, propusieron una técnica novedosa que consistió en el aislamiento de una comunidad bacteriana autóctona de la roca de un monasterio en Granada, España, que presentaba daños por meteorización salina. Las cepas obtenidas se activaron en el laboratorio y posteriormente se reaplicaron en la misma estructura, comparando el nivel de consolidación contra dos técnicas previamente propuestas, un medio nutritivo estéril que activa las bacterias carbonatogénicas presentes en la roca, y un medio con una bacteria, en este caso *Myxococcus xanthus*, con probada actividad carbonatogénica. Los resultados mostraron que el nuevo método ofrece mejores resultados, consolida la roca, dando mayor resistencia a la corrosión, ayuda a mejorar el problema de meteorización por presencia de sales y la estructura no sufre cambios significativos de color. La presencia de bacterias autóctonas sintetiza carbonatos que recubren las grietas, ya que la microbiota está adaptada a las condiciones de temperatura, luz, salinidad, evitando el desequilibrio de la microbiota existente.

Por lo anterior, se considera que el proceso de biomineralización bacteriana es una excelente alternativa verde, que puede ser potencialmente utilizada como sustituto de los polímeros tradicionales. Estos microorganismos deben ser objeto de estudio, pues su potencialización favorece el desarrollo de nuevas tecnologías para la bioconservación, no solo de monumentos de roca y “autocurado” de materiales de construcción, sino para bioremediación de suelos, que en comparación con los métodos tradicionales de estabilización mecánica y química, las técnicas de estabilización biológica generalmente consumen menos energía y producen menos emisiones de gases de efecto invernadero y ayudan a combatir el cambio climático. En general, el uso de la tecnología MICP tiene el potencial de proporcionar importantes beneficios ambientales (Fouladi et al., 2023).

3. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de investigación realiza el análisis de bacterias autóctonas con capacidad ureolítica, aisladas a partir de probetas de roca caliza de los sitios arqueológicos incluidos en la lista de patrimonio mundial, Oxpemul dentro del sitio mixto de Calakmul (Campeche) y Chichén Itzá (Yucatán), con el objetivo de determinar su capacidad carbonatogénica para su potencial aplicación en procesos de bioconsolidación del patrimonio construido. El propósito es la búsqueda de nuevos y mejores consolidantes ecológicos para remediar el deterioro pétreo por medio de la biomineralización, práctica que utiliza la mediación microbiana para producir CaCO_3 , un mineral con notable capacidad para consolidar, lo cual es una práctica para proteger los materiales rocosos. La precipitación microbiana de CaCO_3 es impulsada totalmente por procesos naturales y no requiere energía adicional, por lo tanto, se considera un sistema sustentable, en comparación con los métodos de protección tradicionales (mecánicos, físicos y químicos). Estos últimos emplean materiales orgánicos e inorgánicos que, en ocasiones, más que consolidar, ofrecen una protección superficial de corta duración y pueden generar efectos indeseables en los monumentos, como cambios de color, o daño físico por tratamiento mecánico. Además, algunos consolidantes comerciales emplean solventes en el proceso de restauración y conservación, generando residuos que contribuyen a la contaminación del aire y del agua. Por lo tanto, la finalidad de esta investigación es seleccionar e identificar bacterias autóctonas con alta capacidad biomineralizante, específicamente carbonatogénicas, que sean efectivas en la preservación, consolidación y restauración de la roca caliza desde un punto de vista ecológico-ambiental, ayudando de manera segura a proteger la identidad cultural mexicana construida con este tipo de material.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las bacterias aisladas de los sitios arqueológicos de Oxpemul, Campeche y Chichén Itzá, Yucatán, pueden biomineralizar el carbonato de calcio y ser utilizadas como agentes sustentables de bioconsolidación y bioremediación en superficies de roca caliza?

5. HIPÓTESIS

Las bacterias autóctonas aisladas de probetas de roca caliza expuestas en los sitios arqueológicos de Oxpemul en Campeche y Chichén Itzá en Yucatán, pueden favorecer la precipitación de cristales de carbonato de calcio a través de la hidrólisis de la urea y, potencialmente, mediante la desaminación oxidativa de aminoácidos. Por lo tanto, estas bacterias pueden emplearse para consolidar las rocas calizas, incrementando su resistencia mediante la biocementación de grietas o daños ocasionados por el deterioro o biodeterioro, ofreciendo una alternativa sustentable para la conservación del patrimonio cultural edificado.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad biomineralizante y consolidante de bacterias carbonatogénicas autóctonas, aisladas de los sitios arqueológicos de Oxpemul en Campeche y Chichén Itzá en Yucatán, en ensayos *in vitro*, microcosmos y sobre probetas de litotipos de roca caliza expuestas *in situ*.

6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar bacterias autóctonas de los sitios arqueológicos de Oxpemul y Chichén Itzá.
- Determinar la capacidad ureolítica y la precipitación de carbonato de calcio (CaCO_3).
- Caracterizar e identificar las morfologías de los productos biogénicos y cristales formados por las bacterias carbonatogénicas.
- Evaluar el efecto consolidante de las mejores cepas precipitadoras de cristales sobre dos sustratos diferentes (arena y sascab).
- Seleccionar las dos mejores cepas biomineralizantes y determinar su capacidad consolidante sobre probetas de litotipo de roca caliza (Chichén Itzá) mediante técnicas químicas y físico-mecánicas.

7. METODOLOGÍA

7.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO, SITIOS DE MUESTREO

El sitio de Oxpemul se encuentra ubicado en las coordenadas geográficas 18° 30' N y 89° 42' O, cerca del río Desempeño, dentro de la Reserva de la Biosfera de Calakmul, en el municipio de Calakmul, Campeche. Este sitio arqueológico fue redescubierto por Raymundo González Heredia e Iván Šprajc en 2004, y está ubicado a casi 25 km en línea recta al norte de las ruinas de Calakmul. El Grupo Principal de Oxpemul está organizado sobre una meseta de 45.5 m de altura que forma su corte real con un patrón de asentamiento parecido a Calakmul y El Mirador (Fig. 5). La Meseta Suroeste y otras más pequeñas están distribuidas alrededor del bajo central. Oxpemul incluye un total de 21 estelas con 18 altares, muchas de las estelas están de pie y muestran figuras humanas y textos jeroglíficos en buen estado de conservación, algunos de los altares también incluyen textos y uno muestra la figura de una deidad (Folan et al., 2009). Este lugar es parte del sitio mixto de patrimonio mundial de la Antigua Ciudad Maya y bosques tropicales protegidos de Calakmul, Campeche, el cual se encuentra inmerso en una selva subtropical caducifolia, por lo que es un territorio con poco impacto antropogénico.

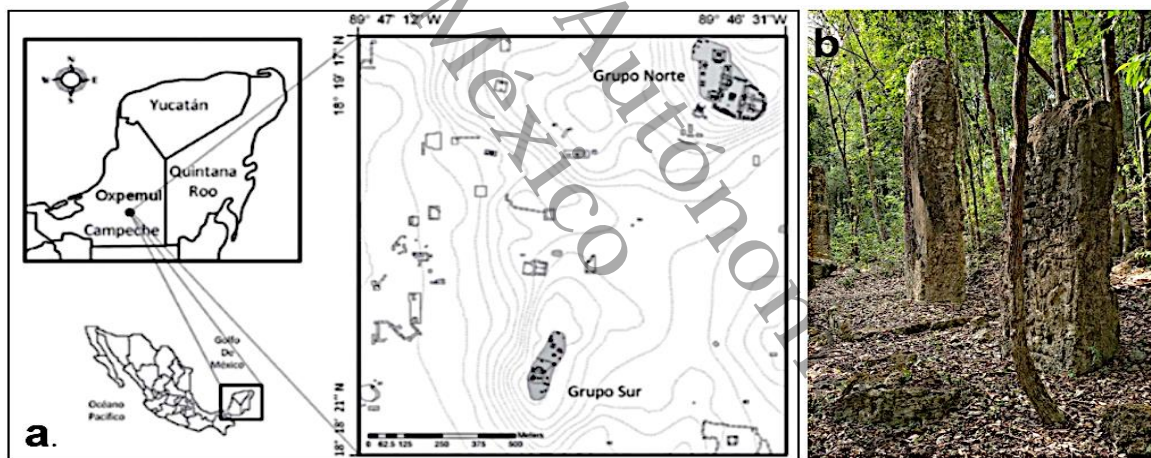


Figura 5. Sitio Arqueológico de Oxpemul **a)** Ubicación geográfica en Campeche. Imagen tomada de Zamora-Crescencio et al. (2012). **b)** Fotografía de las estelas del sitio.

El clima predominante de Oxpemul está clasificado como cálido subhúmedo con lluvias en verano, y los subtipos siguientes: en la zona de la biosfera y la porción colindante con el municipio de Escárcega impera el tipo de clima a (wi) cálido subhúmedo con lluvias en verano, que cubre aproximadamente el 72% de la superficie regional, le sigue el a (wo) cálido subhúmedo con lluvias en verano de menor humedad localizado en la parte norte y se presenta en el 16 % del territorio, y el tercero es cálido subhúmedo a (w2) el cual corresponde al 12% del territorio restante (Gobierno del Estado de Campeche, 2016). Por otro lado, el sitio arqueológico de

Chichén Itzá (Fig. 6), declarado patrimonio de la humanidad por la UNESCO en 1988, y maravilla del mundo desde 2007, sobresalió como centro cultural y político de la vieja civilización maya, se encuentra en el área central de la parte norte de la península de Yucatán, a 120 km de Mérida y 35 km de Valladolid (Pérez-Ruiz, 2005). Es una de las mayores ciudades prehispánicas y su superficie supera los 25 km² (Tejero-Andrade et al., 2018). El sitio es reconocido por su arquitectura y obras de arte en piedra, presenta dos estilos arquitectónicos: el estilo Maya o “Puuc” y el estilo “Tolteca”, representados en fachadas de piedra caliza y esculturas en relieve. Estos edificios históricos son expuestos al sub-clima tropical húmedo de la región con una temporada intermedia de lluvias durante el verano (González-Gómez et al., 2018), la temperatura anual varía de 17 °C a 37 °C y rara vez baja a menos de 12 °C o sube a más de 40 °C. Actualmente cuenta con un promedio de 2 millones de visitantes al año (SECTUR, 2017), siendo un patrimonio muy susceptible al daño antropogénico.

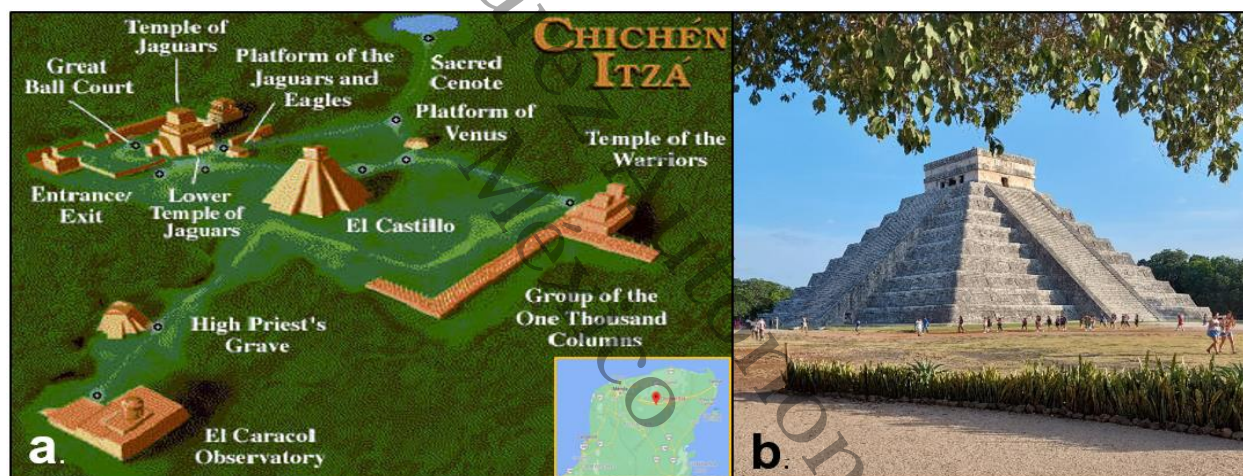


Figura 6. Sitio Arqueológico de Chichén Itzá, Yucatán. **a)** Esquema de las estructuras del sitio arqueológico. Imagen tomada de la página de Chichén Itzá (www.Chichenitza.com), y en miniatura, la ubicación geográfica del sitio. **b)** Templo de Kukulcán o El castillo, en Chichén Itzá. Fotografía de autoría propia (2023).

7.2. PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE PROBETAS PÉTREAS EN OXPEMUL

En un estudio previo, Pérez-Ostos, (2021) expuso probetas con dimensiones promedio de 5 x 5 x 3.5 cm en el sitio arqueológico de Oxpemul (Fig. 7a) de dos diferentes litotipos de roca caliza: 1) litotipo oxpemul y 2) litotipo calakmul. Las probetas se sometieron a limpieza por inmersión en agua desionizada en un baño de ultrasonidos por un ciclo de 20 min., para eliminar material

suelto o polvo formado durante el corte. Después se colocaron sobre un panel de exposición con posición horizontal, en contacto con el medio ambiente natural (Fig. 7b), los paneles permanecieron durante 6 meses para su colonización.

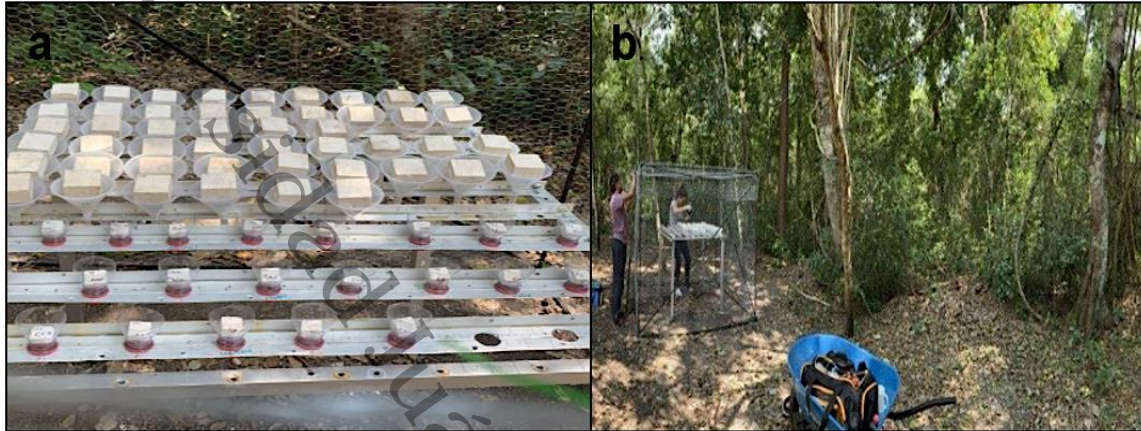


Figura 7. a) Probetas expuestas en el sitio arqueológico de Oxpemul. b) Panorámica del sitio de exposición de las probetas. Fotos tomadas de Pérez-Ostos, (2021).

7.3. AISLAMIENTO DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS

7.3.1. OXPEMUL

Las probetas se analizaron en la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (Villahermosa, Tabasco, México). De cada una se tomaron ocho puntos en forma de mapeo, de la cara superficial expuesta de la roca (Fig. 8), y se depositaron en placas con medio AEMC, que contenían por litro: 20 g de extracto de malta, 2 g de carbonato de calcio, 15 g agar bacteriológico y se adicionó el antifúngico Natamicina para inhibir el crecimiento fúngico.



Figura 8. Aislamiento bajo condiciones de esterilidad de bacterias carbonatogénicas provenientes de probetas de roca caliza (del sitio de Oxpemul) en medio de cultivo AEMC.

7.3.2. CHICHÉN ITZÁ

En el caso de Chichén Itzá, las muestras se obtuvieron raspando cuidadosamente la superficie de la pared superior del Templo Guerreros, el templo jaguares y en Tzompantli (Fig. 9). El raspado se colectó en bolsas estériles y se transportaron al laboratorio para su procesamiento, las partículas se inocularon puntualmente en la superficie del medio AEMC.

Para ambos sitios, las colonias bacterianas diferentes se aislaron, purificaron, y se determinaron sus características morfológicas y tinción de Gram.



Figura 9. Panorámica de los puntos de muestreo en el sitio arqueológico de Chichén Itzá, **a)** Templo guerreros, Indicando con una flecha el lugar de aislamiento bacteriano. Fotografía tomada de De la Rosa- García, (2024). **b)** Templo jaguares. Fotografía: Dra. Claudia García Solís **c)** Tzompantli. Fotografía: Dra. Claudia García Solís.

7.4. SELECCIÓN DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS

7.4.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD UREOLÍTICA

Se ha documentado que las bacterias que tienen una alta producción de la enzima ureasa catalizan una red de reacción hacia la bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio, por lo tanto, se realizó un ensayo de actividad ureolítica. Para tal efecto, se usó el medio base de agar de urea de Christensen's (Atlas, 2010) que, por cada litro de agua destilada, contenía 1 g de digesto de gelatina pancreática, 1 g glucosa, 5.0 g cloruro de sodio, 2.0 g de fosfato monopotásico, 0.012 g rojo de fenol, 20.0 g urea y 15 g agar, la urea se filtró por una membrana de 25 mm de diámetro con denominación de poro de 0.22 μm . La reacción en este medio es el resultado de la hidrólisis de la urea por la enzima ureasa liberándose amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio de cultivo haciendo virar el indicador rojo de fenol del color amarillo al rojo. Todas las bacterias se inocularon al centro de la placa de Petri y se

incubaron a temperatura ambiente. Se consideraron positivas productoras de la enzima ureasa a aquellas cepas que mostraron un halo de color rosa intenso alrededor de la colonia.

7.4.2. ENSAYO DE PRECIPITACIÓN DE CARBONATO DE CALCIO

Para el ensayo de precipitación de cristales, se utilizó el medio B4 que contiene (por litro) 2.5 g de acetato de calcio, 4.0 g de extracto de levadura, 10 g de glucosa, y 18 g de agar, y se ajustó a un pH de 8.0 (Cacchio y Del Gallo, 2019); además se evaluó la precipitación en el medio AEMC. Posteriormente, las cepas que presentaron una mayor cantidad de precipitación de cristales de CaCO_3 se evaluaron en el medio CCP (por litro, 20 g de urea, 2,12 g NaHCO_3 , 10 g NH_4Cl , 3 g de caldo nutritivo, 30mM CaCl_2 , 20 g de agar), ajustado a un pH de 8.5, (Wei et al., 2015).

Las bacterias se inocularon por estria en las placas de Petri con los diferentes medios (B4, AEMC y CCP) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días. Las placas se revisaron a los 7 y 15 días de crecimiento bajo el microscopio óptico. Se consideraron positivas cuando se observó la formación de los cristales o productos biogénicos en la superficie y/o alrededor de las colonias (Jroundi et al., 2017). Los diferentes tipos de cristales y su abundancia se documentaron, y las cepas con mayor producción de biogénicos se caracterizaron por Difracción de rayos X (DRX).

7.5. ENSAYO DE BIOCONSOLIDACIÓN EN ARENA Y SASCAB

Las cepas más bioactivas, es decir, aquellas con una mayor precipitación y capacidad para sintetizar diferentes tipos de cristales de carbonato en los medios de cultivo evaluados, se sometieron a un ensayo de bioconsolidación. Para ello se inocularon en los medios líquidos CCP, y el medio M-3P (10 g Bacto Casitone, 10 g $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 g $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ en tampón fosfato 10 mM, por litro, a pH 8) (Jroundi et al., 2017) (Fig. 10a), y se incubaron en agitación constante a 120 rpm por 24 h a temperatura ambiente, pasado el tiempo se vertió homogéneamente el líquido (15 mL por caja) en diferentes placas de Petri (100×15mm) que contenían por un lado 7 g de arena, y otro tanto 7 g de sascab cuidadosamente distribuidos en la superficie (Fig. 10b), y se dejaron en reposo y oscuridad durante 25 días (Fig. 10c), cada ensayo se realizó por triplicado.

El mismo ensayo se realizó con el medio líquido B4 modificado (B4M) que contenía (por litro) 5 g de acetato de calcio, 1 g de extracto de levadura, 1 g de glucosa y ajustado a pH 8 (Zamarreño et al., 2009). Las bacterias se ajustaron en espectrofotómetro a 10^7 UFC/mL sin realizar un precultivo de 24 h, y una vez vertidas en el medio B4M, las placas Petri se incubaron a la luz durante 25 días (Cacchio y Del Gallo, 2019).

En ambas técnicas se utilizó como control, el medio líquido sin bacteria, y como control positivo *Lysinibacillus fusiformis*, una especie reportada como agente consolidante. Se consideraron positivas a la bioconsolidación, aquellas cepas en las que la arena o el sascab haya logrado compactarse. Se hicieron análisis de DRX y dureza superficial a las cepas con los mejores resultados bioconsolidantes.

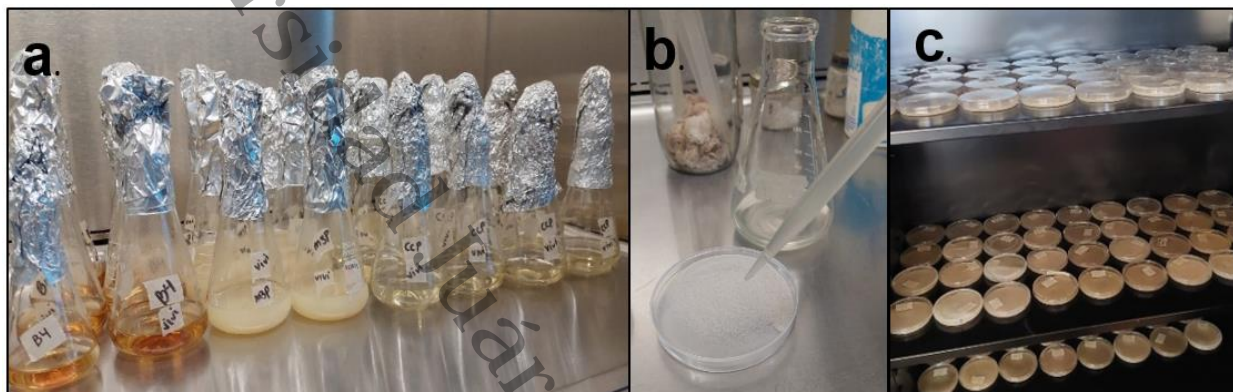


Figura 10. Ensayo de bioconsolidación en arena y sascab **a)** Medios de cultivo inoculados con bacterias **b)** Vertido homogéneo de medios en placas Petri con arena o sascab **c)** Bioensayo en reposo y oscuridad.

7.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO

Las mejores cepas de bacterias carbonatogénicas se inocularon en medio líquido M-3P durante 7 días, transcurrido el tiempo, el CaCO_3 producido por las bacterias se recolectó por filtración en membrana. El filtro con los cristales o productos biogénicos se secó a 60°C por 4 h. Los cristales o productos se colectaron y se lavaron con alcohol al 70%. Las fases de los cristales se analizaron por DRX, con un difractómetro D8 Advanced (Bruker AXS), utilizando el detector LynxEye con radiación de Cu Ka a una longitud de 1.5418 \AA . Los difractogramas se obtuvieron en un intervalo de 10° a 90° , a un ángulo de 2θ con un incremento de $0.02/\text{S}$. El CaCO_3 se determinó en los puntos máximos del plano (112) (Wei et al., 2015).

La morfología y el tamaño de los cristales en los distintos medios se analizó por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), (HR-SEM, JEOL JSM-7600F, JEOL Ltd, Tokyo, Japan). Fragmentos de agar con cristales de CaCO_3 se fijaron al porta-muestra y se metalizaron con un baño de oro/paladio. El equipo operó a 10 kV, y las micrografías se obtuvieron a 1000 y 5000 X aumentos.

7.7. IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS

7.7.1. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA

Para la secuenciación del genoma completo, los aislados recuperados se cultivaron durante 24 h en TSB a 37°C, y el ADN genómico se extrajo utilizando un kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, México) siguiendo las instrucciones del fabricante, y la calidad de ADN extraído se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para las reacciones de secuenciación, el ADN genómico de cada aislado se cuantificó con un fluorómetro Qubit™ 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), ajustado a 0.2 ng/μL, y se utilizó una alícuota de 1 ng para preparar bibliotecas de ADN genómico con el kit de preparación de bibliotecas de ADN Nextera XT (Illumina Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Posteriormente, las bibliotecas genómicas preparadas a partir de los aislamientos se secuenciaron utilizando un MiSeq™ Reagent Kit v2 (formato de 300 ciclos) para obtener 2 × 150 pb de lecturas paired-end con un MiSeq™ System (Illumina, Inc.) en el Earlham Institute (Norwich Research Park, Norwich, Reino Unido) o un MiniSeq™ System (Illumina, Inc.) en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Antes del ensamblaje del genoma, se utilizó fastp 0.20.1 para evaluar y filtrar la calidad de las secuencias genómicas y asegurar la eliminación de las secuencias adaptadoras recortadas del extremo 30 de las lecturas. Los pipelines de ensamblaje del genoma A5-miseq y SPAdes v3.13.0. Se utilizaron con parámetros predeterminados para ensamblar los genomas de los aislamientos secuenciados por los sistemas MiSeq™ y MiniSeq™, respectivamente (González-López et al. 2022).

7.7.2. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS SECUENCIAS.

Para evaluar la calidad de las lecturas obtenidas, se utilizó FastQC (Andrews, 2010). Posteriormente, las secuencias fueron ensambladas y su calidad fue verificada con QUAST v5.2.0 (Gurevich et al., 2013), que permitió evaluar métricas como número total de contigs, tamaño del ensamblaje, N50 y L50, tamaño del contig más largo y porcentaje de GC.

Para determinar la completitud y contaminación de los genomas ensamblados, se utilizó CheckM v1.0.18 (Parks et al., 2015) a través de la plataforma KBase.

7.7.3. ENSAMBLAJE DE GENOMAS Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD.

Las secuencias filtradas fueron ensambladas utilizando Minia v3.2.5 una herramienta optimizada para datasets de tamaño medio y grande. Se probaron diferentes tamaños de k-mer hasta encontrar el que generara el menor número de contigs y el mejor tamaño de ensamblaje. Para cada ensamblaje, QUAST v5.2.0 (Gurevich et al., 2013) se utilizó para calcular métricas de

calidad y CheckM v1.0.18 (Parks et al., 2015) para evaluar el porcentaje de completitud y contaminación de cada genoma ensamblado.

7.7.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para la inferencia filogenética, se llevó a cabo un análisis taxonómico mediante el servidor Type (Strain) Genome Server (TYGS) (Meier-Kolthoff & Göker, 2019), comparando los genomas obtenidos con una base de datos de cepas tipo para determinar su proximidad filogenética preliminar con especies descritas. Se generaron árboles filogenéticos utilizando el método de hibridación digital ADN-ADN (digital DNA-DNA hybridization, dDDH), permitiendo evaluar las relaciones evolutivas de las cepas estudiadas. El árbol obtenido fue editado en la plataforma Interactive Tree of Life (iTOL), añadiendo etiquetas y formatos para resaltar la posición de las muestras en comparación con especies cercanas. Finalmente, se calcularon los valores de dDDH y ANI (Average Nucleotide Identity) con especies filogenéticamente próximas, determinando si las cepas analizadas corresponden a especies previamente descritas o a posibles nuevas especies.

7.8. BIOENSAYO EN LITOTIPO CONCHUELA

Debido a la amplia variedad de bacterias bioactivas aisladas, y considerando que el comportamiento de los microorganismos puede variar significativamente según el sustrato en el que son inoculados. Se realizaron ensayos preliminares en probetas de roca caliza para seleccionar las dos mejores cepas para la aplicación del biotratamiento consolidante en los dos sitios arqueológicos. Se utilizaron los medios de cultivo líquido B4M y M-3P para inocular las bacterias en probetas de litotipo conchuela por aspersion y analizar los cambios positivos (biocementación) en la roca en un periodo de 21 días. El bioensayo se realizó con las cepas que mostraron mejor crecimiento y mayor precipitación de cristales en los medios de cultivo, así como mejores resultados en el ensayo de bioconsolidación en arena y sascab.

Se utilizaron probetas de conchuela de 2.5 × 1.5 cm × 2 mm de grosor, por cada una de las nueve cepas a analizar, asperjando en una probeta cada cepa suspendida en el medio B4M, y en la segunda probeta con el medio M-3P. Las bacterias se ajustaron a 8.2×10^8 CFU/mL en espectrofotómetro siguiendo la técnica de Jroundi et al. (2017), como control se utilizaron probetas asperjadas con los medios de cultivo sin bacteria.

Antes del bioensayo se realizó un mapeo fotográfico al estereoscopio de cada una de las probetas para analizar los cambios en la roca después de las aspersiones bacterianas (Fig. 11a), y para eliminar la carga microbiana, las rocas se expusieron a luz UV durante 24 h y se esterilizaron tres veces en autoclave. Después bajo condiciones de esterilidad se sujetaron a un bastidor y se asperjaron con los diferentes tratamientos (Fig. 11b) cada 12 h durante 6 días, con el fin de lograr un proceso de colonización y adaptación de las bacterias sobre las rocas. El bioensayo se realizó al exterior, a una temperatura ambiental promedio de 28°C en Villahermosa, Tabasco.



Figura 11. Bioensayo en conchuela. **a)** Toma de fotografías del litotipo focalizando los detalles de los poros. **b)** Aspersión del medio bacteriano en los litotipos.

7.9. APLICACIÓN DEL BIOTRATAMIENTO *IN SITU*, LITOTIPO CHICHÉN ITZÁ

Después del análisis de los resultados, se seleccionaron dos cepas para la exposición en las probetas de roca caliza en los sitios arqueológicos de Oxpeñul y Chichén Itzá. El ensayo se realizó por quintuplicado en probetas del litotipo Chichén Itzá, y se aplicaron cinco tratamientos diferentes: Las bacterias ajustadas (8.2×10^8 UFC/mL) y suspendida en el medio de cultivo líquido M-3P, siguiendo la técnica propuesta por Jroundi et al. (2017), las bacterias ajustadas (8.2×10^8 UFC/mL) y suspendidas en un medio oligotrófico (TSB diluido al 10% con agua destilada estéril). Y como controles, el medio líquido M-3P estéril sin bacteria, el medio líquido TSB diluido estéril sin bacteria, y como agente químico consolidante se utilizaron nanopartícula de doble hidróxido de calcio y zinc ($\text{CaZn}_2(\text{OH})_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$, (CZ). Las probetas tratadas se fijaron a un panel y se expusieron a condiciones naturales en los sitios, por un período de 6 meses (Fig. 12).

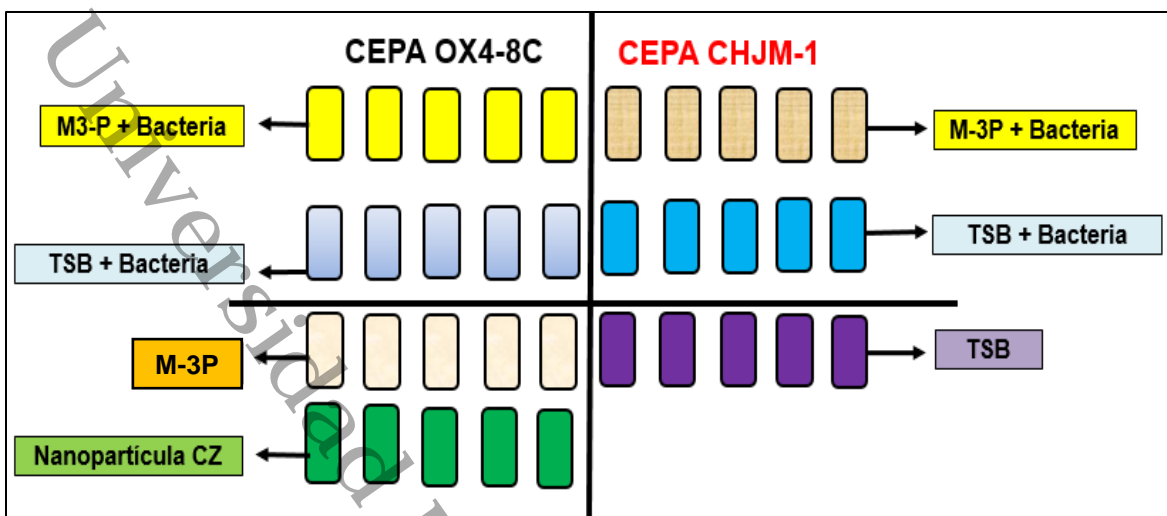


Figura 12. Disposición de los tratamientos aplicados a las probetas, incluyendo los controles correspondientes.

7.9.1. PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE PROBETAS CHICHÉN ITZÁ

A cada probeta se le asignó un código, y se pesaron para dar seguimiento al aumento o pérdida de masa en el tiempo. Se tomaron fotografías detalladas en el estereoscopio (Fig. 13) para analizar el proceso de biomineralización después de los 6 meses de exposición *in situ*. De igual manera se realizó el análisis de parámetros cromáticos usando un espectrofotómetro Konica Minolta CM-700d para comparar los cambios de color en el material.

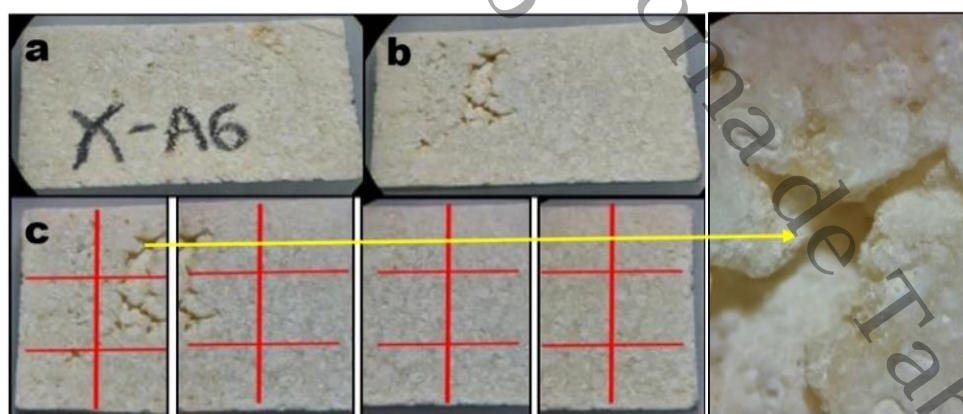


Figura 13. Fotografías al estereoscopio de las probetas litotipo Chichén Itzá. **a)** Vista de la Cara posterior de la probeta identificada con el código de seguimiento, **b)** Cara frontal de la probeta donde se aplicó el tratamiento por aspersión, **c)** Detalles cercanos del litotipo; cada cuadro rojo corresponde a áreas específicas que fueron fotografiadas individualmente para resaltar zonas de mayor porosidad, como se indica con la flecha.

Para eliminar la carga microbiana natural o adquirida durante el proceso, las rocas fueron expuestas a luz UV durante 24 h y esterilizadas tres veces en autoclave, y después bajo condiciones de esterilidad se fijaron a los bastidores y se asperjaron con los diferentes tratamientos cada 12 h durante 6 días (Fig. 14 y 15), con el fin de que la cepa bacteriana colonizará apropiadamente a la roca y para aclimatarse a las condiciones del sitio. Después de cada aspersión, los bastidores se expusieron de forma horizontal para la correcta penetración del medio en las probetas y evitar contaminación entre tratamientos. El cultivo para ambas cepas se reactivó al tercer día del tratamiento con el fin de mantener a las bacterias activas metabólicamente, y se verificó su viabilidad y pureza al tercer día y finalizada la aplicación. Pasados los seis días de aspersión, los bastidores se instalaron en el sitio arqueológico de Oxpemul y en el de Chichén Itzá (Fig. 16) orientados hacia al norte y con una inclinación de 45°.



Figura 14. Preparación del bioensayo **a)** Exposición a rayos UV de litotipos para asegurar esterilidad **b)** Litotipos instalados en el bastidor **c)** Aspersores conteniendo los diferentes tratamientos.



Figura 15. Aplicación del tratamiento **a)** Aspersión en el laboratorio **b)** Última aspersión en el sitio arqueológico de Oxpemul **c)** Última aspersión en el sitio arqueológico de Chichén Itzá.



Figura 16. Instalación de los bastidores. **a)** Exposición en el sitio arqueológico de Oxpepul **b)** Exposición en el sitio arqueológico de Chichén Itzá.

7.10. ANÁLISIS QUÍMICOS Y FÍSICO-MECÁNICOS

Los análisis químicos y físico-mecánicos de las probetas se realizaron en el Laboratorio Nacional de Ciencias para la investigación y conservación del patrimonio cultural / Centro de Investigación en Corrosión (LANCIC - CICORR) de la Universidad Autónoma de Campeche (UACAM).

7.10.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se realizó con el objetivo de determinar la actividad biomineralizante de las cepas bacterianas y caracterizar la bioconsolidación en la roca. Esta técnica permite la observación de materiales heterogéneos, ya sean de origen orgánico o inorgánico, a escalas micro o nanométricas. Las observaciones se realizaron en un equipo FlexSEM 1000 Hitachi, a un voltaje de 15 kV y con una apertura de 30 (Fig. 17a).

7.10.2. DUREZA SUPERFICIAL

La dureza superficial se midió generando un impacto en la superficie del material que, aunque puede causar microfisuras, permite determinar la dureza en materiales. Para ello se utilizó el EQUOTIP 550 LEEB (PROCEQ) (Fig. 17b), que funciona con el método dinámico o de rebote, con un estándar de 762 leeb, realizándose un total de tres mediciones por placa Petri en las zonas de las muestras que se observaron consolidadas, se obtuvo un promedio total de la dureza superficial por cada triplicado. Las mediciones se realizaron sobre la superficie de plástico de la caja de Petri, apoyada sobre el estándar metálico de dureza. En el caso del litotipo Chichen Itzá de la exposición *in situ* se hizo una medición por probeta. Durante el ensayo se impactó la superficie de medición con un cuerpo que contiene un imán 45 permanente y una esfera

indentadora formada por una bola de carburo de tungsteno de 3 mm de diámetro. La velocidad de impacto y el rebote se calcularon mediante la medición del voltaje de inducción generado por el imán en movimiento a través de una bobina de inducción.

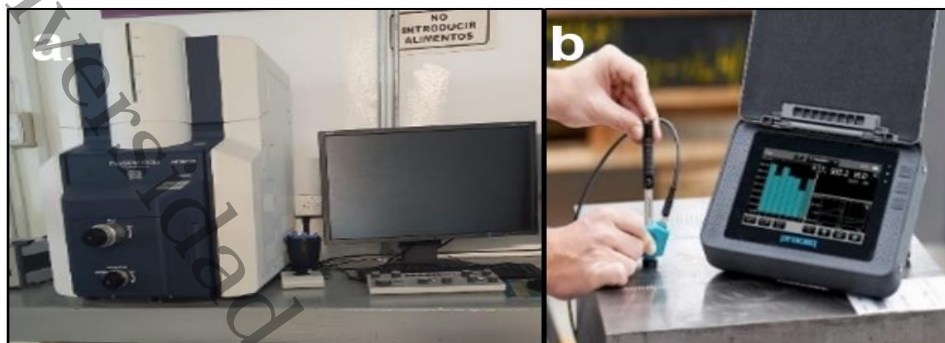


Figura 17. Equipos LANCIC- CICORR **a)** Microscopio electrónico de barrido (SEM - FlexSEM 1000 Hitachi) **b)** Durómetro.

7.10.3. PARÁMETROS CROMÁTICOS (COLOR)

Para determinar los parámetros y el impacto de los cambios de color, se utilizó un espectrofotómetro Minolta CM-700d/600D, que examinó los parámetros cromáticos de la superficie de un material L^* , a^* , b^* , WI (índice de blanco), y YI (índice de amarillo) siguiendo la norma ASTM 313-76 (ASTM, 2000). El número de medidas sobre cada probeta se determinó por el tamaño de las probetas (2 disparos en la parte superior de la cara donde se aplicó el tratamiento). Cada vez que se produce un disparo sobre la superficie pétreo el espectrofotómetro dispara un haz de luz y toma los datos en ese punto de medida. Este ensayo nos indica cuantitativamente con el programa informático-aplicación SpectraMagic NX el color de los materiales, incluyendo las coordenadas e índices cromáticos (Soria-Castro, 2019).

Se tomaron mediciones en dos puntos diferentes para abarcar más superficie de la roca. La diferencia visual (ΔE^*) y la diferencia cromática total (ΔC^*) se estimaron con las siguientes fórmulas:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \Delta C^* = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

La diferencia visual de color (ΔE^*) es una contribución de los tres atributos perceptuales de color, tono, luminosidad y croma, mientras que la diferencia total de color (ΔC^*) se refiere a la profundidad, la pureza y la saturación del color.

7.10.4. RUGOSIDAD

La rugosidad o textura primaria, está formada por surcos o marcas ocasionadas por los agentes que atacan la superficie, en este estudio se realizaron pruebas mecánicas de rugosidad con un

rugosímetro Surtronic Duo (Fig. 18a), que mide múltiples parámetros de rugosidad (R_a , R_z , R_p , R_v , R_t , R_q , R_{sk} , R_{ku} y R_{z1}). Las mediciones se hicieron en tres puntos diferentes de las probetas y se sacó un promedio de rugosidad usando el valor R_a (Rugosidad media aritmética), y que está definido como la media aritmética de los valores absolutos de las coordenadas de los puntos del perfil de rugosidad con relación a la Línea Media dentro de la longitud de medición (L_m). La medida del valor R_a es expresada en μm . Antes de las mediciones, el instrumento fue calibrado con un patrón estándar provisto por el fabricante.

7.10.5. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).

El espectro infrarrojo de un microorganismo es considerado una huella dactilar, el mismo es el resultado de la absorción de todos los modos vibracionales de las moléculas que componen la célula (ADN, ARN, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, componentes de membrana y pared celular) (Nieto et al., 2004), por tanto se determinaron las bandas vibracionales, correspondientes a los grupos funcionales sobre la superficie rocosa, mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, en un equipo marca Alpha Bruker (Fig. 18b) con una resolución espectral de $4cm^{-1}$ y 16 barridos por minuto.

7.10.6. VELOCIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA

Se realizaron análisis por triplicado para medir la velocidad de absorción de agua sobre la superficie de las probetas de roca, para lo cual se colocaron tres gotas de agua destilada (cada gota en partes diferentes), con aproximadamente 30 seg. de diferencia y cada una se puso después de la absorción de la gota anterior (Fig. 18c), y se midió el tiempo (en segundos) de absorción, obteniendo un valor promedio para comparaciones entre tratamientos y evaluando las variaciones entre los sitios de exposición.

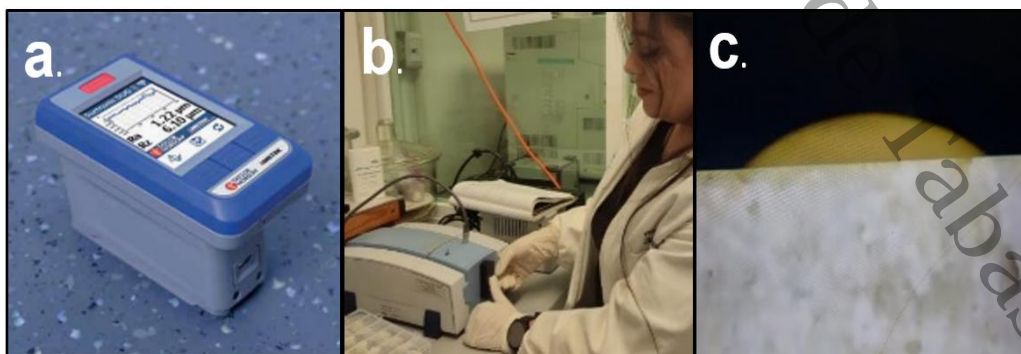


Figura 18. Equipos LANCIC- CICORR. **a)** Rugosímetro **b)** Espectroscopia infrarroja de reflexión por transformada de Fourier – FTIR. **c)** Técnica para medir la velocidad de absorción de agua.

8. RESULTADOS

8.1. AISLAMIENTO DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS

Se realizó la toma de muestras de las probetas de roca, en ocho puntos en forma de mapeo, de la cara superficial expuesta de la probeta (Fig. 19a), y los fragmentos se depositaron en placas de AEMC, (Fig. 19b). Las diferentes colonias resultantes se purificaron y se les asignaron códigos basados en el tipo de roca del que fueron aislados: CK para litotipo Calakmul, OX para litotipo Oxpemul y CH para material pétreo de Chichén Itzá, seguido del número de muestreo, y un número consecutivo de aislamiento. En los casos de la presencia de más de una bacteria aislada de un mismo punto de mapeo, se asignó la letra A, B o C al código (Fig. 19c).



Figura 19. Proceso de aislamiento de bacterias a partir de las probetas previamente expuestas **a)** Recolección de muestra directamente de la superficie de la roca, **b)** Inoculación de la muestra en medio de cultivo AEMC, **c)** Desarrollo de diferentes morfotipos bacterianos tras 7 días de incubación, destacando la cepa CK1-7B por su evidente capacidad de disolución del carbonato de calcio.

En total se obtuvieron 114 cepas bacterianas, 92 se aislaron del sitio arqueológico Oxpemul (47 del tipo de roca Calakmul y 45 del tipo de roca Oxpemul) y 22 del material pétreo de Chichén Itzá. Se realizó la descripción de las características morfológicas en observaciones al estereoscopio (color, consistencia, margen, forma y elevación de la colonia) a todas las cepas purificadas. Se observaron una gran variedad de morfotipos, la mayoría de tonalidad amarilla (35), blanca (28), rosa (22), café (19), naranja (8) y transparente (2) (Fig. 20, y 21a). Las coloraciones a su vez fueron divididas dependiendo de la intensidad, en claro, medio y oscuro, observándose una mayor presencia de tonos claros (Fig. 22) y en algunos casos, colonias con iridiscencia en presencia de luz (Fig. 21b). También se reporta pigmentación del medio del cultivo a los 15 días en 6 cepas y otras 6 que, al parecer, establecían asociaciones con otros microorganismos. Los 114 morfotipos aquí descritos, son aquellos que se mantuvieron activos a

lo largo de todo el proceso, ya que el número de aislamientos fue mayor pero algunas cepas perdieron viabilidad o mostraron resistencia a ser cultivadas en condiciones de laboratorio.

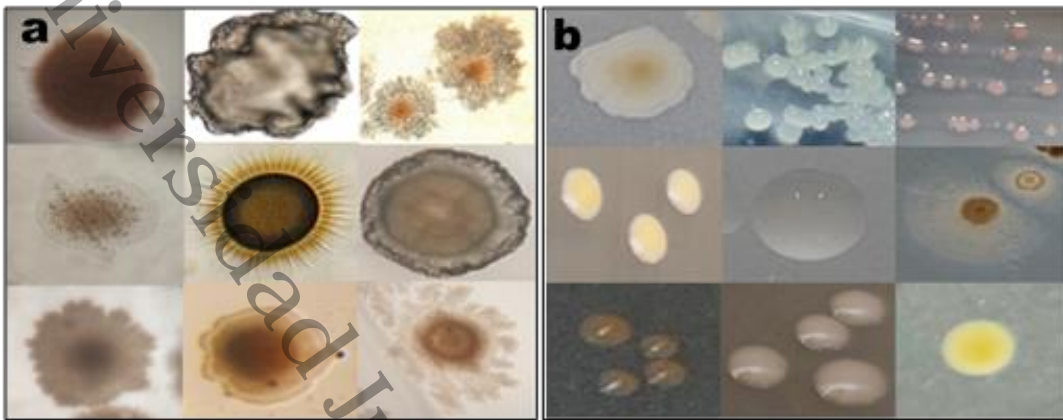


Figura 20. Detalle de morfologías coloniales bacterianas **a)** Observaciones a microscopio óptico 4x **b)** Observaciones a estereoscopio.

En cuanto a la descripción de las formas coloniales basadas en Kango (2013), del libro “Textbook of Microbiology”, se encontraron 54 colonias de forma redonda, 40 semi-redondas, y 20 irregulares, de las cuales 56 tenían un margen entero, 52 ondulado, 5 filamentosos y 1 actino con margen radiante. También se observó que la mayoría de las colonias eran planas (95), elevadas (11) y convexas (8), algunas grandes (4), medianas (66) y pequeñas (44) y de consistencia cremosa (64), semi-cremosa (32), dura (3), arenosa (2) y mucosa (13); y que algunas presentaban un anillo interior. Todas las descripciones coloniales se hicieron al estereoscopio a los 15 días de crecimiento colonial, ya que ciertas tonalidades y formas se reflejan diferente al microscopio óptico (Fig. 20a) y las coloraciones y algunas formas coloniales van cambiando a lo largo del tiempo. Es importante destacar que, aunque se aisló un menor número de cepas del sitio arqueológico Chichén Itzá, la diversidad morfológica de las cepas de este lugar fue significativa. Por último, se realizó un análisis de la disolución de carbonato de calcio, mediante la evaluación de la pérdida de opacidad o el aumento de transparencia del medio de cultivo (Fig. 23). Este análisis permitió clasificar las cepas según su capacidad de disolver el CaCO_3 y/o inducir la síntesis de cristales como producto del metabolismo microbiano. Los resultados indicaron que 37 cepas presentaron una disolución alta, 34 cepas una disolución media y 43 cepas una disolución baja.

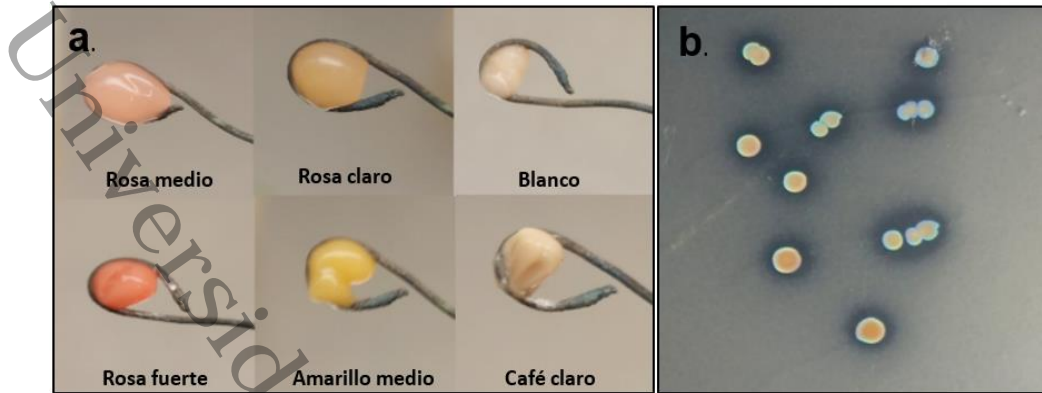


Figura 21. Diversidad de la biomasa bacteriana aislada **a)** Detalle de la diversidad de colores indicado la producción de diferentes tipos de pigmentos **b)** Detalle de bacteria iridiscente, mostrando variaciones de color reflejado bajo la luz.

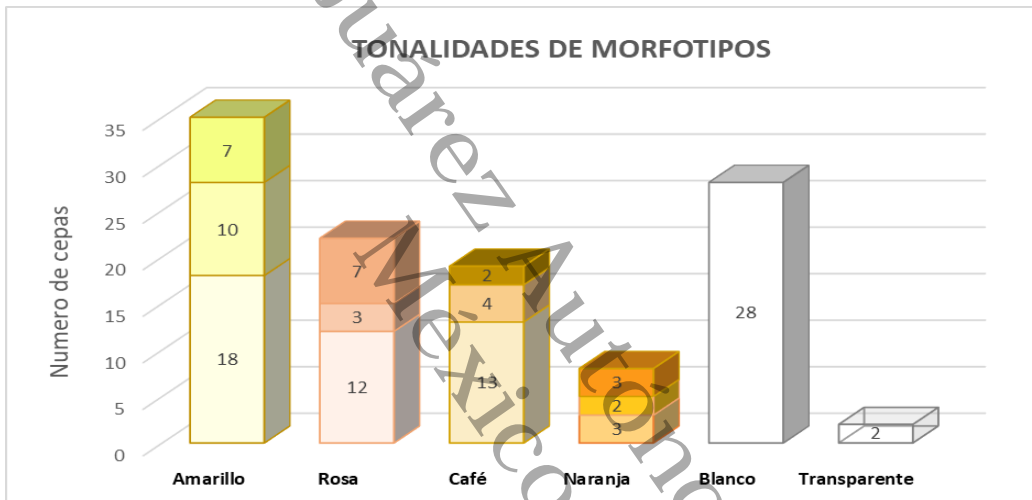


Figura 22. Diferentes tonalidades de 114 colonias bacterianas. En las bases los colores claros, en el medio los intermedios y en la cima los colores oscuros.

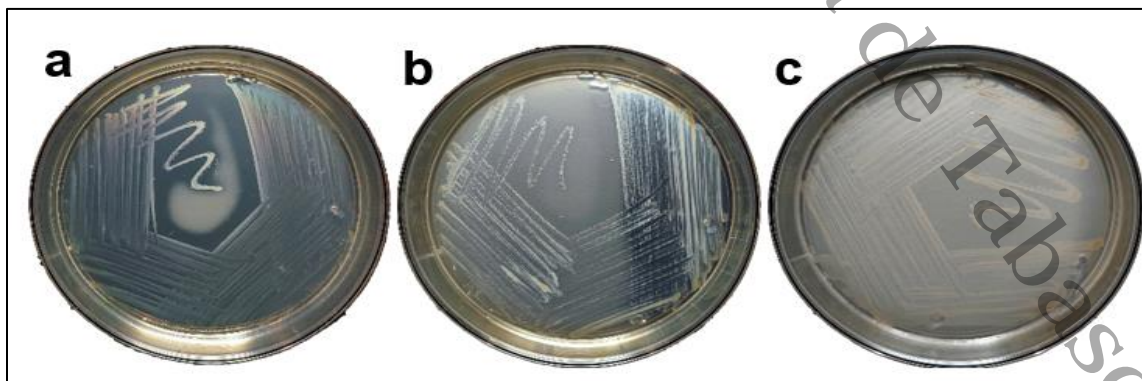


Figura 23. Disolución de carbonato de calcio en el medio AEMC, se puede apreciar la pérdida de opacidad o el aumento de transparencia en ciertas zonas **a)** disolución alta **b)** disolución media y **c)** disolución baja.

8.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD UREOLÍTICA:

Después de someter todas las cepas a la prueba de ureasa, se registraron 83 cepas ureasa positiva, 71 de Oxpemul (34 del litotipo Calakmul y 37 del litotipo Oxpemul), y 12 cepas del material pétreo de Chichén Itzá; esta reacción positiva se reveló por un cambio de color en el medio, pasando éste de amarillo a rosa intenso (fucsia), debido al uso de la urea por parte de las bacterias que producen la enzima ureasa, como resultado de la hidrólisis de la urea, se libera CO_2 y el amoníaco producido basifica el medio, proporcionando el cambio de color (Fig. 24).

El tiempo de cambio de color y la intensidad sugiere que tan activa es la producción de la enzima. En ese sentido, la actividad de la enzima fue diferente en las cepas, algunas tuvieron una reacción rápida a las 24 h y otras hasta las 48 h, así como la intensidad del color del medio fue variable, por lo que, dependiendo del tiempo y la intensidad, se dividió la actividad en positiva fuerte (+f) para aquellas que tuvieron una reacción rápida e intensa, positiva media (+m) para aquellas que mostraron una actividad rápida pero no tan intensa o una actividad intensa pero no tan rápida y positiva débil (+d) para aquellas que obtuvieron una actividad lenta y poco intensa (Fig. 24 y 25).

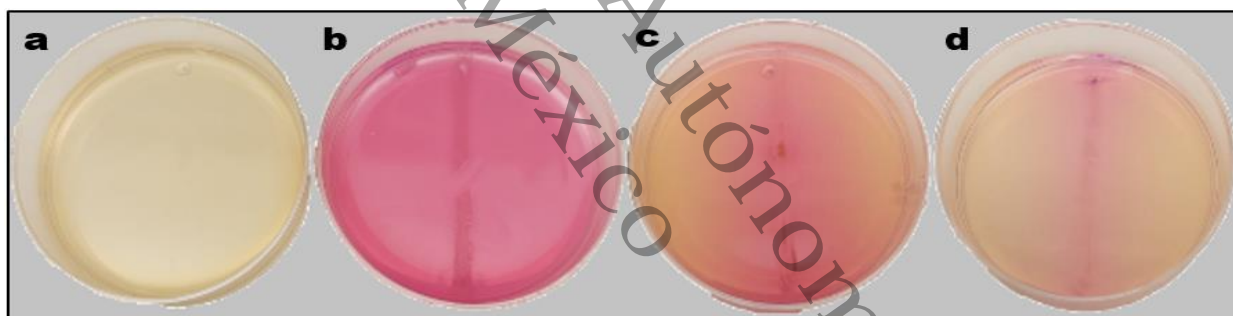


Figura 24. Actividad Ureolítica de las cepas aisladas. **a)** Control, **b)** ureasa positiva fuerte (+ f), **c)** ureasa positiva media (+ m), **d)** ureasa positiva débil (+ d).

Por otra parte, 31 aislamientos no mostraron cambio de color, 21 de Oxpemul (13 del litotipo Calakmul y 8 del litotipo Oxpemul), y 10 cepas de Chichén Itzá, por lo que estas bacterias no utilizan la urea para catalizar la reacción que terminará en la producción de carbonato de calcio, así que probablemente hacen uso de otra ruta metabólica con diferente sustrato para desencadenar el proceso. Aunque de manera global, y considerando el número de cepas aisladas por cada sitio arqueológico (mayor aislamiento de Oxpemul que de Chichén Itzá), se puede encontrar un porcentaje más alto de ureasas positivas en las bacterias aisladas del sitio

arqueológico de Oxpepul (77.1%) en comparación con el sitio arqueológico de Chichén Itzá (54.5%).

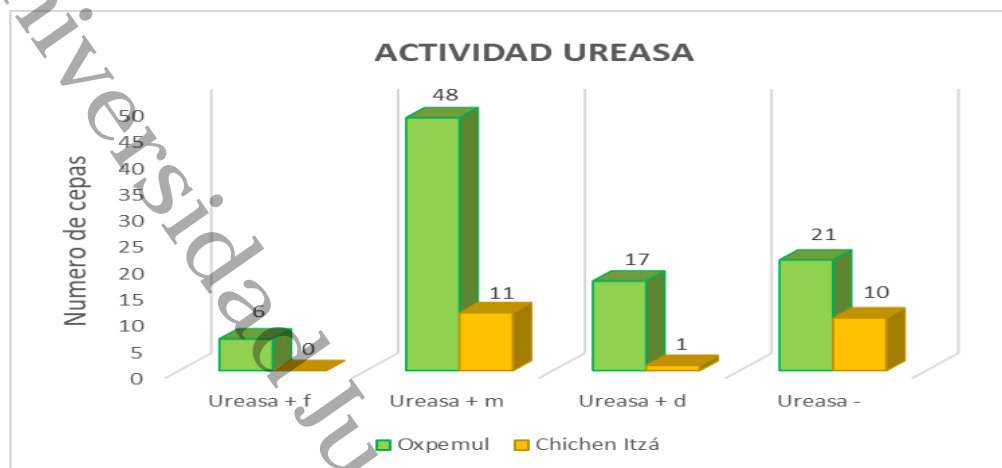


Figura 25. Actividad ureasa de las cepas aisladas. Clasificación de la actividad según la intensidad observada: positiva fuerte (+ f), positiva media (+ m), positiva débil (+ d) y, ureasa negativa (-).

8.3. ENSAYO DE PRECIPITACIÓN BIOGÉNICA DE CARBONATO DE CALCIO

8.3.1 PRECIPITACIÓN EN AEMC

La precipitación de CaCO_3 inducida por bacterias dio como resultado la producción de diferentes formas cristalinas resultado de su disolución. Estos fueron observados en el medio AEMC al microscopio óptico 10X después de los 15 y 30 días de incubación, notando biomineralización a partir del día 15. En total, se documentaron 83 cepas capaces de producir cristales en medio oligotrófico con diferentes formas cristalinas (Fig. 26).

La mayoría de las cepas (72) producen cristales con forma alargada (Al), 15 con forma cuadrada (Cd), 5 con forma de aguja (Ag), 2 en escobilla (Es) y 1 con forma hexagonal (Hx), (Fig. 26 y 27a), y en algunos casos (más allá del día 15) se observaron carbonato de calcio amorfo biogénico, que podrían deberse a la re-precipitación de los cristales. Se determinó, también la intensidad de producción de cristales biogénicos en baja, media y alta (Fig. 27b).

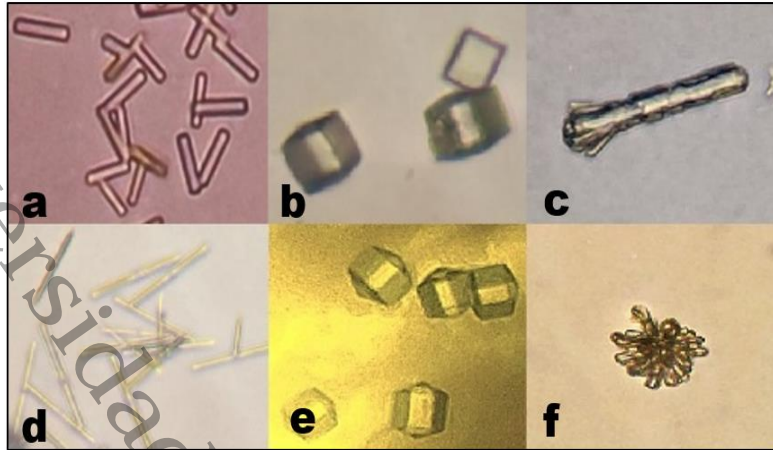


Figura 26. Morfologías cristalinas observadas en medio AEMC. **a)** Alargado (primática) (Al), **b)** Cuadrado (romboédrica o cúbica) (Cd), **c)** Escobilla o dendrítica (Es), **d)** Aguja (Ag), **e)** Hexagonal (Hx) y **f)** Amorfo.

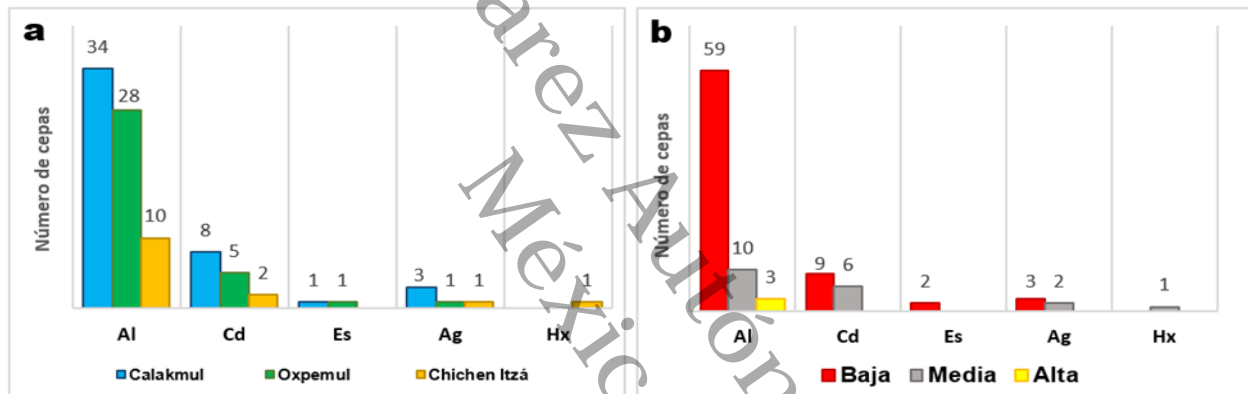


Figura 27. Tipos de cristales en AEMC a los 15 días de crecimiento bacteriano. **a)** forma de cristales y su prevalencia por sitio de muestreo y tipo de litotipo **b)** Abundancia del tipo de cristal.

Como se observa en la figura 27a, se registró una mayor cantidad de cristales de tipo alargado, pero la abundancia de estos fue significativa únicamente en 13 cepas a los 15 días de crecimiento (Fig. 27b); aunque se notó que el tamaño y la abundancia de este tipo de cristales aumentó con los días, observándose algunas particularidades a partir del día 30 (Fig. 28). Además, algunas cepas (24) produjeron simultáneamente dos o tres formas cristalinas. En resumen, 18 aislamientos (6 del litotipo Calakmul, 8 del litotipo Oxpemul y 4 de Chichén Itzá) mostraron mejor desempeño al presentar una abundante producción a los 15 días, manteniéndose o incrementando con el tiempo, por lo que fueron consideradas como las mejores para la producción de cristales bajo condiciones oligotróficas (Tabla 1).

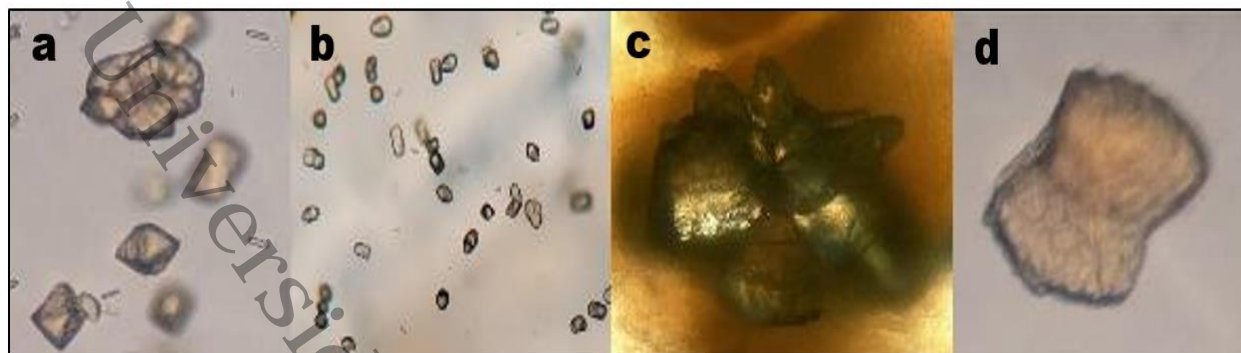


Figura 28. Formación de biolitos o productos biogénicos en AEMC a partir del día 30. **a)** cepa CK2-8B **b)** cepa CHL5-2 **c)** cepa CK1-2 y **d)** cepa CK1-1.

Tabla 1. Cepas con la mejor producción de cristales en el medio AEMC

Clave Cepas	Forma del cristal	Polimorfo posible	Días		Clave Cepas	Forma del cristal	Polimorfo posible	Días	
			15	30				15	30
CK1-5A	Alargado	Aragonita	+	+	CK1-8A	Alargado	Aragonita	+	+
	Cuadrado	Calcita	++	+++		Cuadrado	Calcita	++	++
CK1-7B	Alargado	Aragonita	+	+++	CHGM1-6	Alargado	Aragonita	++	++
	Cuadrado	Calcita	++	++		Cuadrado	Calcita	++	++
	Amorfo	Precursor de Calcita/ Vaterita	-	+		Amorfo	Precursor de Calcita/ Vaterita		+
OX1-1	Alargado	Aragonita	++	++	OX2-2	Alargado	Aragonita	+++	+++
	Cuadrado	Calcita	+	+		Cuadrado	Calcita	+	+
OX2-1	Alargado	Aragonita	++	+++	CK4-5	Alargado	Aragonita	++	++
	Amorfo	Precursor de Calcita/Vaterita	+	++		Aguja	Vaterita/ Aragonita	++	++
OX4-3A	Alargado	Aragonita	++	+++	OX4-5B	Alargado	Aragonita	++	++
OX6-3B	Alargado	Aragonita	++	+++	OX5-6B	Alargado	Aragonita	++	++
CK6-2B	Alargado	Aragonita	++	+++	OX2-3	Alargado	Aragonita	+++	+++
CK5-4	Alargado	Aragonita	++	++	CHL4-1	Alargado	Aragonita	++	++
CHGM7-3	Aguja	Vaterita/ Aragonita	++	+++	CHJM-1	Hexagonal	Vaterita	+++	+++

+) producción baja, ++) producción media, +++)) producción alta.

8.3.2. PRODUCCIÓN DE CRISTALES EN MEDIO B4

Se sembraron las 114 bacterias en el medio B4 (rico en nutrientes), y se observó mediante microscopía óptica (10X), una producción significativa de cristales en la mayoría de las cepas. A partir del día 15 se evidenció una biomineralización destacada, aunque algunas cepas, como CHJM-1, mostraron una alta producción de cristales desde las 48 h. En total, 83 cepas fueron capaces de producir cristales de carbonato de calcio o biolitos, y la mayoría lograron producir simultáneamente dos o tres tipos de formas cristalinas.

Específicamente, se identificaron las siguientes morfologías cristalina: 65 cepas sintetizaron cristales alargados (Al), 12 cuadrados (Cd), 32 rectangulares (Rt), 34 redondos (Rd), 11 Semi-redondos (Sm), 9 redondos plateados (Rp) (Fig. 29 y 30a). Adicionalmente, 10 cepas presentaron cristales con alguna particularidad (Pt) como color (negros o morados) y formas inusualmente diferentes a las observadas en AEMC (Fig. 31). La abundancia de los cristales fue clasificada en tres categorías: baja, media y alta (Fig. 30b).

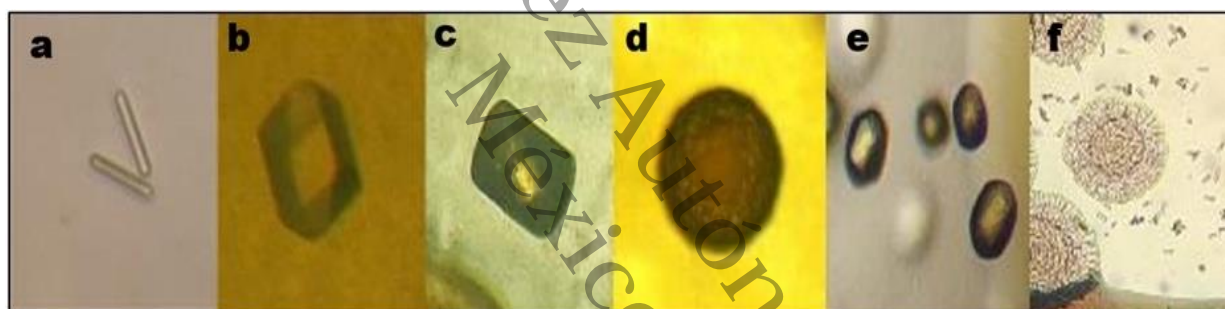


Figura 29. Diversidad morfológica de cristales y biolitos observados en el medio B4. **a)** Alargado (Al), **b)** Cuadrado (Cd), **c)** Rectangular (Rt), **d)** Redondo (Rd), **e)** Semi-redondo (Sm), **f)** Redondo plateado (Rp).

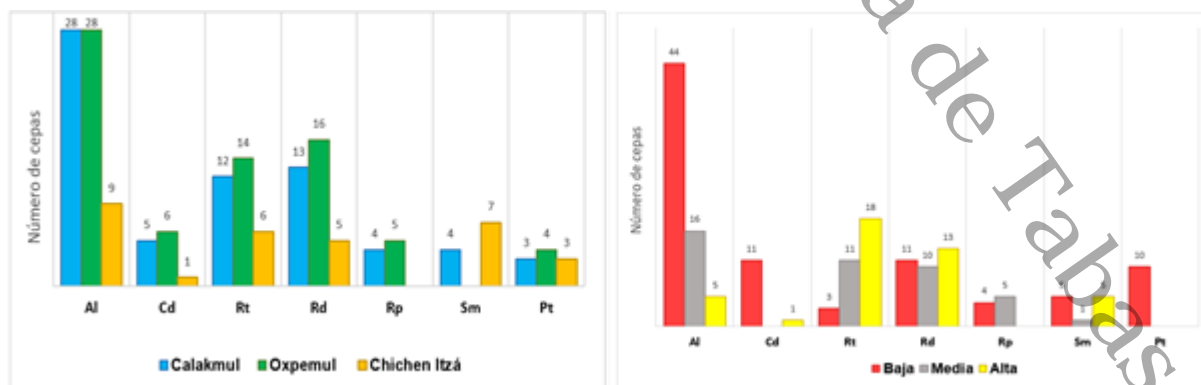


Figura 30. Tipos de cristales observado en medio B4 a los 15 días de crecimiento. **a)** Tipo de cristal por sitio arqueológico y tipo de litotipo de muestreo. **b)** Abundancia del tipo de cristal.

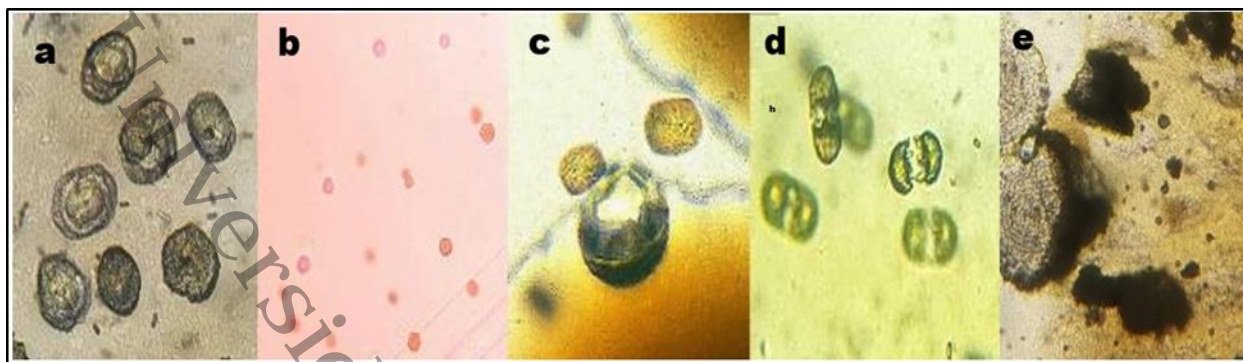


Figura 31. Particularidades morfológicas de los cristales observados en algunas cepas en B4. **a)** cepa OX5-6B, formas esféricas o semi-redondas, posible calcita **b)** CK6-7A, cristales dispersos de menor tamaño, pero sin una forma claramente definida **c)** OX6-8B, bordes redondeados y un centro más oscuro, lo que podría asociarse con cristales nucleados en crecimiento **d)** CHGM1-1, estructuras dobles o geminadas, con bordes bien definidos y redondeados, posiblemente indicando un proceso de agregación de calcita y **e)** OX4-8C, las estructuras menos regulares, con formas que combinan bordes redondeados y zonas amorfas, lo que podría sugerir una combinación de fases cristalinas y amorfas.

En algunas cepas, se observaron aglomeraciones o sitios de nucleación que favorecían el ensamblaje y crecimiento de los cristales a su alrededor (Fig. 32). En las cepas más bioactivas (OX4-8C, CHJM-1, OX1-1, CK4-1, CHGM1-1, OX4-8A, CHL5-2 y CK1-4B), se suspendieron algunos hilos estériles en el medio B4 agarizado y se observó que las bacterias lo utilizaban como sitios de nucleación y ensamblaje de cristales (Fig. 32h).

Al final de las observaciones se eligieron las mejores cepas precipitadoras de cristales de carbonato de calcio en el medio B4, considerando la cantidad de cristales producidos a los 15 días de crecimiento bacteriano, y su habilidad de establecer sitios de nucleación. En total, se escogieron 25 cepas (Tabla 2) que demostraron un mejor desempeño en medios enriquecidos. Notablemente, en el medio B4 algunas bacterias después de los 15 días de crecimiento, mostraron una alta producción de cristales observables a simple vista, como fue el caso de las cepas OX48C, CK4-1, OX48A, CK6-6 y CHGM7-2 (Fig. 33).

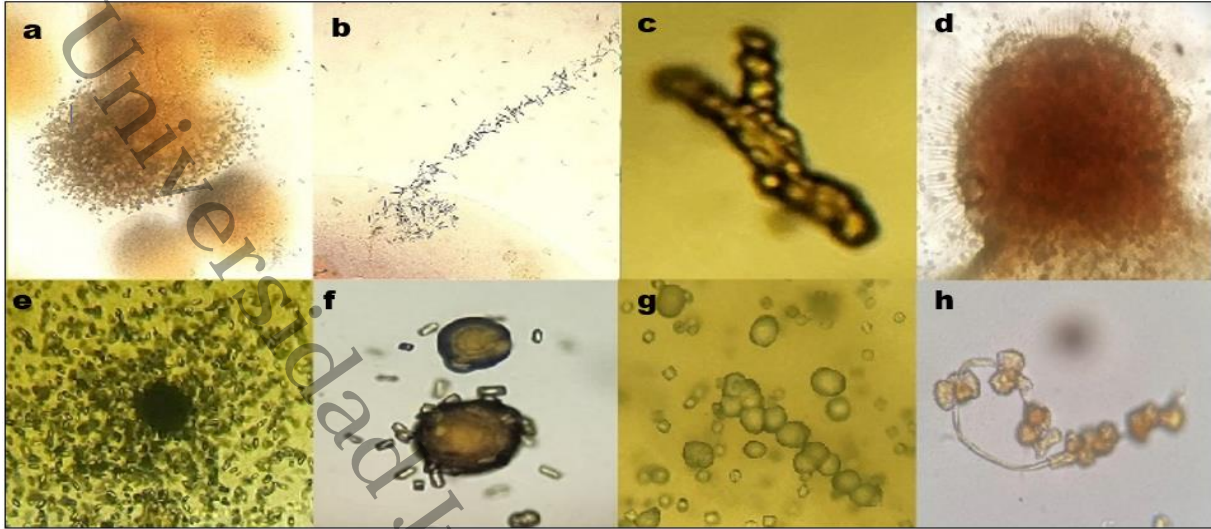


Figura 32. Diversidad de morfologías y estructuras cristalinas asociadas con cepas bacterianas biomineralizantes. Aglomeraciones o sitios de nucleación. **a)** cepa OX6-3B con agregados densos de forma irregular, asociados a sitios de nucleación activa **b)** cepa CK6-6 muestra estructuras filamentosas con crecimiento cristalino sobre cadenas bacterianas **c)** CK1-4B **d)** OX4-8A, estructuras radiales con un núcleo central oscuro, características de procesos de agregación controlada **e)** CHGM1-1, nucleación radial con alta densidad de cristales alrededor del núcleo, **f)** cepa CHGM1-4, cristales de forma redonda con bordes irregulares y nucleación secundaria **g)** cepa CHJM-1 y **h)** cepa CHL5-2, usando un objeto externo (hilo) como sitio de ensamblaje.

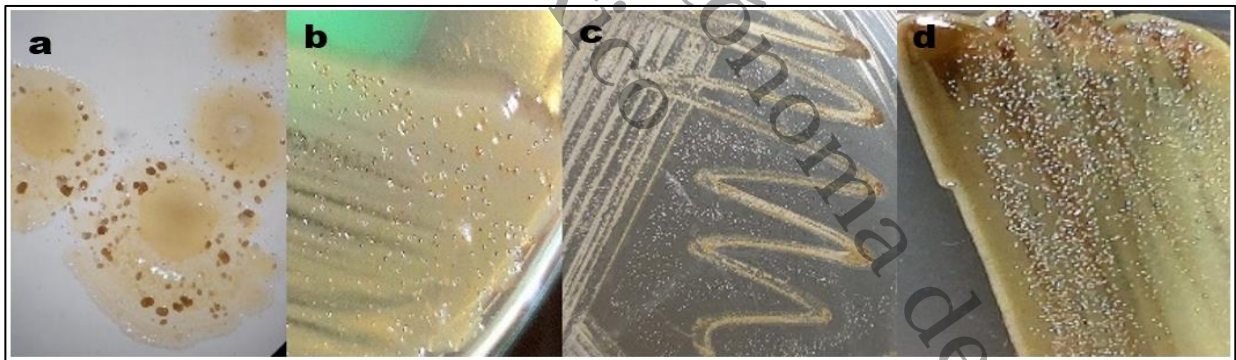


Figura 33. Cristales observados a simple vista en medio B4. **a)** cepa CHGM7-2 **b)** cepa CK4-1 **c)** cepa OX4-8C y **d)** cepa OX4-8A.

Tabla 2. Cepas con mejor desempeño en la precipitación de cristales en el medio B4

CEPA	CRISTAL	15 DÍAS	30 DÍAS	CEPA	CRISTAL	15 DÍAS	30 DÍAS
CK4-1	Rectangular	++	++	OX4-8C	Redondo	++	++
	Redondo	++	+++		Redondo plateado	++	++
	Redondo plateado	++	++		Polvo negro	++	++
	Alargado	+	+		Alargado	+	+
CHGM1-1	Rectangular	+++	+++	CHL5-1	Rectangular	+	+
	Semiredondo	+++	+++		Redondo	+	+
	Semiredondo roto	++	+++		Semiredondo	++	+++
	Alargado	+++	+++		Alargado	++	++
CK1-8A	Redondo	++	++	CK1-4B	Rectangular	+++	+++
	Redondo plateado	++	++		Redondo	+++	+++
	Alargado	+	++		Alargado	+	++
CK4-5	Rectangular	+++	+++	OX1-1	Redondo	+++	+++
	Redondo	++	+++		plateado	+	+
	Alargado	+	+		Alargado	++	++
	Cuadrado	+	+		Cuadrado	+	+
CK3-8	Redondo	+++	+++	CK6-8B	Rectangular	+++	+++
	Redondo plateado	+	+		Semiredondo	+	++
	Alargado	+	++		Alargado	+	+
OX4-4A	Redondo	+++	+++	OX5-1	Rectangular	+++	+++
	Redondo plateado	++	++		Redondo	+	+
	Alargado	++	++		Alargado	+	+
OX4-3A	Redondo	+++	+++	OX6-8B	Redondo	++	+++
	Redondo Plateado	++	++		Redondo plateado	+	+
OX4-8A	Rectangular	+++	+++	CHJM-1	Redondo	+++	+++
	Redondo	+++	+++		Hexagonal	++	++
	Alargado	+	+		Cuadrado	+++	+++
CK1-3A	Redondo	+++	+++	OX6-4B	Rectangular	+++	+++
	Alargado	++	+++		Redondo	+	+
	Cuadrado	+	+		Alargado	+	++
CHGM7-1	Rectangular	++	++	CHGM7-5	Rectangular	++	++
	Redondo	++	++		semiredondo	+	+
OX1-6	Rectangular	+++	+++	CK1-3C	Semiredondo	+++	+++
	Alargado	++	++		Alargado	+	+
CHL5-2	semiredondo	+++	+++	CHJM-3	Redondo	+++	+++
	Alargado	+	+		Alargado	+	++
CHGM1-4	Redondo	++	+++				
	Alargado	++	+++				

+) producción baja, ++) producción media, +++)) producción alta

8.3.3. PRODUCCIÓN DE CRISTALES EN CCP

Se hizo un último ensayo de precipitación en el agar CCP (con urea) utilizando las cepas que mostraron mejores resultados en AEMC (medio bajo en nutrientes) y B4 (medio alto en nutrientes). En total se evaluaron 38 cepas, de las cuales 32 no lograron crecer o mostraron resultados muy discretos, solo seis cepas obtuvieron resultados significativos: CHJM-1, OX4-8C, CK4-1, OX1-1, CHL5-2 y OX4-8A (Fig. 34). Sin embargo, la abundancia y diversidad de los cristales fue menor con comparación con los otros medios de cultivo previamente ensayados.

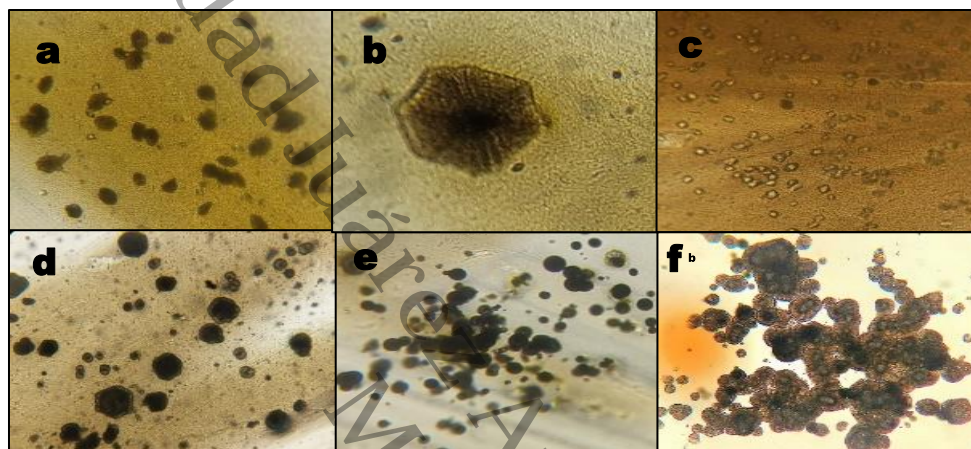


Figura 34. Cristales en CCP de las cepas **a)** CHL5-2 **b)** OX4-8A **c)** CHJM-1 **d)** OX1-1 **e)** CK4-1 y **f)** OX4-8C.

8.3.4. SELECCIÓN DE CEPAS CON MAYOR ACTIVIDAD:

Con base al desempeño de las cepas microbianas obtenido en los medios AEMC, CCP y B4 (buena producción de cristales o productos biogénicos), se eligieron 22 cepas (15 de Oxpemul y 7 de Chichén Itzá). Se escogieron aquellas que mostraron buena actividad biomineralizante en los tres medios de cultivo o en al menos dos medios, además se tomó en cuenta la capacidad de crecer adecuadamente, pues algunas cepas fueron perdiendo viabilidad o requirieron tiempos prolongados de crecimiento, y algunas mostraron buenos resultados iniciales pero por medio de observaciones detalladas y tinción de Gram, se determinó que estaban en asociación con otro microorganismo, como fue el caso de las cepas CK4-5, CK1-7A, CK5-7 y CHGM7-3, y se dificultó su purificación; también se descartaron algunos aislados por ser cepas repetidas morfológicamente en los medios de subcultivos (aunque aisladas de diferentes litotipos y sitio de muestreo).

En la Tabla 3, se presentan las bacterias seleccionadas para los experimentos de bioconsolidación, observando variabilidad en cuanto a los colores, formas coloniales y tipos de

cristales producidos; 15 de las 22 cepas son ureasa positiva y 7 negativas, por lo que se contó con diversidad en cuanto a las rutas metabólicas que podrían tomar las bacterias para producir los cristales; además hubo diferencias en las formas bacterianas evidenciadas por tinción de Gram (Fig. 35)

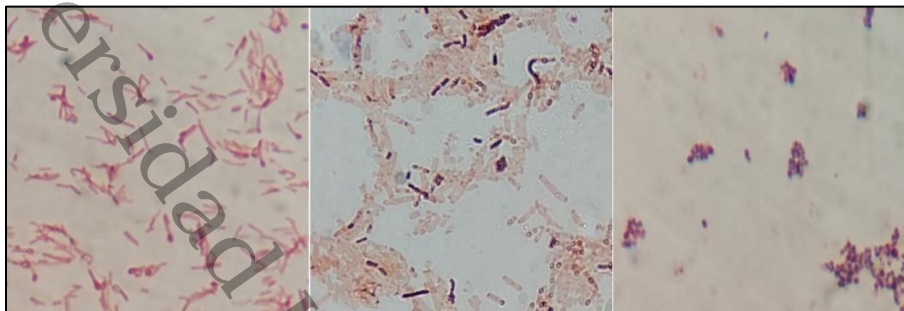


Figura 35. Tinción de Gram de las mejores cepas biomineralizantes **a)** Cepa CHJM-3, Bacilo Gram variable con espora terminal **b)** Cepa CK6-7A, Bacilo Gram negativo con acumulaciones de polihidroxitirato **c)** CHL5-2, Cocobacilo Gram positivo.

Tabla 3. Caracterización de las cepas con mayor capacidad biomineralizante.

Cepa	Consumo carbonato	Ureasa	Cristales en AEMC	Cristales en B4	Cristales en CCP	Tipo de bacteria	Tinción Gram	Otras características
CK1-3A	Medio	-	Si	Si	No	Bacilo	-	
CK1-4B	Medio	-	Si	Si	No	Bacilo	Variable	Esporulado
CK1-5A	Alto	-	Si	Si	No	Cocobacilo	-	
CK1-3C	Bajo	+ f	No	Si	Si	Bacilo	-	
CK4-1	Bajo	+ m	Si	Si	Si	Bacilo	-	Polihidroxibutirato
CK6-6	Bajo	+ m	Si	Si	Si	Bacilo	+	
CK6-7A	Bajo	-	Si	Si	No	Bacilo	-	Polihidroxibutirato
OX1-1	Medio	+ f	Si	Si	Si	Bacilo	-	
OX4-8A	Bajo	+ m	Si	Si	Si	Coco	-	
OX4-8C	Bajo	+ f	Si	Si	Si	Cocobacilo	-	
OX5-6B	Medio	+ f	Si	Si	Si	Cocobacilo	-	
OX6-3A	Bajo	+ m	Si	Si	No	Cocobacilo	-	
OX6-3B	Medio	+ d	Si	Si	No	Coco	-	
OX6-4B	Medio	+ m	Si	Si	No	Bacilo	-	
OX6-8B	Bajo	+ m	No	Si	Si	Coco	Variable	
CHJM-1	Bajo	+ m	Si	Si	Si	Bacilo	-	
CHJM-3	Bajo	-	Si	Si	No	Bacilo	Variable	Espora terminal
CHGM1-1	Bajo	-	Si	Si	No	Coco	Variable	
CHGM1-4	Bajo	+ m	Si	Si	No	Bacilo	-	Espora central
CHL4-1	Bajo	+ m	Si	Si	No	Bacilo	-	
CHL5-2	Medio	+ m	Si	Si	Si	Cocobacilo	+	
CHGM7-2	Medio	-	Si	Si	No	Diplobacilo	-	Polihidroxibutirato

Aunque se seleccionaron 22 cepas (Fig. 36 y Tabla 3) como las más destacadas por su capacidad biomineralizante (considerando todas las características previamente descritas), también se documentaron otras cepas potenciales, que mostraron capacidad mineralizante y que, bajo condiciones optimizadas, se podría, más adelante, potenciar su actividad.

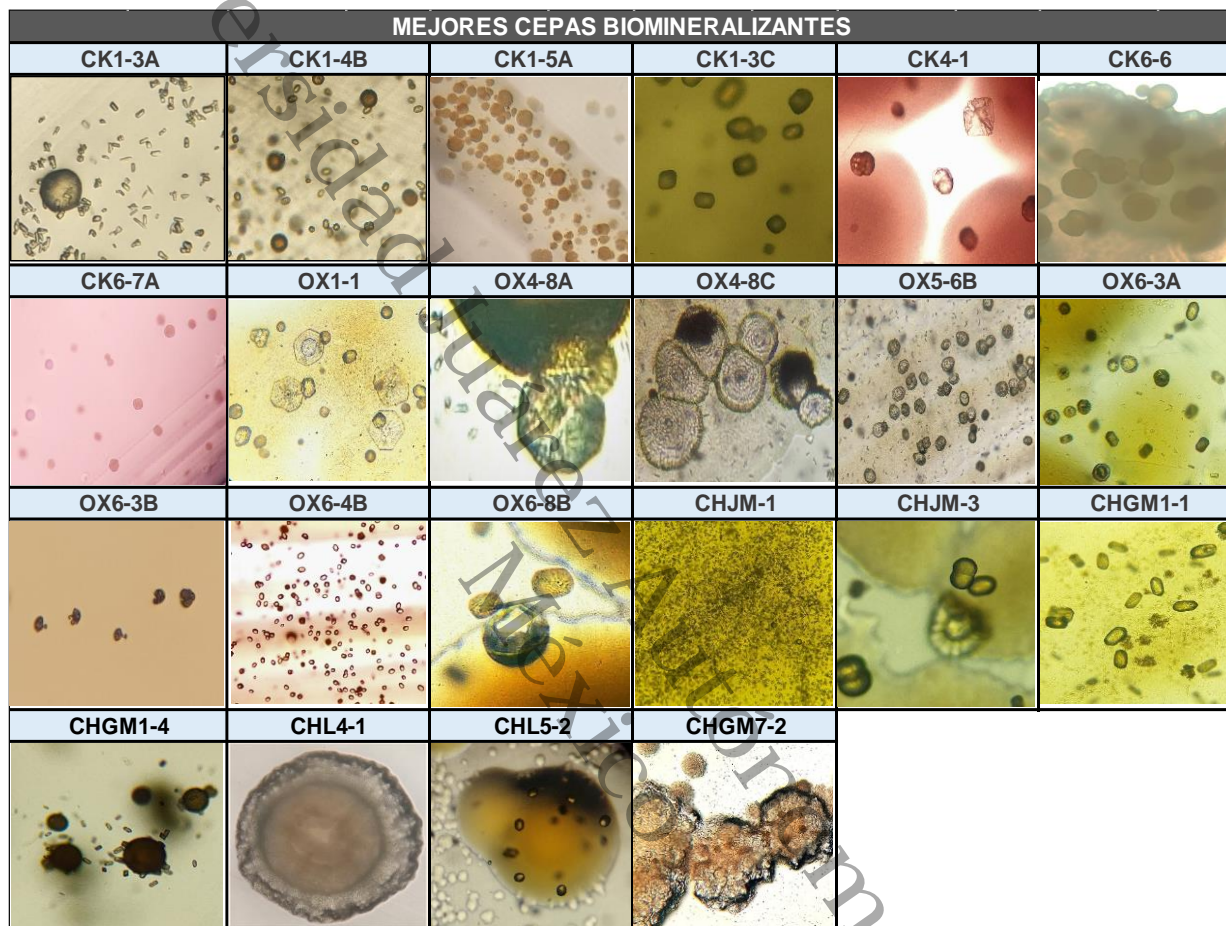


Figura 36. Algunos cristales producidos por las mejores cepas Biomineralizantes en B4, excepto en las cepas CHL4-1 y CHGM7-2, que mostraban mayor bioactividad en AEMC con aglomeraciones alrededor de la colonia.

8.4. ENSAYO DE BIOCONSOLIDACIÓN

Los resultados en esta técnica fueron positivos para la mayoría de las cepas, observándose una mejor consolidación en el sascab cuando se utilizó el medio líquido M-3P (Tabla 4). El porcentaje de consolidación se determinó pesando la cantidad inicial de sascab o arena (7 g) por caja de Petri y cuantificando la cantidad que se desprendió de la caja después de la inoculación de cada medio con la bacteria y pasados los 25 días de secado en incubación a temperatura ambiente y oscuridad. De los triplicados, se calculó un promedio de consolidación por tratamiento (Tabla 4) para obtener un porcentaje final de consolidación, considerando los resultados en los cuatro

tratamientos (Arena + CCP, arena + M-3P, Sascab + CCP y Sascab + M-3P). Adicionalmente, se calculó un porcentaje de consolidación por medio de cultivo líquido utilizado (para identificar cuál es más favorable para la biomineralización) y un porcentaje de consolidación por material (para determinar cuál es más bioreceptivo). Los resultados evidenciaron numéricamente el mejor desempeño de las cepas en el medio M-3P, así como su mayor afinidad al sascab (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del ensayo de bioconsolidación en sascab y arena en medios CCP y M-3P.

CEPA	PROMEDIO DE MATERIAL DESPRENDIDO (g)				RESULTADOS				
	M-3P SASCAB	M-3P ARENA	CCP SASCAB	CCP ARENA	% TOTAL DE CONSOLIDACIÓN	% CONSOLIDACIÓN M-3P	% CONSOLIDACIÓN CCP	% CONSOLIDACIÓN SASCAB	% CONSOLIDACIÓN ARENA
CHL4-1	0.00	0.00	0.00	1.80	97.9	100.0	97.9	100.0	97.9
CHJM-1	0.00	0.62	0.00	1.54	97.4	99.3	98.2	100.0	97.4
OX4-8C	0.00	0.28	0.02	2.26	97.0	99.7	97.3	100.0	97.0
CK4-1	0.00	0.73	0.00	2.09	96.6	99.1	97.5	100.0	96.6
CHGM1-4	0.00	0.00	0.00	3.04	96.4	100.0	96.4	100.0	96.4
CHGM1-1	0.00	0.55	0.00	3.06	95.7	99.3	96.4	100.0	95.7
CK1-3C	0.00	0.71	1.66	1.46	95.4	99.2	96.3	98.0	97.4
OX1-1	0.04	0.39	0.13	3.70	94.9	99.5	95.4	99.8	95.1
OX6-4B	0.00	0.31	0.00	3.95	94.9	99.6	95.3	100.0	94.9
CHGM7-2	0.00	1.57	0.02	2.77	94.8	98.1	96.7	100.0	94.8
OX6-8B	0.09	1.52	0.00	3.84	93.5	98.1	95.4	99.9	93.6
CHL5-2	0.06	1.78	0.56	3.57	92.9	97.8	95.1	99.3	93.6
OX4-8A	0.04	3.83	0.00	2.80	92.1	95.4	96.7	100.0	92.1
CK6-6	0.00	3.24	0.00	4.66	90.6	96.1	94.5	100.0	90.6
Control +	0.09	1.97	0.02	6.65	89.6	97.5	92.1	99.9	89.7
OX5-6B	3.61	2.20	0.16	2.95	89.4	93.1	96.3	95.5	93.9
CK6-7A	1.62	2.93	0.23	4.68	88.7	94.6	94.2	97.8	90.9
CK1-3A	2.98	1.12	0.40	5.17	88.5	95.1	93.4	96.0	92.5
CK1-5A	1.71	3.71	1.57	3.91	87.0	93.5	93.5	96.1	90.9
CK1-4B	0.00	3.05	2.11	6.42	86.2	96.4	89.8	97.5	88.7
CHJM-3	0.00	5.05	0.76	6.21	85.7	94.0	91.7	99.1	86.6
OX6-3B	2.00	2.78	1.02	6.28	85.6	94.3	91.3	96.4	89.2
OX6-3A	0.98	4.53	2.41	4.21	85.6	93.4	92.1	96.0	89.6

Los promedios son expresados dependiendo de los gramos del material desprendido de las cajas (por triplicado) para cada tratamiento. Se calcularon porcentaje de consolidación dependiendo del medio, el material utilizado y un porcentaje global.

Para verificar la resistencia de la consolidación del material, cada caja de Petri fue sometida intencionalmente a 3 golpes mecánicos de manera uniforme. En la figura 40 se presenta la evidencia fotográfica de la consolidación por cada cepa. Las fotografías muestran las cajas de Petri colocadas de pie (Fig. 37) para comprobar el desprendimiento o consolidación. Sin embargo, en algunos casos fue evidente que, aunque la consolidación parecía firme, al manipular mecánicamente el material, se comprobó que podía ser superficial (+), media (++) o profunda (+++) y que esos niveles de consolidación podían a su vez ser débiles (D) o fuertes (F) dependiendo del esfuerzo necesario para provocar el desprendimiento (Tabla 5 y Fig. 38)

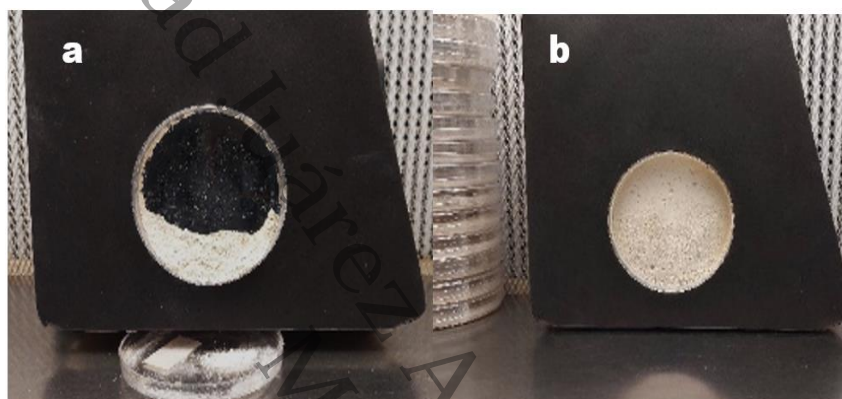


Figura 37. Evidencia del ensayo de bioconsolidación en Sascab utilizando M-3P, **a)** control sin bacteria **b)** con la bacteria OX4-8C.



Figura 38. Diferentes niveles de bioconsolidación observados en el ensayo con medio M-3P. **a)** consolidación superficial en sascab inoculado con la cepa OX6-4B, **b)** consolidación media en arena inoculada con la cepa CHGM1-4, **c)** consolidación profunda en sascab inoculado con la cepa CHJM-1.

En cuanto a las coloraciones, éstas fueron muy estables en CCP (tanto en arena como en sascab), excepto en las cepas CHGM7-2 y CK1-5A, que mostraron un cambio evidente de tonalidad con algunos puntos en la superficie del color de la cepa, y cabe resaltar que las mismas dos cepas mostraron un relieve que las demás no presentaron (Fig. 39). En cuanto a las coloraciones en el medio M-3P, se mantuvieron muy estables en sascab, excepto en las dos

cepas antes mencionadas, y en el aislamiento OX4-8A; y en la arena hubo una coloración amarilla superficial en todas las cepas excepto en OX4-8C y OX1-1 (Fig. 40).

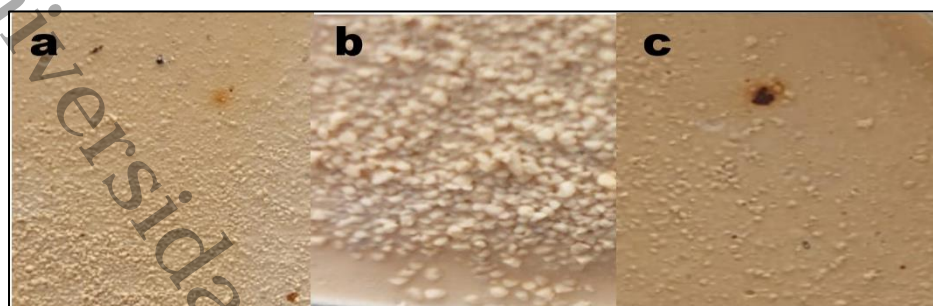






























Figura 39. Observaciones de color y textura en ensayo de bioconsolidación en sascab con medio CCP **a)** Cepa CHGM7-2 mostrando cambios de coloración en la superficie **b)** Detalle del relieve superficial causado por la cepa CHGM7-2 **c)** Cepa CK1-5A con cambio en la coloración y textura.





























Tabla 5. Observaciones de bioconsolidación de la cepas seleccionadas





























CEPA	OBSERVACIONES DE BIOCONSOLIDACIÓN							
	M-3P				CCP			
	SASCAB		ARENA		SASCAB		ARENA	
NIVEL DE CONSOLIDACIÓN	ESTABILIDAD	NIVEL DE CONSOLIDACIÓN	ESTABILIDAD	NIVEL DE CONSOLIDACIÓN	ESTABILIDAD	NIVEL DE CONSOLIDACIÓN	ESTABILIDAD	
CK1-3A	++	D	++	D	++	D	+	D
CK1-5A	++	D	+	D	++	D	++	D
CK1-3C	++	F	++	F	++	F	++	D
CK1-4B	++	D	++	D	++	D	+	D
CK4-1	++	F	++	D	++	F	++	D
CK6-6	++	D	+	D	++	D	++	D
CK6-7A	+++	D	+	D	+++	D	++	D
OX1-1	++	F	++	D	++	F	++	F
OX4-8A	++	D	+	D	++	F	++	D
OX4-8C	++	F	++	F	++	F	++	F
OX5-6B	++	F	++	F	++	D	++	D
OX6-3A	++	D	++	D	++	D	++	D
OX6-3B	+++	D	++	D	++	D	+	D
OX6-4B	+	F	++	F	++	F	+	D
OX6-8B	+++	D	++	F	+++	D	++	D
CHJM-1	+++	F	++	F	+++	F	++	F
CHJM-3	+++	F	++	F	+++	D	++	F
CHGM1-1	++	F	++	F	++	F	++	D
CHGM1-4	++	F	++	D	++	F	++	D
CHL4-1	++	F	++	F	++	F	++	D
CHL5-2	+	D	+	D	++	D	+	D
CHGM7-2	+++	D	+	D	+++	D	++	F
Control +	+	F	++	D	++	F	+	D

+) consolidación superficial, **++**) consolidación media, **+++**) consolidación profunda, **F**) estabilidad fuerte (esfuerzo moderado para desprendimiento) y **D**) estabilidad débil (poco esfuerzo para desprendimiento).

Figura 40. Evidencia fotográfica de bioconsolidación de cepas bacterianas en arena y sascab, utilizando medio M-3P y CCP

EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DE BIOCONSOLIDACIÓN				
CEPA	M-3P		CCP	
	SASCAB	ARENA	SASCAB	ARENA
CONTROL NEGATIVO				
CONTROL POSITIVO				
CHL4-1				
CHJM-1				
OX4-8C				
CK4-1				
CHGM1-4				

EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DE BIOCONSOLIDACIÓN				
CEPA	M-3P		CCP	
	SASCAB	ARENA	SASCAB	ARENA
CHGM1-1				
CK1-3C				
OX1-1				
OX6-4B				
CHGM7-2				
OX6-8B				
CHL5-2				

EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DE BIOCONSOLIDACIÓN				
CEPA	M-3P		CCP	
	SASCAB	ARENA	SASCAB	ARENA
OX4-8A				
CK6-6				
OX5-6B				
CK6-7A				
CK1-3A				
CK1-5A				
CK1-4B				

EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DE BIOCONSOLIDACIÓN				
CEPA	M-3P		CCP	
	SASCAB	ARENA	SASCAB	ARENA
CHJM-3				
OX6-3B				
OX6-3A				

8.5. SELECCIÓN DE CEPAS PARA ANÁLISIS RIGUROSOS DE CONSOLIDACIÓN

Teniendo en cuenta que las bacterias son inoculadas en la roca suspendidas en medio líquido, se priorizaron aquellas cepas que demostraron una mayor precipitación de cristales en caldo, además de haber mostrado un excelente rendimiento en el agar y/o en los experimentos de bioconsolidación. Las 22 cepas probadas fueron inoculadas en dos medios líquidos (B4 y CCP), observándose que la mayoría tenían lenta precipitación de cristales, y cuando lo hacían, la cantidad era muy baja en comparación con los medios agarizados, dificultando la recolección de los cristales para el análisis en DRX y SEM.

Posteriormente, se evaluó la producción de cristales en otros medios líquidos (B4M y M-3P), observándose en el microscopio óptico que el medio M-3P mostraba una mayor eficiencia. Además, se identificó una tendencia de las cepas a formar aglomeraciones. En medio agarizados, específicamente las cepas OX4-8C, CHJM-1 y CK1-3C mostraron la capacidad de precipitar cristales de mayor tamaño (Fig. 41).

Considerando estos resultados se eligieron nueve cepas: CHJM-1, CHGM7-2, CHGM1-1, CHL4-1, OX4-8A, OX4-8C, CK1-3C, OX1-1 y CK4-1, para realizar análisis rigurosos de dureza superficial (Fig. 42), DRX (Tabla 6 y Fig. 43) y SEM (Fig. 44).

CEPAS CON MAYOR PRECIPITACIÓN DE CRISTALES EN B4M Y M-3P				
CEPA	B4M (AGAR)	B4M (LÍQUIDO)	M-3P (AGAR)	M-3P (LÍQUIDO)
OX4-8C				
CHJM-1				
CHL4-1				
CHGM7-2				
CK4-1				
CK1-3C				
OX1-1				
CHGM1-1				
OX4-8A				

Figura 41. Mejores cepas precipitadoras de cristales, en agar y medio líquido (B4M y M-3P).

8.5.1. ANÁLISIS DE DUREZA SUPERFICIAL EN BIOCONSOLIDACIÓN

Para una interpretación más precisa de los datos, se hizo una medición con un durómetro de las nueve cepas elegidas, evaluando su desempeño en el material sascab, ya que este presenta una mayor compatibilidad con la roca caliza que se utiliza en la restauración de los monumentos históricos. Además, se incluyó una comparación entre las cepas seleccionadas y un control positivo (*Lysinibacillus fusiformis*), reportada en la literatura como una cepa carbonatogénica con propiedades consolidantes. Los resultados revelaron que existen diferencias de dureza entre las cepas (Fig.42), concluyendo, también, que el medio de cultivo desempeña un papel crucial en la resistencia de los cristales sintetizados. Se observó que la actividad de algunas cepas aumenta o disminuye dependiendo del medio proporcionado. Los análisis mostraron que la cepa OX4-8A presentó una mayor resistencia en ambos medios, superando incluso al control positivo, mientras que la cepa OX4-8C mostró valores muy similares al control positivo. Este experimento destaca la importancia de datos cuantitativos, además de las observaciones cualitativas, ya que casos como la cepa CHL4-1, que visualmente parecía ser de las más estables, demostró mediante el durómetro que la resistencia proporcionada no fue óptima.

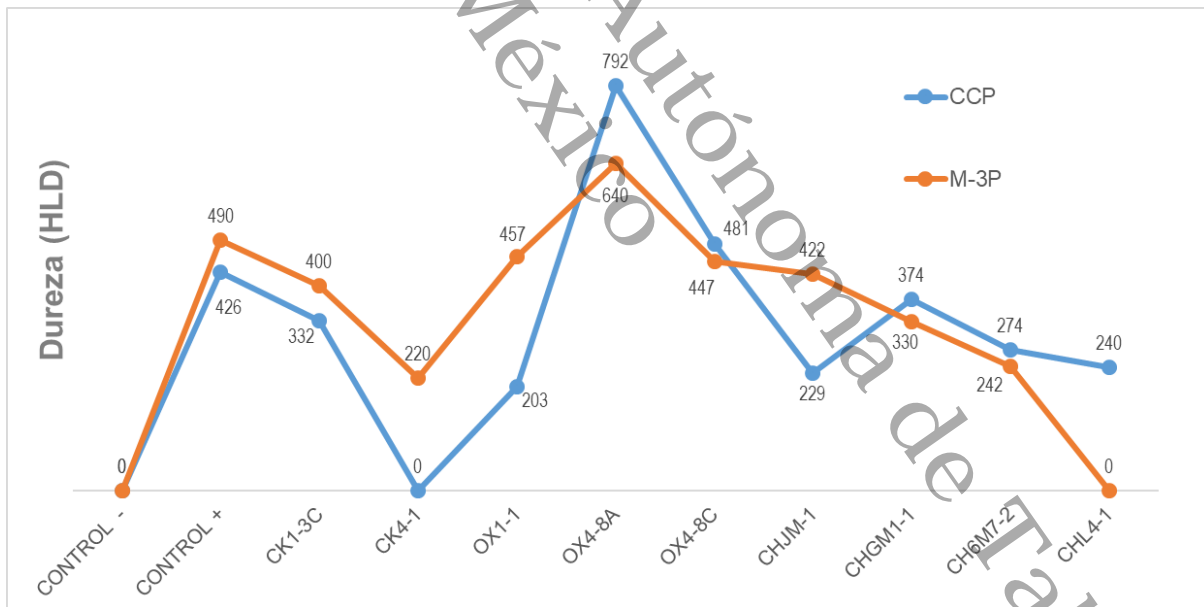


Figura 42. Comparación de dureza superficial en bioconsolidación de sascab.

8.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO

Los cristales precipitados en los diferentes medios fueron recolectados y analizados tanto en DRX (Fig. 43) como en SEM (Fig. 44). Los difractogramas obtenidos confirman la producción de calcita (CaCO_3), vaterita (CaCO_3) y wedelita ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), además de otras fases de carbonato de calcio cuya formación depende del medio de cultivo en el que fue inoculada la bacteria (Tabla 6).

Se evidenció la formación de diferentes polimorfos del carbonato de calcio, lo que resalta la influencia del entorno en la estabilización de fases específicas. En particular, se detectó la formación de wedelita en el medio B4, lo que sugiere la participación de metabolitos microbianos en la modificación del microambiente químico, favoreciendo la precipitación de oxalato de calcio en su fase dihidratada.

Tabla 6. Minerales identificados por cepa en diferentes medios de cultivo.

CEPA	MINERALES IDENTIFICADOS				
	M-3P	AEMC	CCP	B4	B4M
CHGM1-1	Calcita Vaterita	ND	ND	Wedelita Calcita	Calcita
CH6M7-2	Calcita	Calcita Aragonita	ND	Calcita Aragonita	Calcita
CK1-3C	Calcita, Vaterita	ND	ND	Vaterita Wedelita	Calcita Wedelita
CK4-1	Calcita	ND	Hidroxiapatita Wedelita Aragonita	Calcita Aragonita	Calcita
OX1-1	Calcita	ND	ND	Wedelita Calcita	Calcita Wedelita
OX4-8A	Calcita	ND	ND	Calcita	Calcita
OX4-8C	Calcita	ND	Hidroxiapatita Wedelita Aragonita	Wedelita Calcita Aragonita	Calcita Wedelita
CHJM-1	Wedelita	ND	ND	Wedelita Calcita Aragonita	Calcita Wedelita
CHL4-1	Hidratado de etanoato de calcio	ND	ND	Wedelita Calcita	Calcita

ND: no detectado

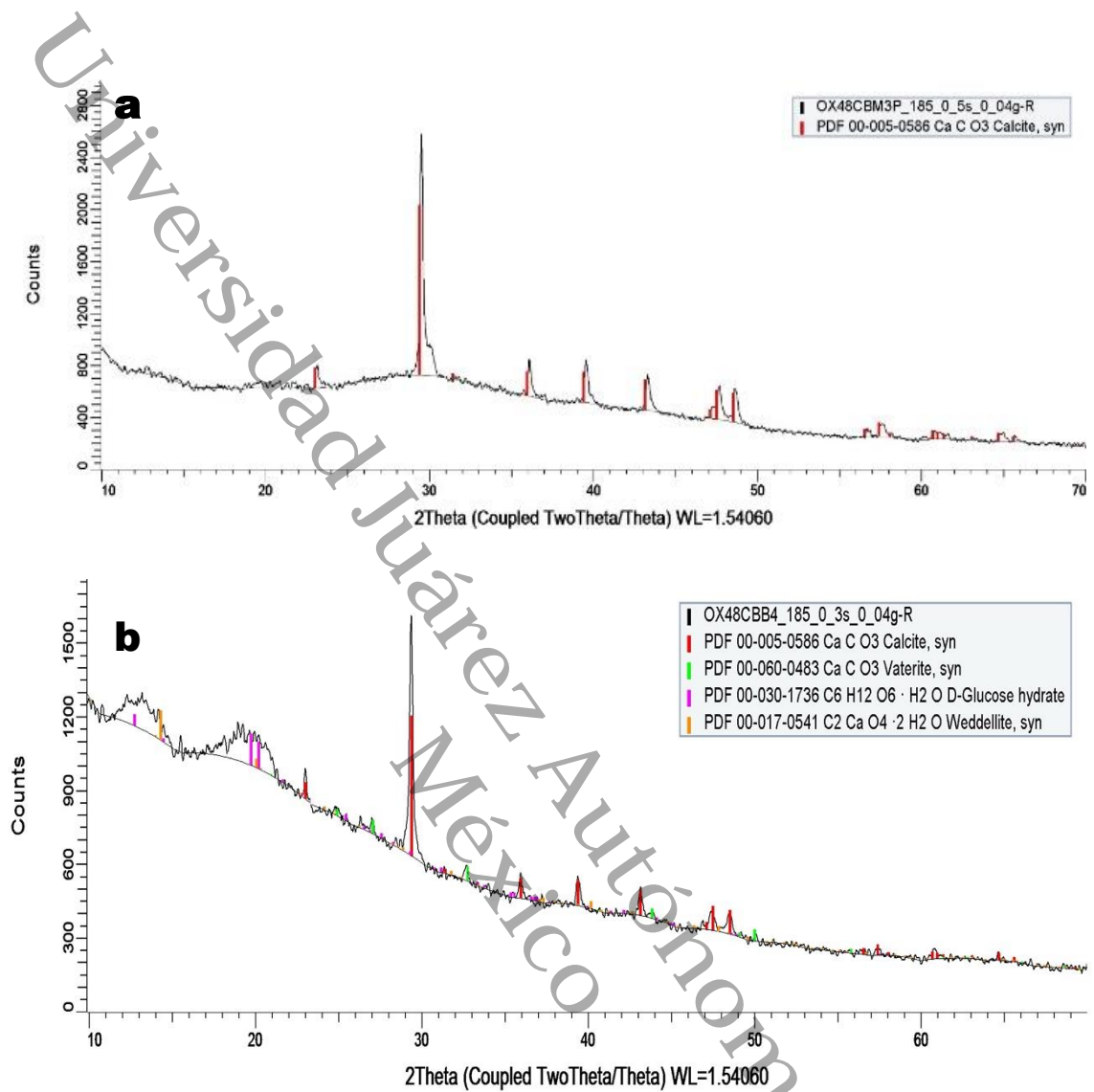


Figura 43. Producción de diferentes polimorfos del carbonato de calcio en la cepa OX4-8C en diferentes medios de cultivo. **a)** Medio M3-P, y **b)** Medio B4

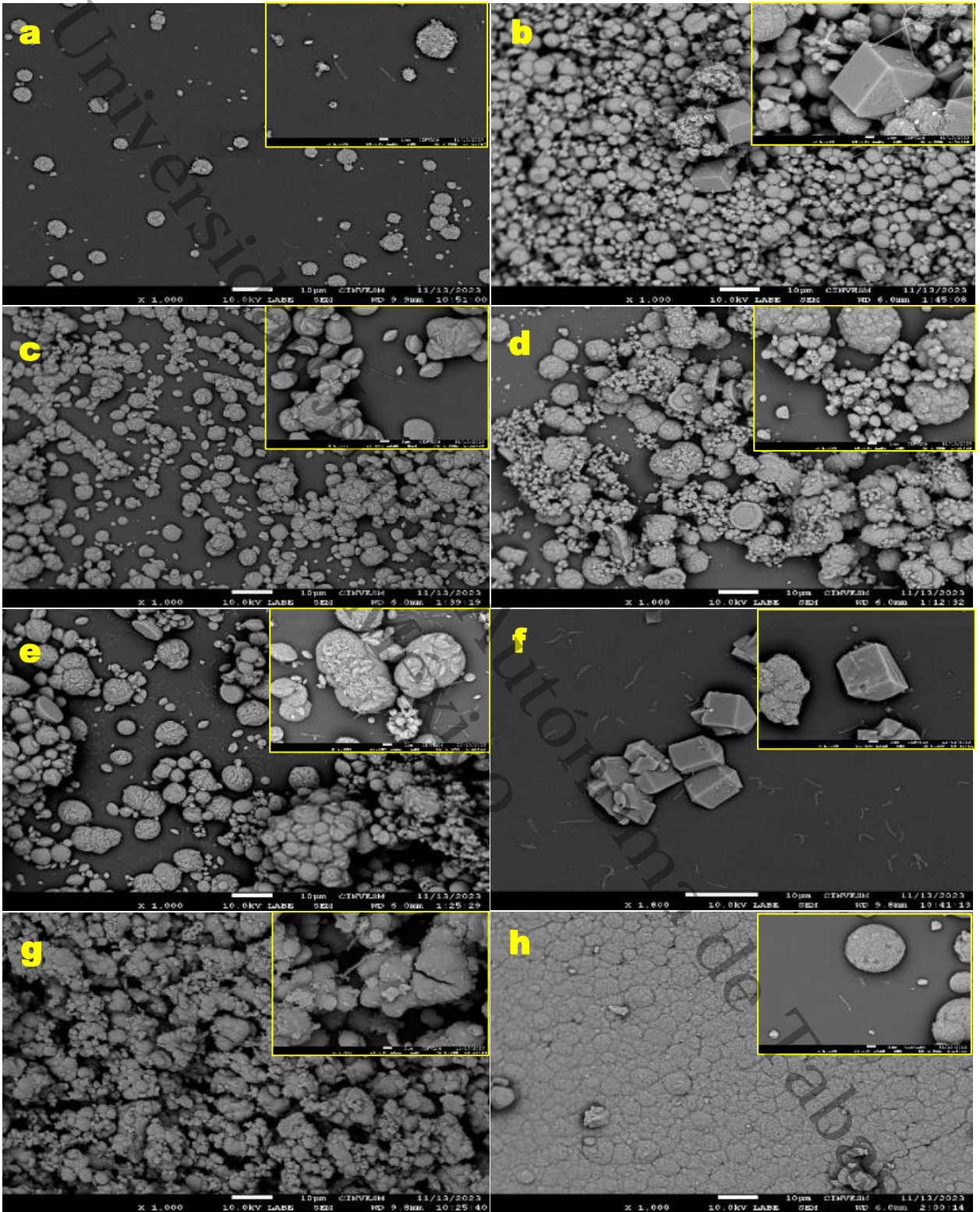


Figura 44. Micrográficas de SEM de cristales en M-3P a 1000X (excepto f, que se encuentra a 1800X), y los insets a 5000X a) CHL4-1 b) CHGM7- 2 c) CK1-3C d) CHGM1-1 e) OX1-1 f) OX4-8A g) OX4-8C h) CHJM-1

En los análisis DRX de los ensayos de bioconsolidación (Fig. 45), se confirmó un aumento en los picos relacionados con la calcita en comparación con los controles, especialmente en las cepas OX4-8C, CHJM-1 y OX1-1 cuando fueron evaluadas en el medio M-3P + sascab. Por otro lado, no se detectó un incremento en los picos de calcita en ninguna de las cepas cuando se utilizaron en el medio CCP + sascab, sugiriendo que este medio no favoreció la precipitación de carbonato de calcio en la misma medida que M-3P.

En cuanto a los ensayos en arena, los resultados fueron favorables tanto en M-3P + arena como en CCP + arena, mostrando un aumento en la formación de calcita en comparación con los controles. No obstante, la cepa OX4-8A no mostró una actividad significativa en la precipitación de calcita en ninguno de estos medios. En arena, los mejores resultados se obtuvieron con las cepas CK4-1 y OX1-1 en CCP + arena, y con OX4-8C, OX1-1 y CHJM-1 en M-3P + arena.

Los difractogramas confirman la presencia predominante de calcita (CaCO_3) en las muestras donde se observó una mayor actividad de bioconsolidación, lo que sugiere que el tipo de medio influye significativamente en la posible precipitación de carbonato de calcio por parte de las cepas analizadas.

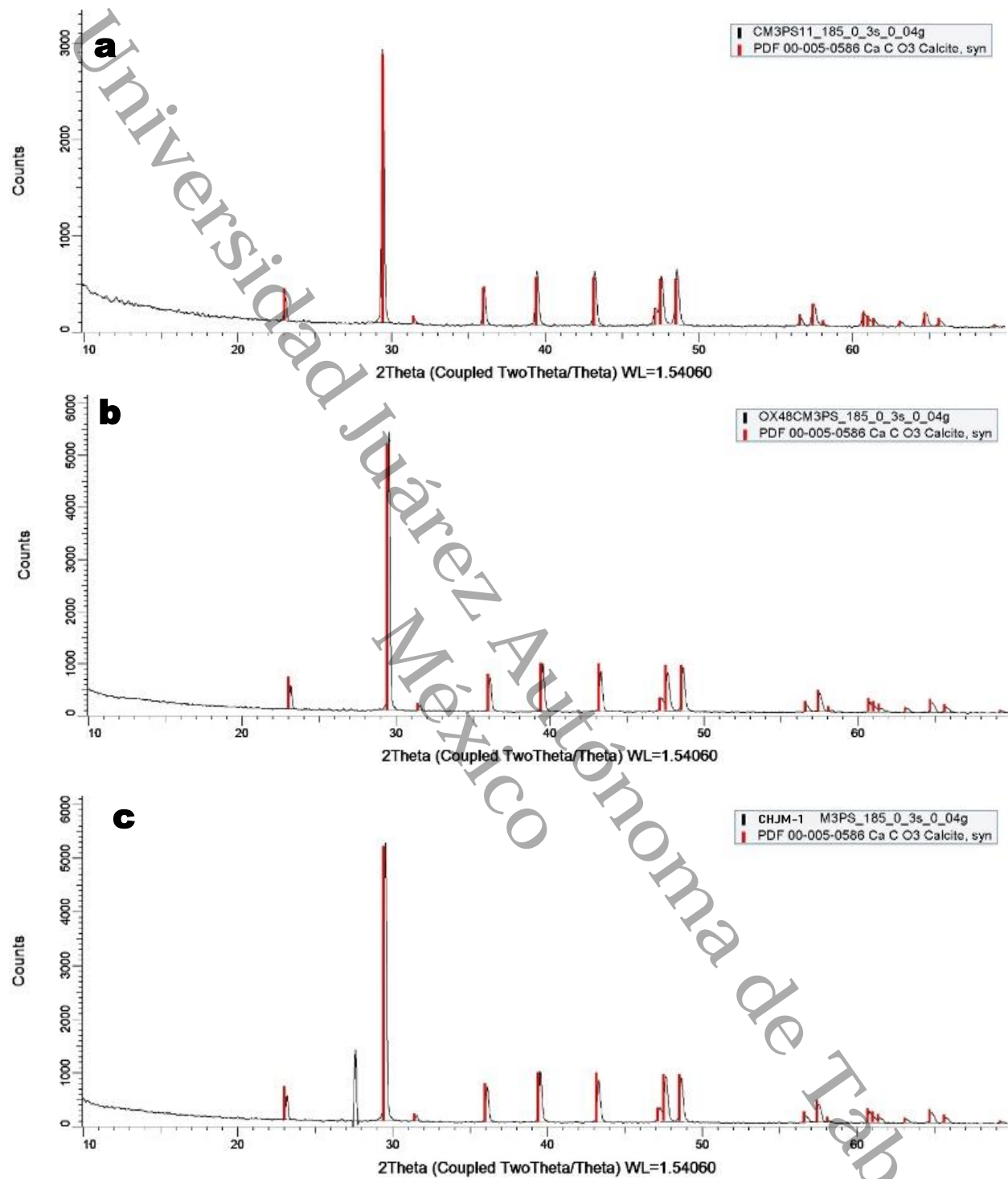


Figura 45. DRX del Medio M3-P + sascab. Comparación entre dos bacterias y el control. **a)** Control medio M-3P, **b)** Cepa OX4-8C **c)** Cepa CHJM-1

8.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

8.7.1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS SECUENCIAS CRUDAS

El análisis de calidad de las secuencias crudas reveló que la mayoría de las lecturas presentaban valores de calidad superiores a $Q \geq 30$, indicando una fiabilidad adecuada para el ensamblaje y posterior análisis genómico. Sin embargo, se identificó una distribución atípica del porcentaje de contenido GC en algunas muestras, lo que sugiere posibles sesgos en la composición genómica. En particular, las cepas OX4-8C y CHJM-1 presentaron secuencias sobrerrepresentadas, lo que podría indicar la presencia de regiones genómicas altamente repetitivas o la amplificación preferencial de ciertos fragmentos de ADN durante el proceso de secuenciación.

8.7.2. FILTRADO Y LIMPIEZA DE SECUENCIAS.

Tras el proceso de limpieza y filtrado de las secuencias, se logró una mejora general en la calidad de los datos, eliminando bases de baja calidad y reduciendo la presencia de secuencias sobrerrepresentadas. La Tabla 7 resume los cambios observados después del procesamiento con Trimmomatic. Se destaca que, mientras que la mayoría de las cepas mejoraron significativamente en la distribución del contenido de GC y en la eliminación de secuencias sobrerrepresentadas, la cepa OX4-8C no mostró una corrección suficiente en la distribución de GC ni en la eliminación de secuencias sobrerrepresentadas. En contraste, la cepa CHJM-1 logró corregir completamente las anomalías detectadas en el análisis previo.

Tabla 7. Resumen de la calidad de las secuencias después de la limpieza y filtrado con Trimmomatic.

Clave Cepa	Secuencias					Adaptadores
	Totales	Tamaño (pb)	$Q \geq 30$	% GC	Sobre representadas	
OX4-8C	586,289	36-151	Si	58	Si	No
CHJM-1	611,095	36-152	Si	61	No	No
CK4-1	1,187,264	36-153	Si	61	No	No
OX1-1	717,786	36-154	Si	63	No	No
CK1-3C	1,163,089	36-155	Si	57	No	No
CHGM7-2	1,625,666	36-156	Si	62	No	No

8.7.3. ENSAMBLAJE DE GENOMAS Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD.

El ensamblaje de los genomas mediante Minia generó un número variable de contigs y tamaños genómicos diferentes para cada cepa (Tabla 8). Con base en los resultados obtenidos de la evaluación de completitud y contaminación a través de CheckM (Tabla 9), se determinó que los

genomas de las cepas OX4-8C y CHJM-1 no presentan un tamaño suficiente para realizar un análisis robusto. No obstante, estos genomas pueden ser útiles para estudios preliminares, considerándolos como genomas parciales. En contraste, los ensamblajes de las demás cepas alcanzaron una calidad suficiente a excelente, permitiendo análisis genómicos más complejos.

Las métricas de QUAST indicaron que la mayoría de los ensamblajes presentan tamaños adecuados y valores de N50 y L50 que sugieren una buena continuidad, lo que respalda su uso en estudios genómicos detallados.

Tabla 8. Resumen de métricas de QUAST en base al ensamblado genómico basado en Minia

Clave Cepa	Tamaño k-mer	#Contigs	Tamaño total (pb)	N50 (pb)	L50	Contig más largo (pb)	GC %
OX4-8C	31	380	249,448	625	157	3571	63.05
CHJM-1	27	1952	2,595,664	1546	438	8392	64.06
CK4-1	32	869	4,804,443	8,645	152	63,454	64
OX1-1	31	2,302	3,897,389	2,168	480	48,260	66
CK1-3C	33	625	5,347,795	15,956	100	59,888	59
CHGM7-2	33	635	5,347,879	15,956	100	59,888	59

Tabla 9. Resumen de la evaluación de la calidad del ensamblado genómico según CheckM

Cepa	Linaje del marcador	Complejidad	Contaminación
OX4-8C	f__Micrococcaceae	12.46	0
CHJM-1	o__Sphingomonadales	67.88	3.57
CK4-1	f__Micrococcaceae	98.83	0.93
OX1-1	f__Xanthomonadaceae	83.05	3.77
CK1-3C	f__Rhizobiaceae	98.87	1.86
CHGM7-2	f__Rhizobiaceae	98.87	1.86

8.7.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

En el árbol filogenético de la cepa CHJM-1 (Fig. 46), se observa un clado diverso conformado principalmente por especies del género *Sphingomonas* y sus géneros relacionados, como *Sphingopyxis*, *Sphingobium* y *Novosphingobium*. Adicionalmente, se identifican algunos géneros más distantes, como *Caulobacter*, *Hyphomonas* y *Rhizobium*, que aparecen en posiciones más alejadas en la topología del árbol, lo que indica una menor relación filogenética con

Sphingomonas. La cepa CHJM-1 parece agruparse estrechamente con *Sphingomonas jaddahensis* G39T y otros miembros del género *Sphingomonas*, lo que sugiere que pertenece a este grupo taxonómico. No obstante, la distancia filogenética observada indica que podría tratarse de una variante intraespecífica o, potencialmente, de una nueva especie dentro del género. Sin embargo, es importante considerar que la calidad de las secuencias obtenidas y el nivel de completitud del genoma ensamblado no permiten confirmar esta hipótesis con certeza, por lo que serían necesarios análisis genómicos adicionales para una identificación definitiva.



Figura 46. Árbol filogenético de la cepa CHJM-1. Las especies tipo están resaltadas en color rojo.

El análisis filogenético permitió la construcción de un árbol filogenético para las cepas OX4-8C y CK4-1 (Fig. 47), en el cual se observó la formación de clados bien definidos dominados por los géneros *Arthrobacter*, *Paenarthrobacter* y *Pseudarthrobacter*. La cepa OX4-8C se agrupa estrechamente con *Arthrobacter mangrovi*, presentando una distancia genética baja (0.01), lo que sugiere que podría corresponder a esta especie o a una muy cercana. Por otro lado, la cepa CK4-1 mostró una estrecha relación filogenética con *Paenarthrobacter ureafaciens*, con una distancia genética corta (0.09), lo que indica una alta similitud entre ambas.

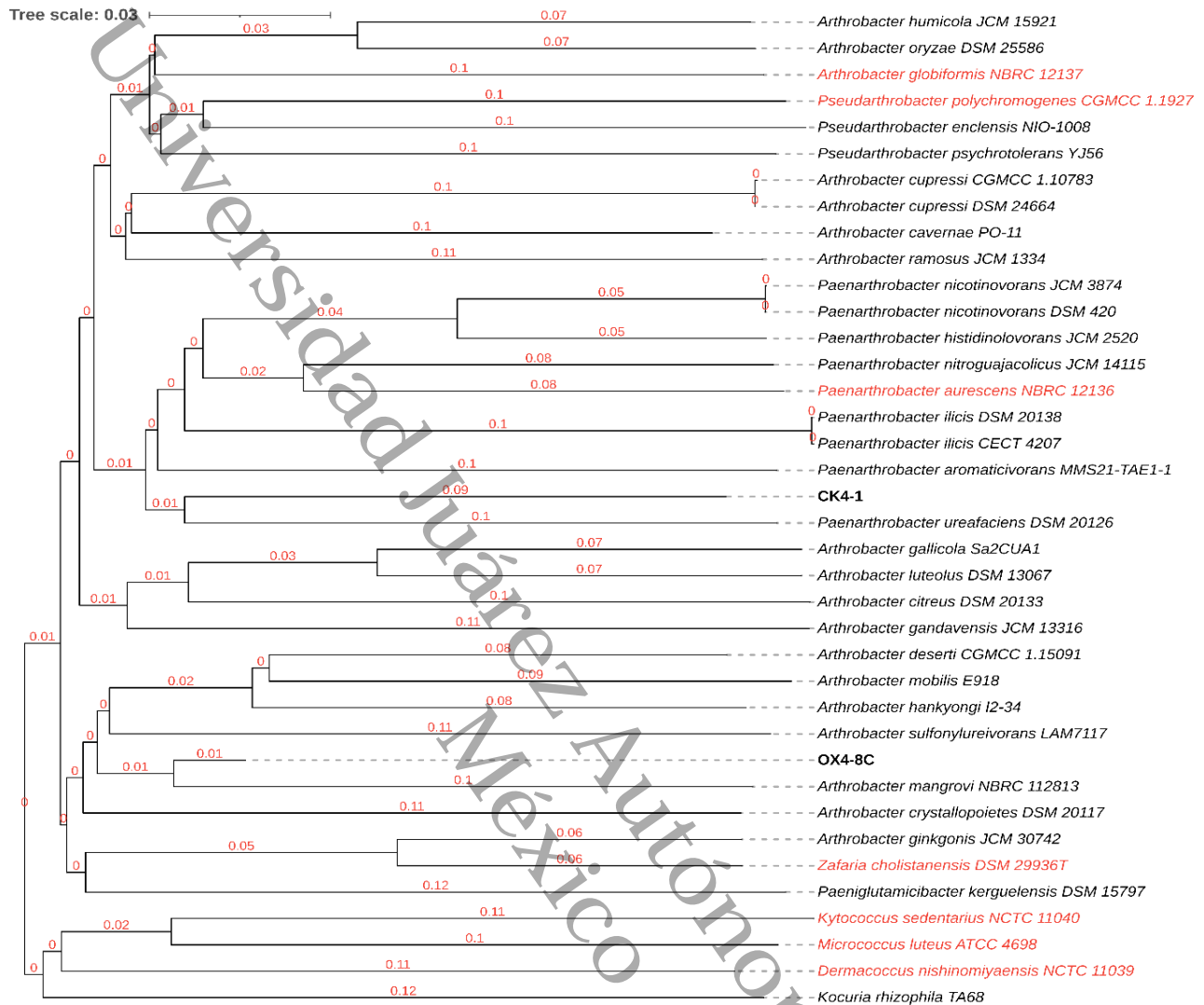


Figura 47. Árbol filogenético de las cepas OX4-8C y CK4-1. Las especies tipo están resaltadas en color rojo.

El árbol filogenético de la cepa OX1-1 (Fig. 48) revela una clara agrupación de las especies del género *Stenotrophomonas*, formando un clado bien definido. La cepa OX1-1 se posiciona dentro de este grupo, mostrando una relación filogenética estrecha con *Stenotrophomonas geniculata* JCM 13324, con una distancia evolutiva corta (<0.01). Esta proximidad sugiere que OX1-1 podría representar una variante intraespecífica o, potencialmente, una nueva subespecie dentro de *Stenotrophomonas geniculata*. No obstante, para confirmar su estatus taxonómico, sería necesario realizar análisis complementarios, como la determinación de valores de hibridación ADN-ADN digital (dDDH) y ANI (Average Nucleotide Identity).

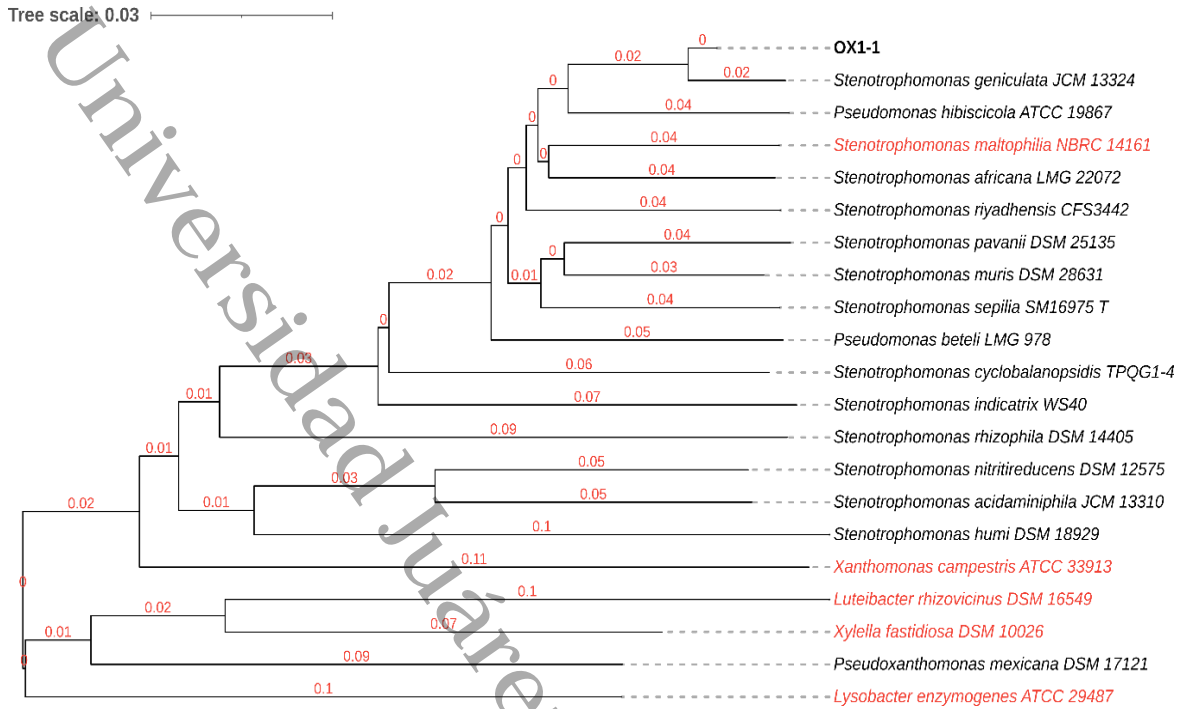


Figura 48. Árbol filogenético de la cepa OX1-1. Las especies tipo están resaltadas en color rojo

El árbol filogenético obtenido para las cepas CK1-3C y CHGM7-2 (Fig. 49) revela que el género *Agrobacterium* domina la topología del árbol, con una clara diferenciación en distintos subgrupos. Ambas cepas se agrupan estrechamente con *Agrobacterium pusense*, lo que sugiere una relación filogenética cercana con esta especie. La distancia evolutiva entre *A. pusense* y las cepas analizadas es baja (0.01), lo que indica que podrían representar variantes intraespecíficas o incluso nuevas cepas dentro de esta especie. Sin embargo, para confirmar su identidad taxonómica con mayor precisión, sería necesario complementar este análisis con estudios genómicos adicionales, como la determinación de valores de ANI (Average Nucleotide Identity) y dDDH (hibridación ADN-ADN digital).

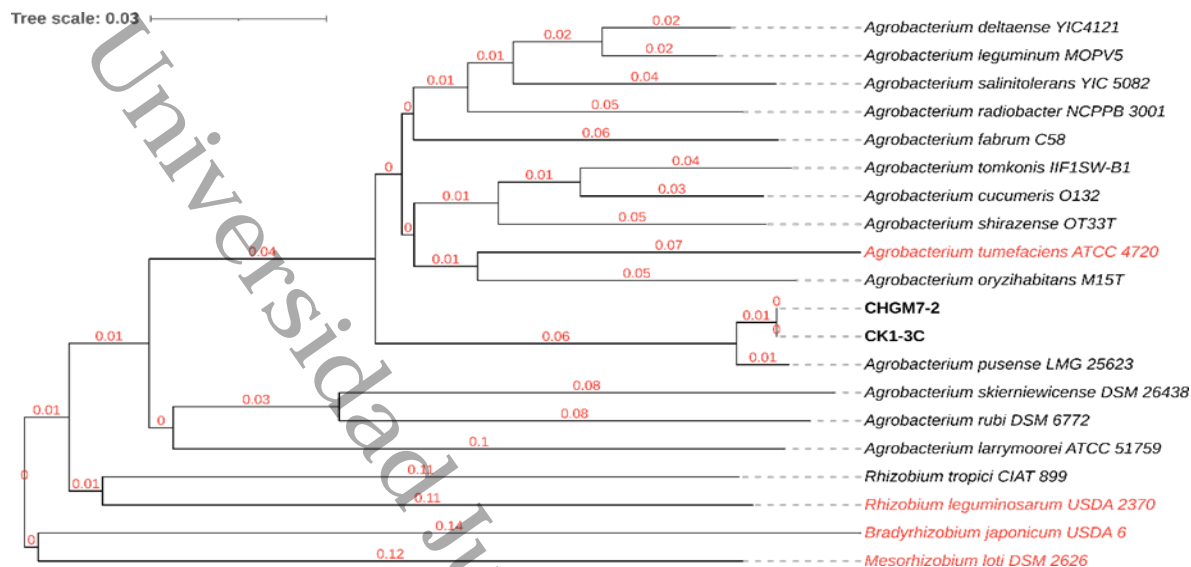


Figura 49. Árbol filogenético de las cepas CHGM7-2 y CK1-3C. Las especies tipo están resaltadas en color rojo.

Los valores de dDDH permitieron determinar qué cepas podrían representar potencialmente nuevas especies. En la Tabla 10 se presentan las cepas analizadas en contraste con aquellas con las que mostraron un porcentaje significativo de identidad, lo que permite evaluar su cercanía filogenética y destacar diferencias nucleotídicas que podrían indicar si las cepas estudiadas corresponden a nuevas especies o a variantes dentro de una subespecie. Las cepas OX4-8C y CHJM-1 mostraron una relación con *Arthrobacter mangrovi* NBRC 112813 (dDDH = 39%) y *Sphingomonas dokdonensis* DSM 21029 (dDDH = 39%), respectivamente. Si bien un valor bajo de dDDH (<50%) suele interpretarse como indicativo de una especie perteneciente a un nuevo género, es importante considerar que la calidad del ensamblaje genómico de estas cepas no fue suficiente para realizar un análisis *in silico* robusto que respalde esta conclusión de manera definitiva. No obstante, dado que la plataforma TYGS utiliza bases de datos de ARNr 16S y genomas tipo, es altamente probable que OX4-8C y CHJM-1 pertenezcan a los géneros *Arthrobacter* y *Sphingomonas*, respectivamente.

Por otro lado, la cepa CK4-1 mostró una relación con *Paenarthrobacter ureafaciens* DSM 20126, con un valor de dDDH relativamente bajo (dDDH = 25.1%). Debido a que el ensamblaje genómico de esta cepa presentó un alto porcentaje de completitud, se puede confiar en la calidad de los datos obtenidos, lo que refuerza la posibilidad de que esta cepa represente un nuevo género bacteriano (dDDH < 50%). En contraste, la cepa OX1-1 presentó una alta identidad con *Stenotrophomonas geniculata* (dDDH = 82.1%), lo que sugiere que pertenece a esta misma

especie, ya que valores superiores al 70% en dDDH son indicativos de una misma identidad taxonómica a nivel de especie.

Finalmente, las cepas CK1-3C y CHGM7-2 se agruparon juntas en el análisis filogenético y mostraron un valor de dDDH del 100%, lo que confirma que filogenéticamente pertenecen a la misma especie. Ambas cepas también mostraron una fuerte relación con *Agrobacterium pusense* LMG 25623 (dDDH = 86.5%). Dado que este valor supera el umbral del 70%, se puede concluir con alta certeza que CK1-3C y CHGM7-2 corresponden a la especie *Agrobacterium pusense*.

Tabla 10. Resumen de los estadísticos dDDH obtenidos con TYGS

Cepa	Cepa contrastada	dDDH (d4, in %)	C.I. (d4, in %)	Diferencia de contenido G+C (%)
OX4-8C	<i>Arthrobacter mangrovi</i> NBRC 112813	39	[36.5 - 41.5]	3.7
	<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i> DSM 420	35.1	[32.6 - 37.6]	1.18
	<i>Arthrobacter ramosus</i> JCM 1334	35.1	[32.7 - 37.6]	0.74
CHJM-1	<i>Sphingomonas dokdonensis</i> DSM 21029	29.5	[27.1 - 32.0]	23.61
	<i>Sphingomonas mucosissima</i> DSM 17494	29.2	[26.9 - 31.7]	0.61
	<i>Sphingomonas jeddahensis</i> G39T	28.8	[26.4 - 31.3]	1.37
CK4-1	<i>Paenarthrobacter ureafaciens</i> DSM 20126	25.1	[22.8 - 27.6]	0.14
	<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i> DSM 420	24.1	[21.8 - 26.6]	0.43
	<i>Paenarthrobacter histidinovorans</i> JCM 2520	24	[21.7 - 26.5]	0.63
OX1-1	<i>Stenotrophomonas geniculata</i> JCM 13324	82.1	[79.3 - 84.7]	0.32
	<i>Stenotrophomonas hibiscicola</i> ATCC 19867	55.4	[52.7 - 58.1]	0.58
	<i>Stenotrophomonas africana</i> LMG 22072	52.2	[49.6 - 54.9]	0.45
CK1-3C	6 S21 K33.contigs.fa'	100	[100.0 - 100.0]	0
	<i>Agrobacterium pusense</i> LMG 25623	86.5	[83.9 - 88.8]	0.04
CHGM7-2	<i>Agrobacterium pusense</i> LMG 25623	86.5	[83.9 - 88.8]	0.04
	<i>Agrobacterium leguminum</i> MOPV5	35.5	[33.0 - 38.0]	0.73

8.8. ENSAYO PRELIMAR EN PROBETAS LITOTIPO CONCHUELA

Los resultados obtenidos durante el tiempo de exposición (21 días) fueron discretos, observándose solo cambios visuales al estereoscopio en las probetas tratadas con las cepas *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) y *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) utilizando el medio M-3P (Fig. 50 y 51). Asimismo, se obtuvieron resultados positivos en el litotipo tratado con el medio B4M y la cepa CHL4-1, (Fig. 52). Cabe resaltar que las cepas *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) y *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) demostraron resultados destacados durante todo el proceso experimental, incluso en medios de cultivo donde algunas cepas no crecieron, como es el caso del CCP. Las demás cepas: OX1-1, CK4-1, CK1-3C, CHGM1-1, CHGM7-2 y OX4-8A aparentemente no realizaron cambios visibles en la roca durante ese período de tiempo.

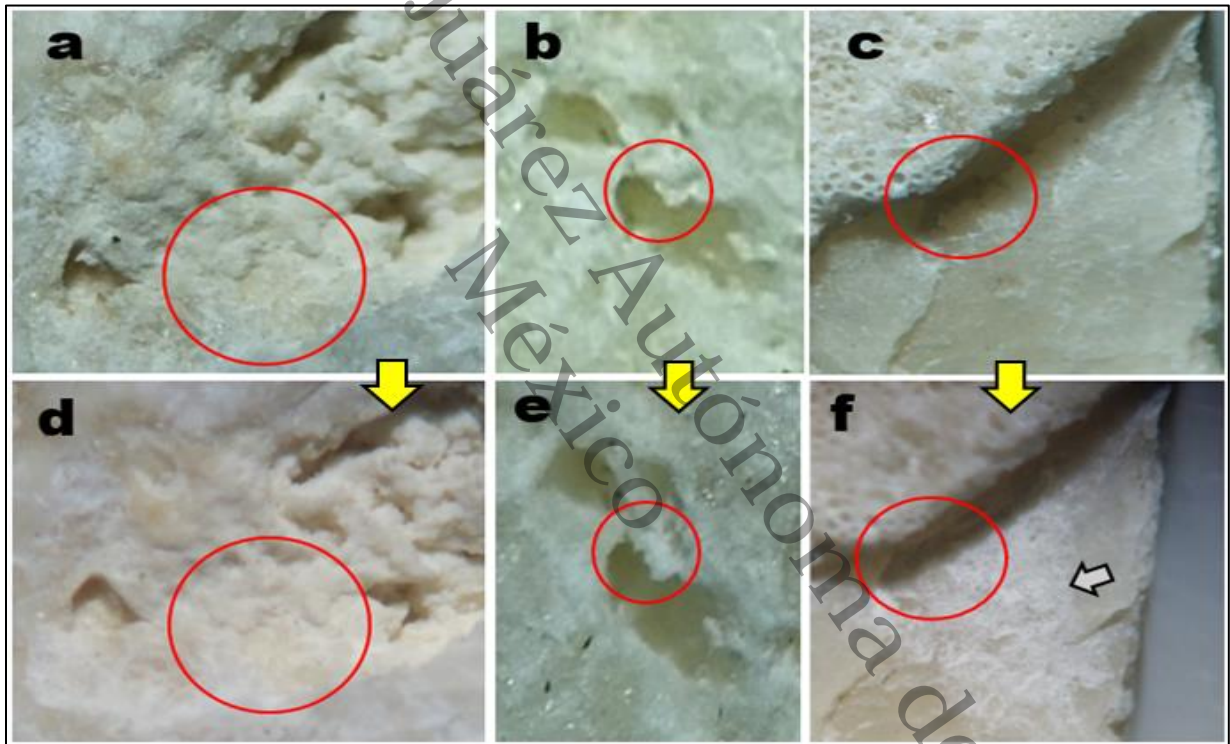


Figura 50. Cambios inducidos por *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) en M-3P en probetas de litotipo conchuela tratadas (21 días), puntos de interés en círculo rojo. La fila superior (a, b y c) muestran las condiciones iniciales del litotipo antes del biotratamiento, mientras que fila inferior (d, e y f) presenta las observaciones tras el biotratamiento. **d)** Se evidencia una suavización del relieve, en **e)** se observa la formación de un nuevo material sobre la superficie y un brillo alrededor de los poros previamente inexistente y en **f)** se aprecia una disminución del tamaño del poro, junto con un blanqueamiento visible en una zona extensa de la roca (indicado por la flecha).

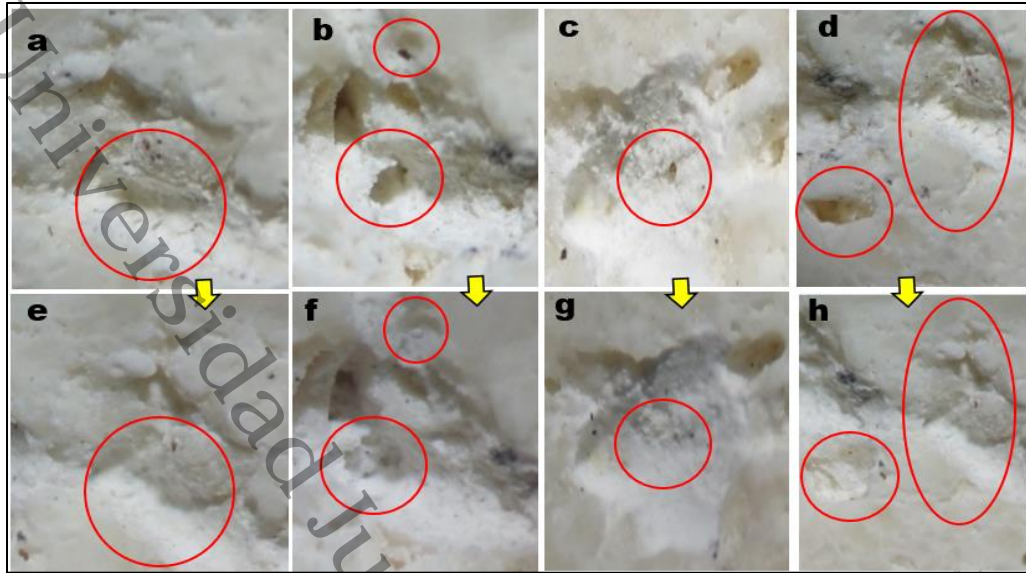


Figura 51. Cambios inducidos por *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) sobre litotipo conchuela en medio M-3P (21 días) en círculo rojo los puntos de interés. La fila superior (**a**, **b**, **c** y **d**) son antes del biotratamiento, y las de la fila inferior (**e**, **f**, **g** y **h**) después del biotratamiento. En la imagen **e**) vemos una suavización del relieve, en **f**) se observa un cierre de poros, en **g**) cierre de poro, y en **h**) cierre de poro y suavización del relieve.

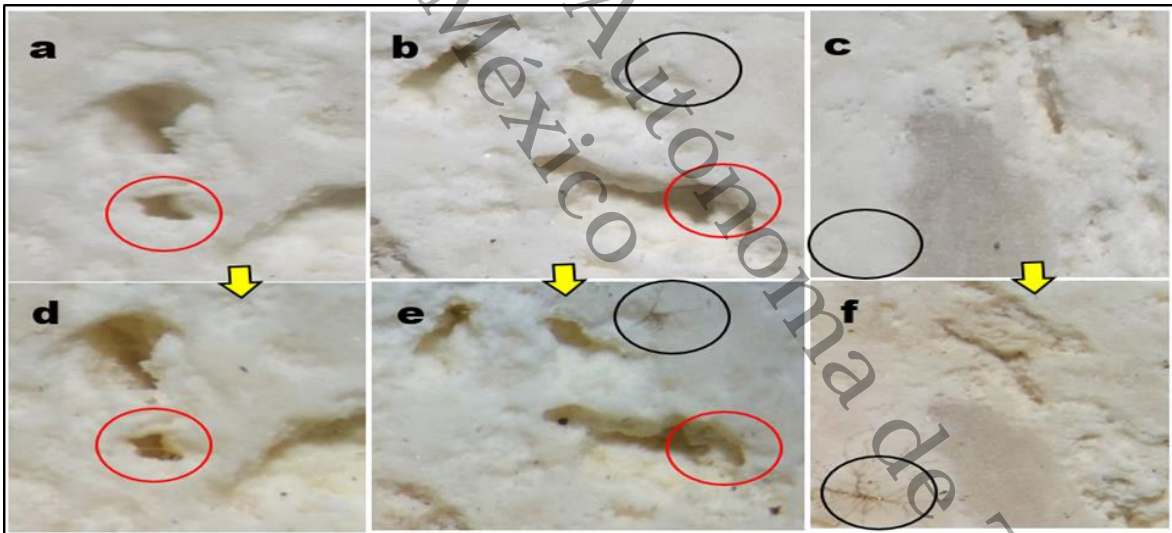


Figura 52. Cambio inducido por la cepa CHL4-1, sobre la probeta litotipo conchuela en medio B4M (21 días). Las fotografías de la fila superior (**a**, **b**, y **c**) son antes del biotratamiento, y las de la fila inferior (**d**, **e**, y **f**) después del biotratamiento. En la imagen **d**) vemos síntesis de material, en **e**) en el círculo rojo, se observa síntesis de material y en el círculo negro la proliferación de un hongo, y en **f**) se aprecia a más detalle como el medio B4M favorece el crecimiento de microorganismos biodeteriorantes.

8.9. ENSAYOS DE BIOCONSOLIDACIÓN IN SITU

Se seleccionaron las cepas *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) y *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) para la exposición natural de las probetas de roca calcárea en los sitios arqueológicos de Oxpemul y

Chichén Itzá, basados en: crecimiento eficiente en medio oligotrófico, síntesis significativa de cristales (tanto en los medios agarizados, como en los líquidos), resultados favorables en bioconsolidación (arena y sascab), buen desempeño en el bioensayo con litotipo conchuela, viabilidad celular alta, movilidad (dispersión de cristales por toda la caja de Petri) y ausencia de pigmentación en los sustratos.

Las 70 probetas de litotipo Chichén Itzá con las dos bacterias inoculadas fueron instaladas en los sitios arqueológicos y posteriormente retiradas en el mes de mayo de 2024, después de seis meses de exposición. Debido al proceso de erosión de la roca bajo condiciones ambientales naturales, se realizó una comparación del peso antes y después del tratamiento y exposición, calculando el promedio de masa perdida, expresado en gramos, para cada tratamiento y sitio de muestreo. El peso promedio inicial de cada probeta de roca era aproximadamente 3,2 g. En todas las rocas se observó pérdida de masa, con excepción de una probeta sometida al tratamiento con la bacteria *Arthrobacter* sp.(OX4-8C) + M-3P en Oxpemul, donde no se registró pérdida aparente de masa (Fig. 53). En general, en Oxpemul los tratamientos con bacterias mostraron mejores resultados en términos de conservación de la masa, en comparación con los controles, destacando la bacteria *Arthrobacter* sp.(OX4-8C) como la más efectiva.

En Chichén Itzá, la mayor pérdida de masa se registró en los litotipos inoculados con *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) en TSB (0.029 mg), seguido del control con nanopartícula CZ y *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) en TSB (ambos con 0.028 mg). Por otro lado, los tratamientos con *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) (0.023 mg) y *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) (0.024 mg), ambos con M-3P, presentaron las menores pérdidas, evidenciando su efectividad. En ambos sitios, los tratamientos con M-3P como vehículo de inoculación de las bacterias fueron los más efectivos para minimizar la pérdida de masa (Fig. 53).

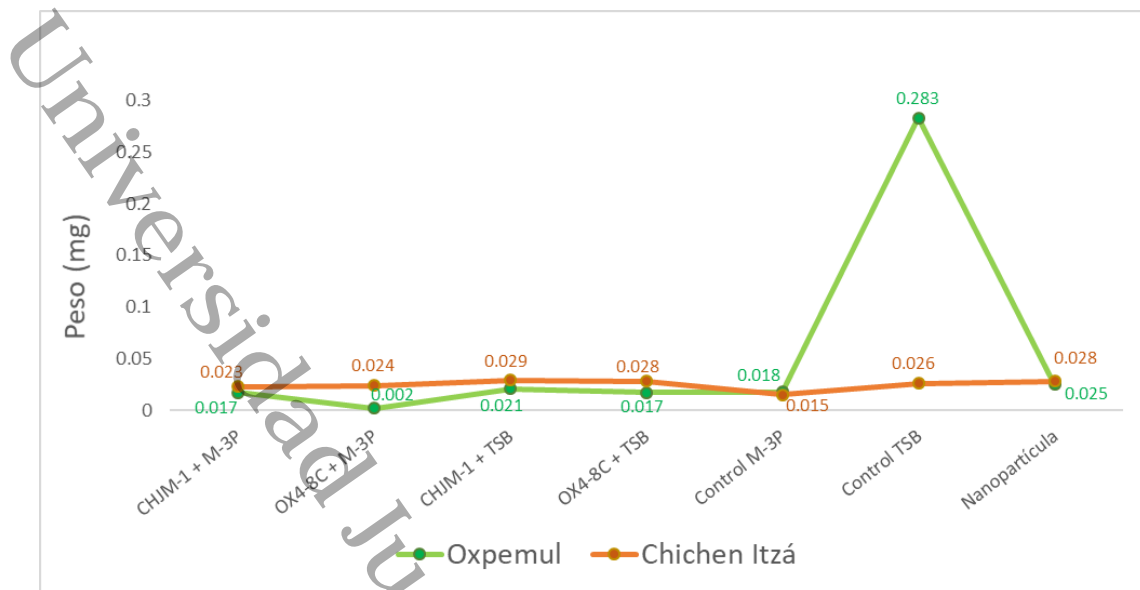


Figura 53. Pérdida de masa por tratamiento y sitio de exposición.

8.10. ANÁLISIS AL ESTEREOSCOPIO Y EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.

Se llevaron a cabo comparaciones entre las probetas de roca con las imágenes tomadas antes y después de la exposición, para determinar cambio en los litotipos. Inicialmente se observó que algunas rocas presentaban material del ambiente, con fragmentos oscuros en la superficie (Fig. 54a) y en ocasiones partículas depositadas en los poros (Fig. 54b). Esto se atribuyó a la interacción de los litotipos con el lugar de exposición. Además, fue claro que las probetas retiradas del sitio arqueológico de Chichén Itzá mostraban evidencia de erosión (Fig. 54c); también se observó la proliferación de microalgas y hongos en la superficie de las probetas con el tratamiento control TSB, tanto en las retiradas de Chichén Itzá como de Oxpemul (Fig. 54d), destacando que las probetas sin ningún tipo de tratamiento son altamente susceptibles a la colonización de microorganismos dañinos.

En las observaciones detalladas por tratamiento y sitio arqueológico, se visualizaron cambios en las probetas de roca con los tratamientos bacterianos (*Arthrobacter* sp. (OX4-8C) y *Sphingomonas* sp. (CHJM-1), en ambos medios (M-3P y TSB), y en menor medida en los tratamientos con solo medio M-3P (sin bacteria). Aunque a diferencia de la colonización por 21 días en condiciones ambientales de la ciudad de Villahermosa, los resultados observados no fueron más relevantes (Fig. 55 a 57). Después de los seis meses de exposición lo que se visualizó fue una bioconsolidación discreta pero consistente, sin descartar la posibilidad de que las

bacterias se hayan alojado internamente en los poros, donde es difícil visualizar los resultados al estereoscopio.

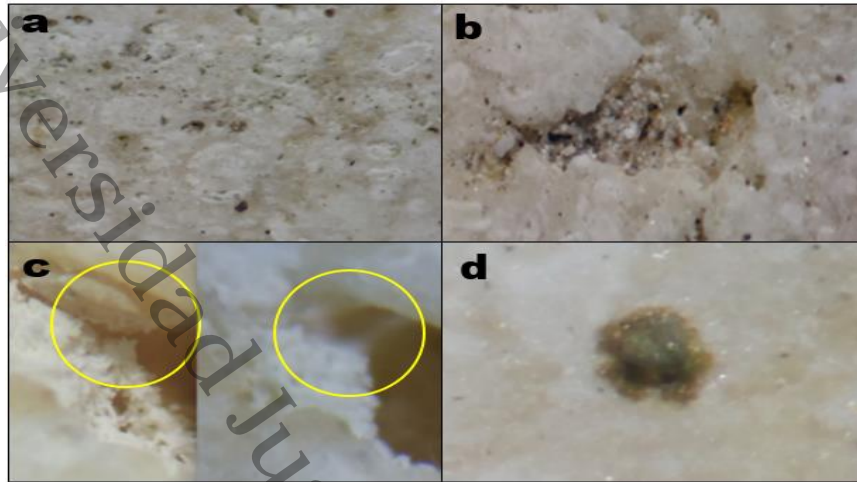


Figura 54. Observaciones en litotipos Chichén Itzá expuesto por seis meses, **a)** y **b)** fragmentos oscuros en la superficie y en los poros de algunas probetas de roca. **c)** Áreas erosionadas **d)**. Crecimiento de microorganismo exógeno en probetas control TSB.

Entre las observaciones realizadas se identificaron recubrimiento de poros, síntesis de material (masa donde antes no había), elevaciones y suavización de la superficie en algunos lugares del litotipo principalmente en la zona matriz micrítica (más blanda) y en algunos casos se notaban a simple vista brillos superficiales. Los mejores resultados se obtuvieron en las probetas expuestas en el sitio arqueológico de Oxpemul, especialmente cuando las bacterias se inocularon usando como vehículo el medio M-3P, sin embargo, la cepa *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) demostró resultados muy similares cuando se encontraba sola (Fig. 55). Se realizó un cuidadoso control para considerar únicamente aquellas observaciones donde el acoplamiento de material era muy evidente, descartando casos donde el relleno de poros pueda atribuirse a residuos desprendidos o alojados por azar.

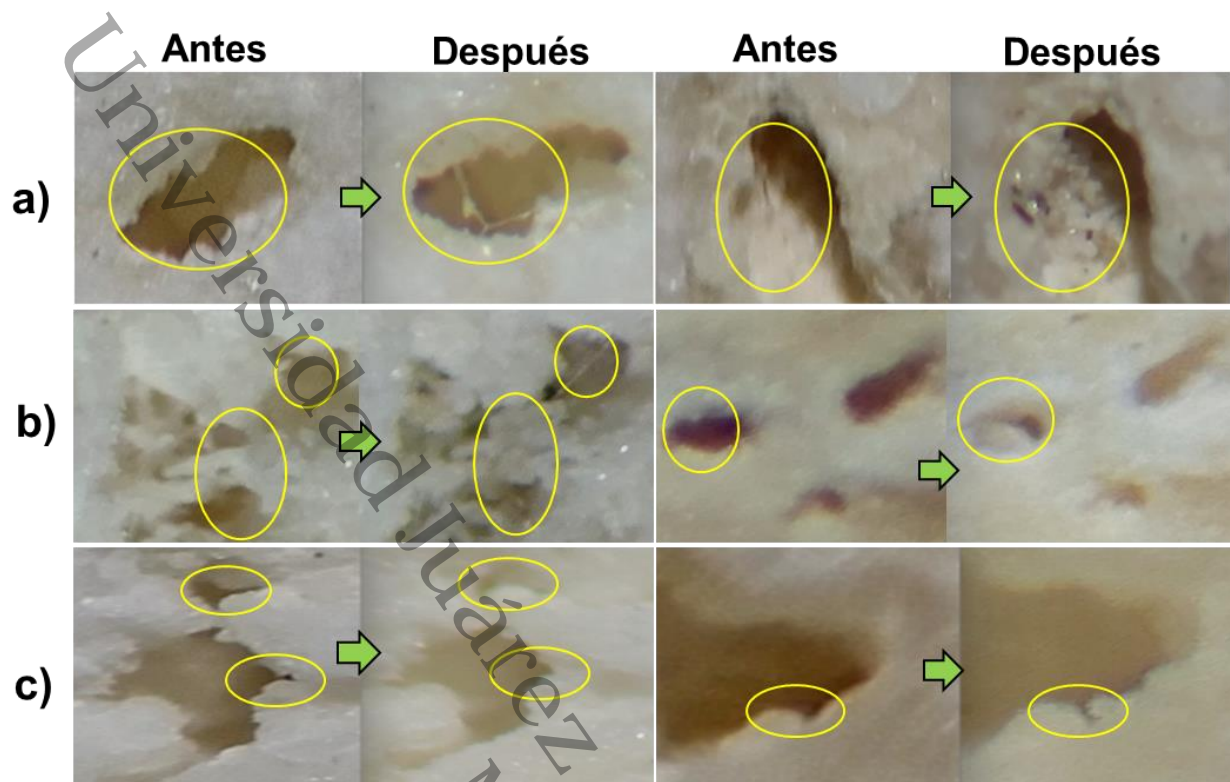


Figura 55. Observaciones al estereoscopio de las probetas con el tratamiento **a)** *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) + M3-P. **b)** *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) + TSB antes y después de 6 meses de exposición ambiental en el sitio arqueológico de Oxpemul. **c)** tratamiento *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) + M3-P. Comparación del litotipo antes y después de 6 meses de exposición ambiental en el sitio arqueológico de Chichén Itzá.

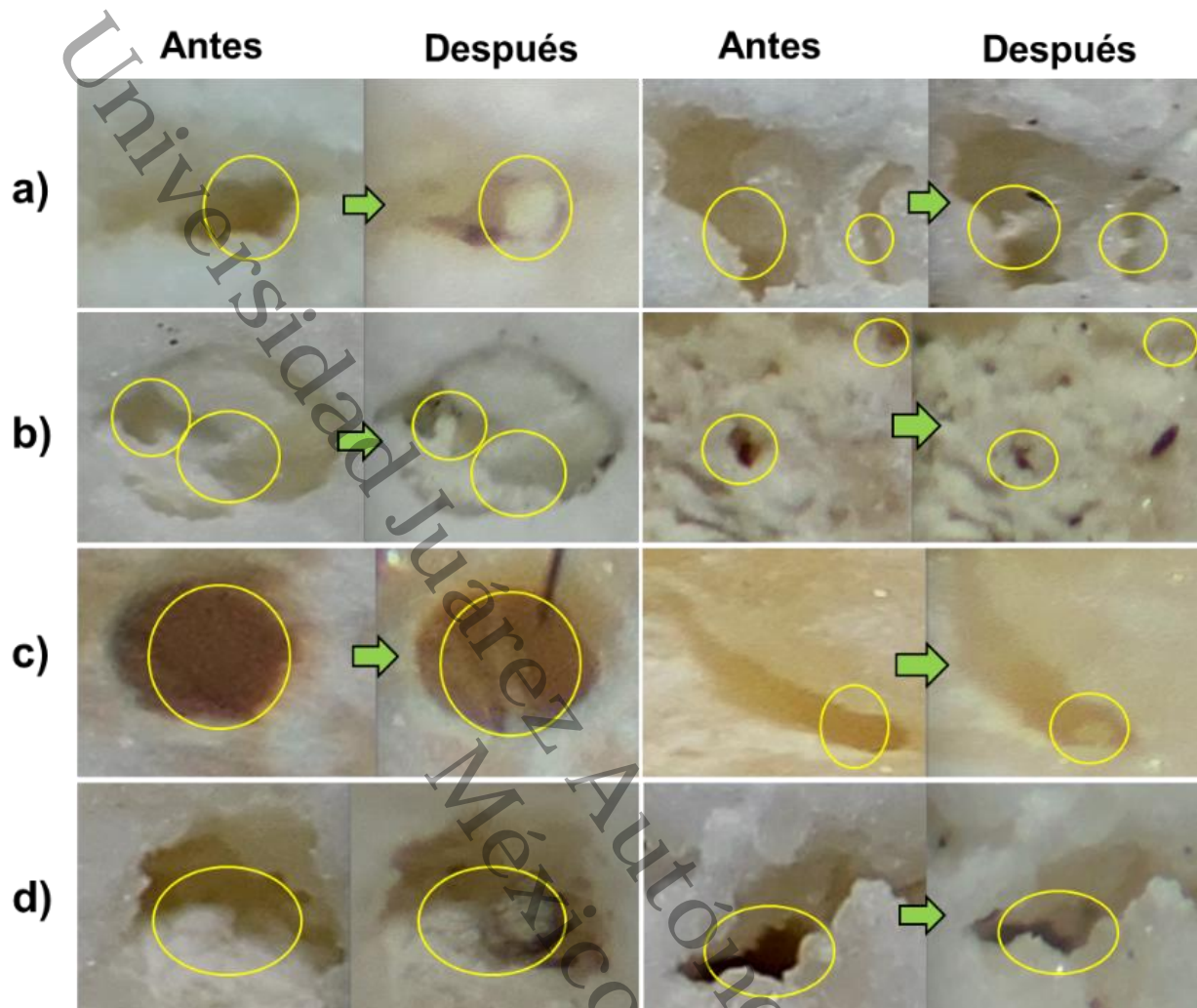


Figura 56. Observaciones al estereoscopio de las probetas con el tratamiento **a)** *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) + M-3P. Comparación del litotipo antes y después de 6 meses de exposición ambiental en el sitio arqueológico de Oxpemul. **b)** *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) + TSB. Comparación del litotipo antes y después de 6 meses de exposición ambiental en el sitio arqueológico de Oxpemul. **c)** *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) + TSB. Comparación del litotipo antes y después de 6 meses de exposición ambiental en el sitio arqueológico de Chichen Itzá **d)** con el tratamiento M3-P solo. Comparación del litotipo antes y después de 6 meses de exposición ambiental en el sitio arqueológico de Oxpemul.

OBSERVACIONES SEM

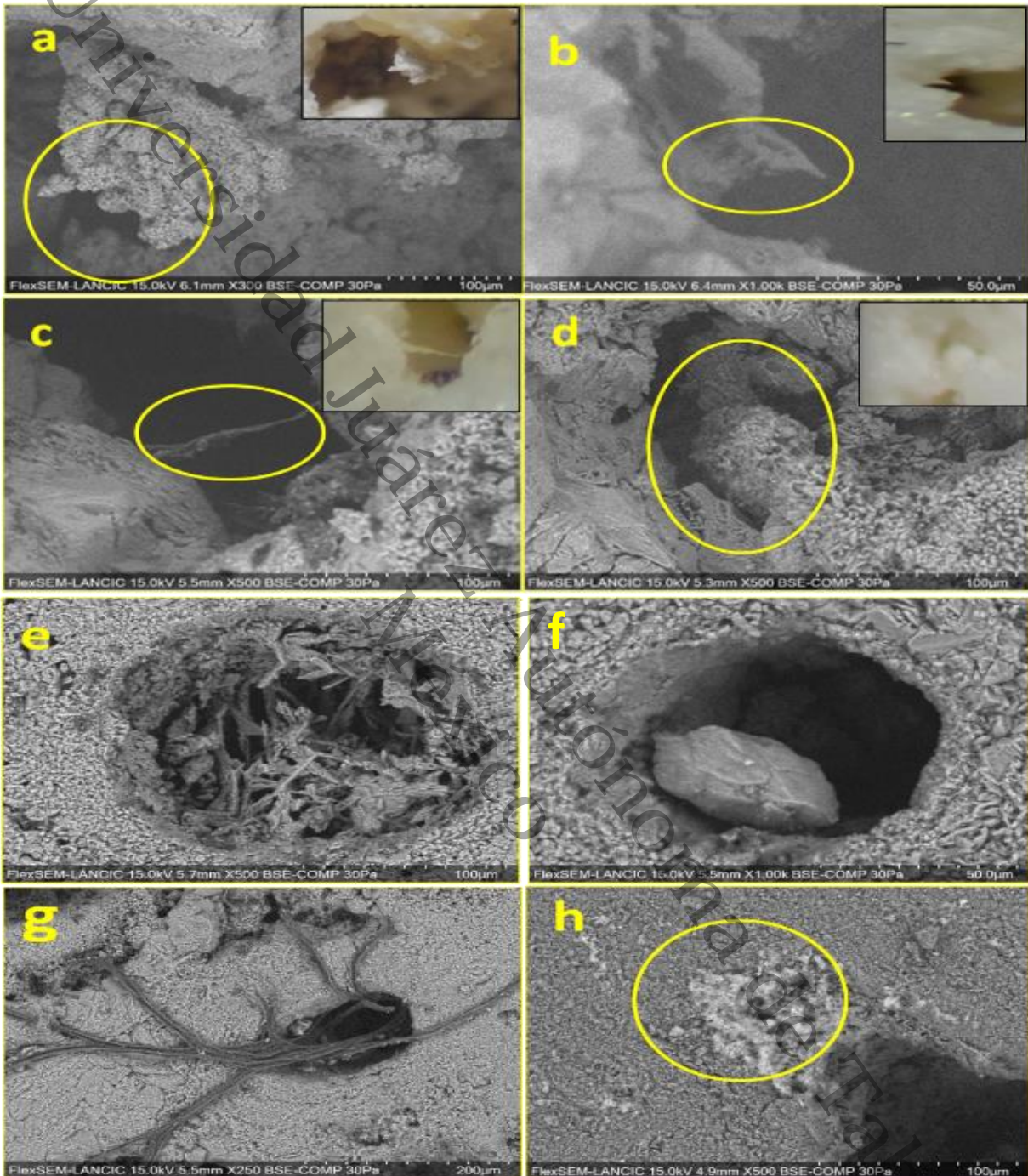


Figura 57. Observaciones en SEM (en el círculo amarillo, puntos de interés) **a)** y **b)** Tratamiento bacteria *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) + M3-P de Oxpemul **c)** tratamiento bacteria *Spingomonas* sp. (CHJM1) + M3-P de Oxpemul **d)** tratamiento bacteria *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) + M3-P de Chichén Itzá **e)** y **f)** Tratamiento bacteria *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) + TSB de Oxpemul (en la que se ve un acoplamiento de material en e, mientras que en la f se nota un depósito de algún residuo externo) **g)** Crecimiento de microorganismo exógeno en tratamiento control TSB **h)** residuos blancos en tratamiento con nanopartícula.

8.11. PRUEBAS FÍSICO MECÁNICAS

8.11.1. RUGOSIDAD

Se realizó una comparación de rugosidad (Ra) entre tratamientos y entre los sitios de exposición. Como se muestra en la figura 58, las probetas expuestas en el sitio arqueológico de Chichén Itzá presentan una mayor rugosidad, especialmente aquellas asperjadas con las bacterias (y siendo más pronunciada cuando éstas se encontraban estimuladas con el medio M-3P). En contraste, los controles mostraron una menor rugosidad. En el caso de las probetas expuestas en Oxpemul, se observó una mayor rugosidad en las asperjadas con el control M-3P (medio estimulante) y con *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) + M-3P.

Además, se hizo una comparación por sitio de exposición, entre la rugosidad de las probetas en ambas caras del litotipo, es decir, la rugosidad en la cara donde se asperjó el tratamiento (anverso), y la rugosidad en la cara sin el tratamiento (reverso), utilizando esta última como control interno (Fig. 59): analizando la rugosidad de cada probeta consigo misma. Se puede apreciar una mayor rugosidad en la cara del tratamiento *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) con M-3P, la nanopartícula CZ y el medio estimulante M-3P en el sitio arqueológico de Oxpemul. Por otro lado, en Chichén Itzá se presentó una mayor rugosidad en la cara de los tratamientos bacterianos, excepto en CHJM-1 + TSB (Fig. 59).

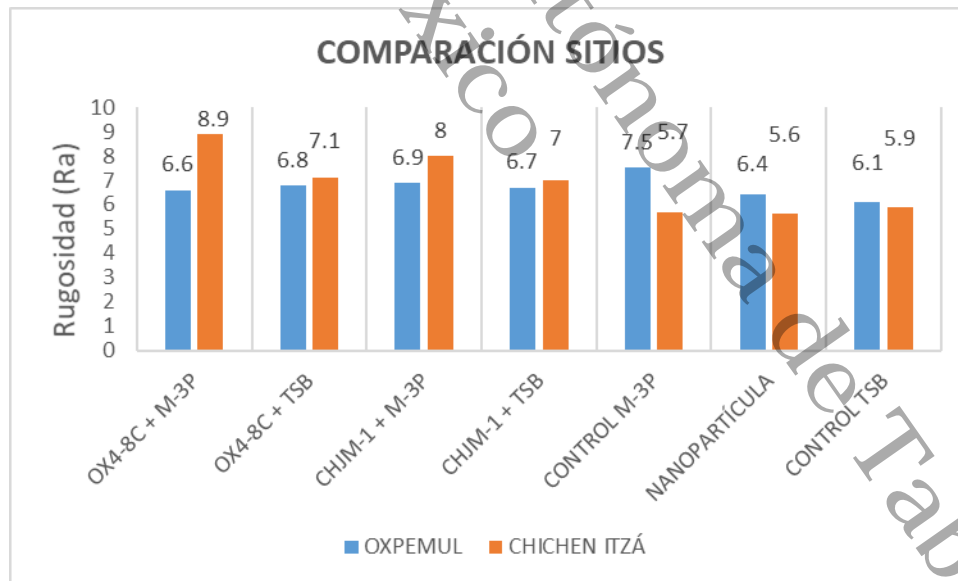


Figura 58. Comparación de rugosidad entre tratamientos y sitios de exposición.

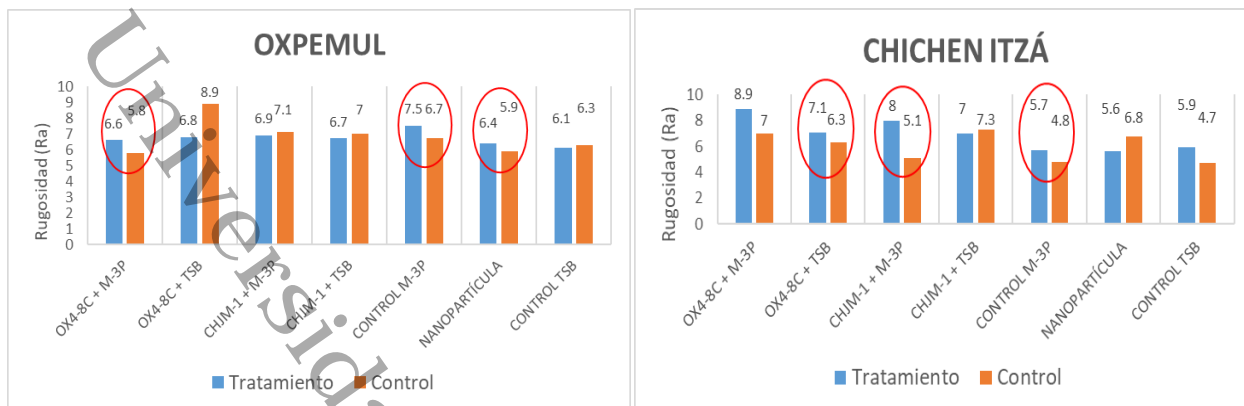


Figura 59. Comparación de rugosidad entre tratamientos por sitio de exposición con respecto al control litotipo (reverso de la roca sin tratamiento). En círculo donde se aprecia la mayor rugosidad del lado del tratamiento.

8.11.2. DUREZA SUPERFICIAL

En cuanto a la dureza superficial, los tratamientos asperjados con las nanopartículas de CZ, el control inoculado solo con TSB, y la cepa *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) en M-3P mostraron mayor dureza en las probetas expuestas en Oxpemul. Por otro lado, en las expuestas en Chichén Itzá, el control TSB, y la cepa *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) con TSB, fueron los tratamientos que mostraron una mayor resistencia (Fig. 60).

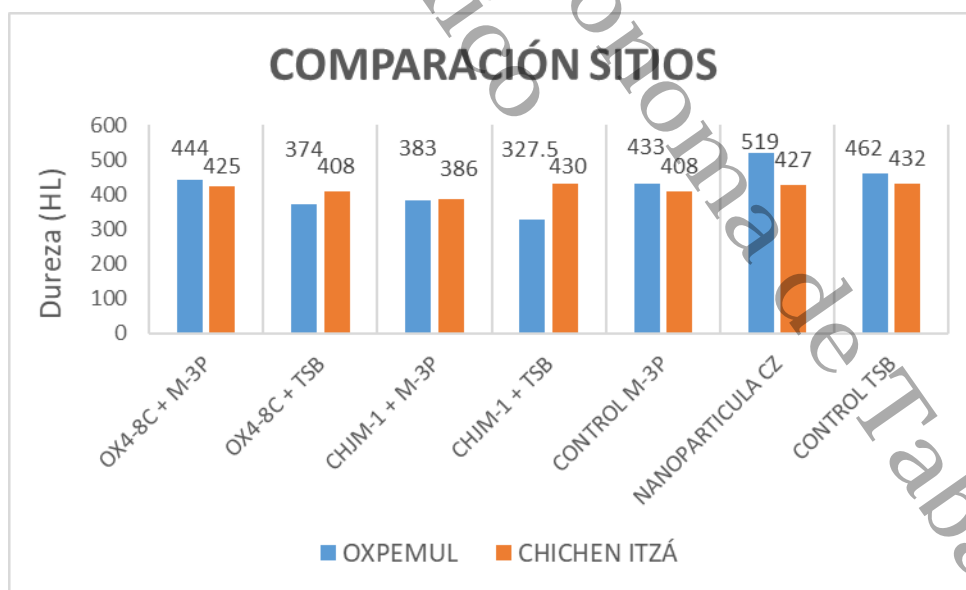


Figura 60. Comparación de dureza superficial entre tratamientos y sitios de exposición.

De igual forma se hizo una comparación (por sitio de exposición) de la dureza superficial en ambas caras del litotipo, es decir, donde se asperjó el tratamiento (anverso), y en la cara sin el tratamiento (reverso) como control (Fig. 61). Los resultados muestran una mayor dureza superficial en el tratamiento con la nanopartícula CZ y el medio oligotrófico TSB, así como en los tratamientos con ambas bacterias en el medio M-3P en el sitio arqueológico de Oxpemul, mientras que hay mayor resistencia en los tratamientos con *Arthrobacter* sp (OX4-8C) en M-3P y la nanopartícula CZ en Chichén Itzá.

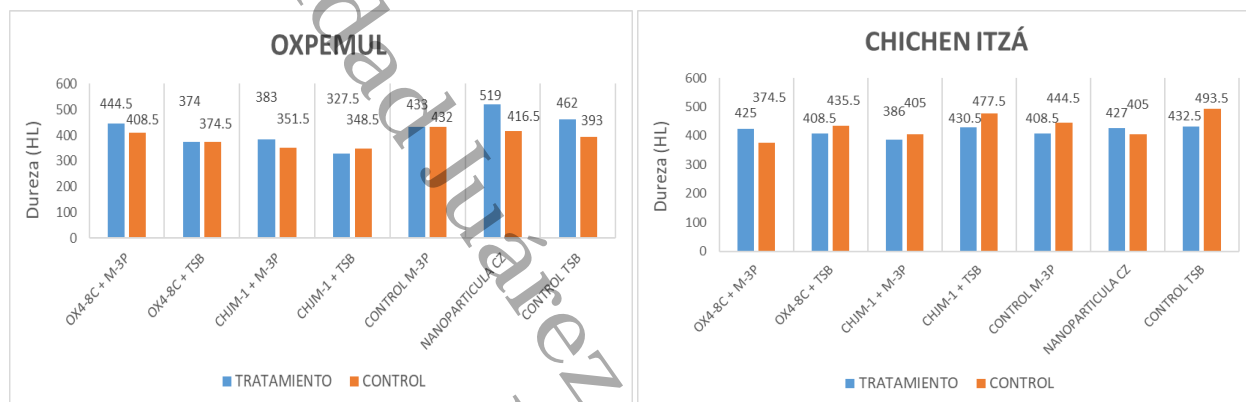


Figura 61. Comparación de dureza superficial entre tratamientos por sitio de exposición con respecto al control litotipo (reverso de la roca sin tratamiento). En círculo donde se aprecia una mayor dureza del lado del tratamiento.

8.11.3. VELOCIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA

Se realizaron análisis por triplicado para medir la velocidad de absorción de agua en las probetas, comparando las diferencias en el tiempo de absorción (en segundos) según los tratamientos aplicados y evaluando la variación entre los sitios de exposición. Los resultados mostraron una velocidad más lenta de absorción en el control TSB en ambos sitios. Además, se observó una absorción lenta en las probetas con la bacteria *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) + TSB después de la exposición en el sitio de Chichén Itzá (Fig. 62). También se hizo una comparación entre el anverso de las probetas (con tratamiento) y el reverso de la misma (sin tratamiento), utilizándolas como control interno, donde se evidenció una absorción más lenta en la cara donde se aplicaron los tratamientos, para ambos sitios (Fig. 63)

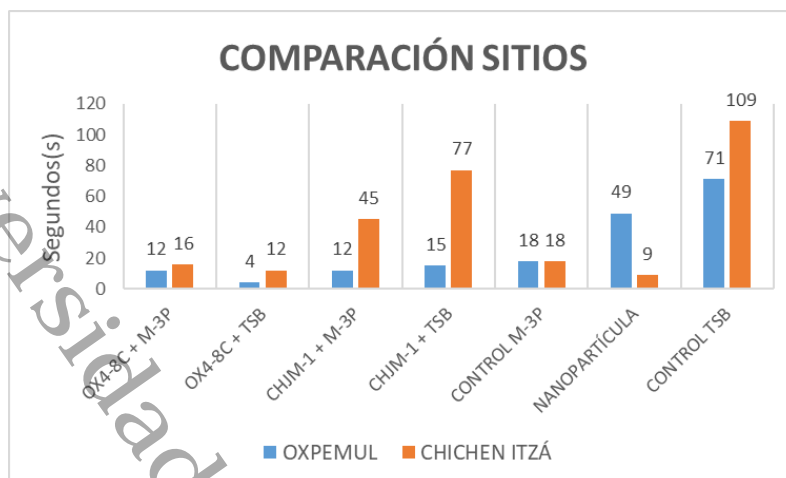


Figura 62. Comparación de la velocidad de absorción de agua (expresada en segundos) entre tratamientos y sitios de exposición.

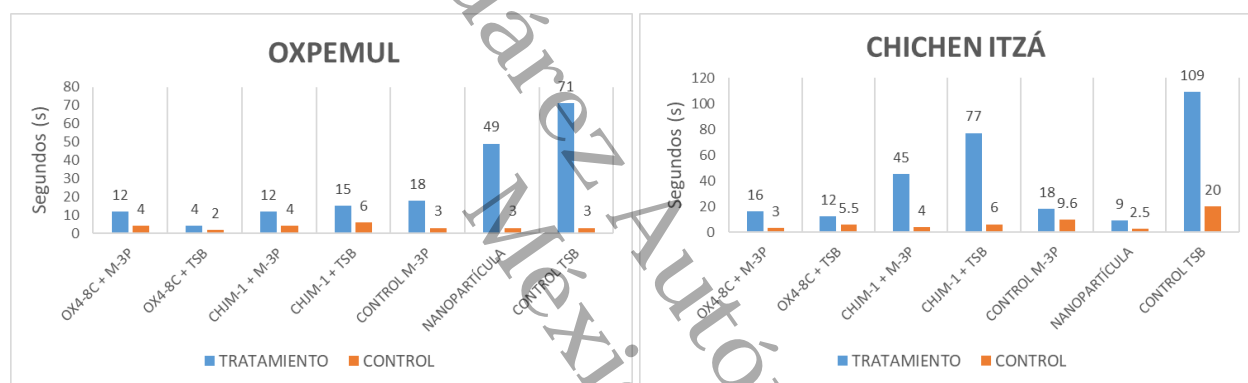


Figura 63. Comparación de velocidad de absorción de agua (en segundos) entre tratamientos por sitio de exposición con respecto al control litotipo (reverso de la roca sin tratamiento).

8.11.4. COLORIMETRÍA

Se hicieron mediciones de cada tratamiento por triplicado (42 probetas), 21 probetas del sitio arqueológico de Oxpemul y 21 del sitio arqueológico de Chichén Itzá, en ambas caras de las probetas: anverso (donde se aplicó el tratamiento) y reverso (sin tratamiento), como punto de comparación. Así como se comparó las variaciones de color antes y después del tratamiento para los litotipos expuestos en Chichén Itzá.

Los resultados de la evaluación de colorimetría en las probetas tratadas y expuestas en los sitios arqueológicos de Oxpemul y Chichén Itzá, comparando las variaciones de color entre las caras tratadas y reversas, así como los cambios antes y después de la exposición se muestran en la Figura 64. Los tratamientos con *Arthrobacter* sp. y *Sphingomonas* sp. en combinación con M-3P

presentan valores más altos de ΔE^* , lo que indica una mayor diferencia en la coloración con respecto al reverso de la probeta (Fig. 64 a y b). En ambos sitios, la nanopartícula muestra la mayor variación de color, lo que sugiere un impacto más notable en la superficie por los cambios cromáticos que genera la aplicación de las nanos. En los gráficos inferiores, la comparación en Chichén Itzá antes y después de la exposición evidencia que los tratamientos con bacterias y M-3P mantienen la tendencia de mayor variación cromática, mientras que el control y la NP presentan los valores más elevados de ΔE^* , lo que indica que estos experimentaron muestran cambios visualmente perceptibles tras la exposición. Los gráficos de coordenadas de color (CIE Lab) muestran un desplazamiento en la zona marcada en amarillo, confirmando la variación en los parámetros cromáticos. De manera general, los tratamientos con bacterias y M-3P muestran alteraciones en la coloración posiblemente relacionadas con procesos de bioprecipitación de carbonatos, mientras que la nanopartícula exhibe la mayor variación de color, lo que sugiere una posible alteración física o química más pronunciada en la superficie de la roca.

Los valores de ΔC^* (variación en la croma) permiten evaluar los cambios en la saturación del color tras la aplicación de los tratamientos. En general, se observó que los tratamientos bacterianos en combinación con M-3P (especialmente *Arthrobacter* sp. + M-3P y *Sphingomonas* sp. + M-3P) presentaron valores moderados a elevados de ΔC^* , tanto en Oxpemul como en Chichén Itzá, indicando un incremento en la intensidad del color en la superficie tratada. En contraste, el tratamiento con nanopartículas mostró valores de ΔC^* relativamente bajos en comparación con los de ΔE^* , lo cual sugiere que el cambio visual asociado fue más por alteración general del color (como aclaramiento u oscurecimiento) y no tanto por una modificación de la croma.

La comparación entre cara tratada y reverso evidenció que las diferencias en croma fueron más marcadas en Oxpemul, mientras que en Chichén Itzá los valores de ΔC^* se mantuvieron más homogéneos entre tratamientos. Por su parte, el análisis antes y después de la exposición en Chichén Itzá mostró un patrón consistente de incremento en ΔC^* en la mayoría de los tratamientos, lo que indica que las condiciones ambientales favorecieron procesos que intensificaron la tonalidad del color de las probetas.

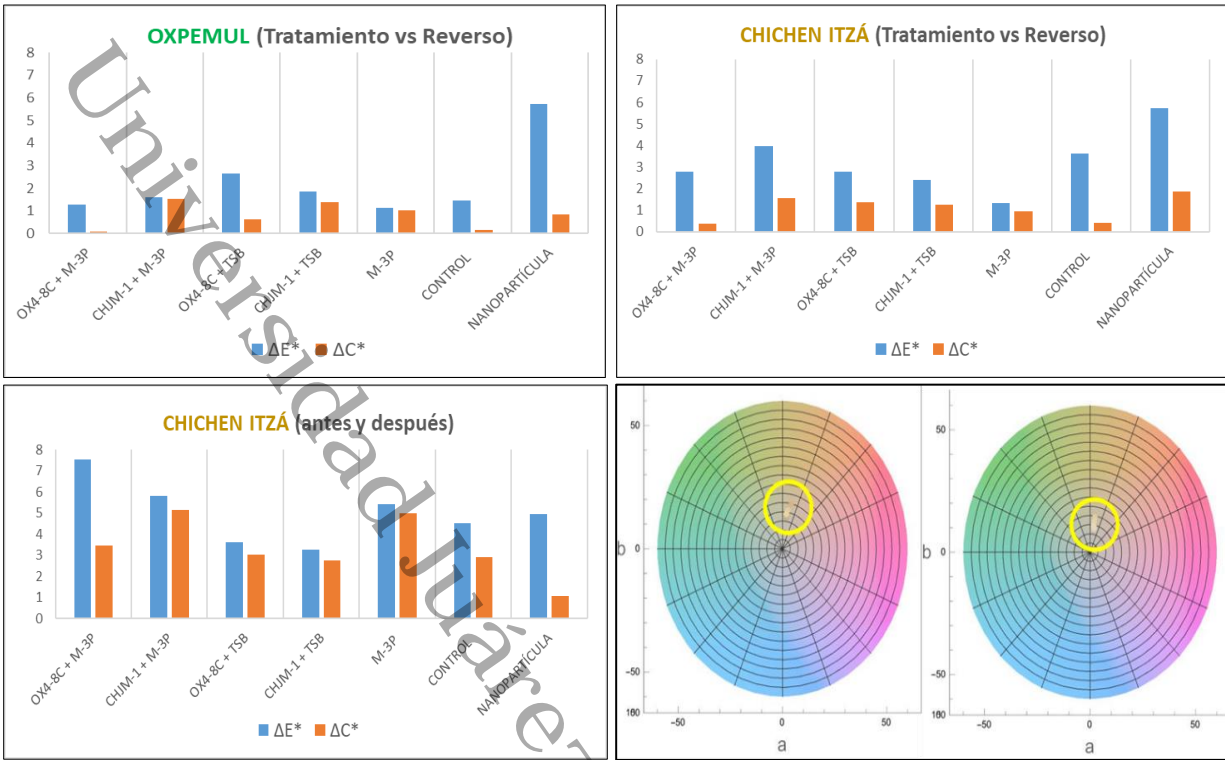


Figura 64. Colorimetría en probetas tratadas y expuestas en Oxpemul y Chichén Itzá. Comparación entre la cara tratada y el reverso en probetas de los sitios **a)** Oxpemul y **b)** Chichén Itzá, así como cambios antes y después de la exposición en Chichén Itzá **(c)**. **d)** diagramas de coordenadas cromáticas (CIE Lab) en el tratamiento con bacteria OX4-8C + M3-P antes (izquierda) y después (derecha) de la exposición en Chichén Itzá.

8.11.5. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER.

Los espectros mediante FTIR para las probetas expuestas en Oxpemul y Chichén Itzá revelan la presencia de grupos funcionales característicos de los carbonatos y otros compuestos minerales asociados a la bioprecipitación y la interacción ambiental (Fig. 65 a y b). En ambos sitios se identificaron bandas características del CaCO_3 en 879 cm^{-1} y 1426 cm^{-1} , asociadas con la vibración de flexión y el estiramiento asimétrico del anión carbonato (CO_3^{2-}), respectivamente, lo que indica la presencia de calcita y aragonita. Además, se registraron señales en 1956 cm^{-1} correspondientes a la vibración $\text{C}=\text{O}$ de compuestos con estrés estructural y en 1537 cm^{-1} , asociadas con la vibración de estiramiento asimétrico de grupos carboxilo ($-\text{COO}^-$) o bandas de carbonatos en muestras minerales. Se observó la presencia de CO_2 adsorbido en la superficie de los carbonatos en 2136 cm^{-1} y 2390 cm^{-1} , mientras que la banda en 2715 cm^{-1} , relacionada con la presencia de grupos $-\text{CHO}$ de aldehídos, sugiere actividad microbiana. Asimismo, la señal

en 3790 cm^{-1} indica la presencia de grupos -OH, asociados con agua absorbida en la estructura mineral.

Al comparar los tratamientos aplicados en cada sitio, se observó que los espectros de las probetas tratadas con bacterias en combinación con M-3P presentan una mayor definición e intensidad en las bandas características de los carbonatos en comparación con los controles y las muestras tratadas solo con M-3P. Esto sugiere una mayor actividad biomineralizante en los tratamientos con bacterias, promoviendo la precipitación de CaCO_3 en la roca. En contraste, los controles y las probetas tratadas solo con M-3P mostraron señales más difusas, lo que indica que los procesos de carbonatogénesis en ausencia de bacterias podrían deberse a la interacción natural de la roca con su entorno y a procesos de colonización iniciales, más que a una bioprecipitación activa.

En la comparación entre los dos sitios arqueológicos, se observa una mayor intensidad en las bandas de carbonatos en las probetas de Oxpemul, en especial en los tratamientos con *Arthrobacter* sp. + M-3P y *Sphingomonas* sp. + M-3P, lo que indica una mayor deposición mineral en este sitio en comparación con Chichén Itzá. Esta diferencia puede atribuirse a variaciones en las condiciones ambientales, como la humedad, la temperatura y la disponibilidad de calcio en la roca. Por otro lado, los espectros de las muestras de Chichén Itzá presentan una mayor presencia de señales en la región de los compuestos orgánicos, lo que sugiere un mayor impacto de la colonización natural en la roca expuesta a este ambiente.

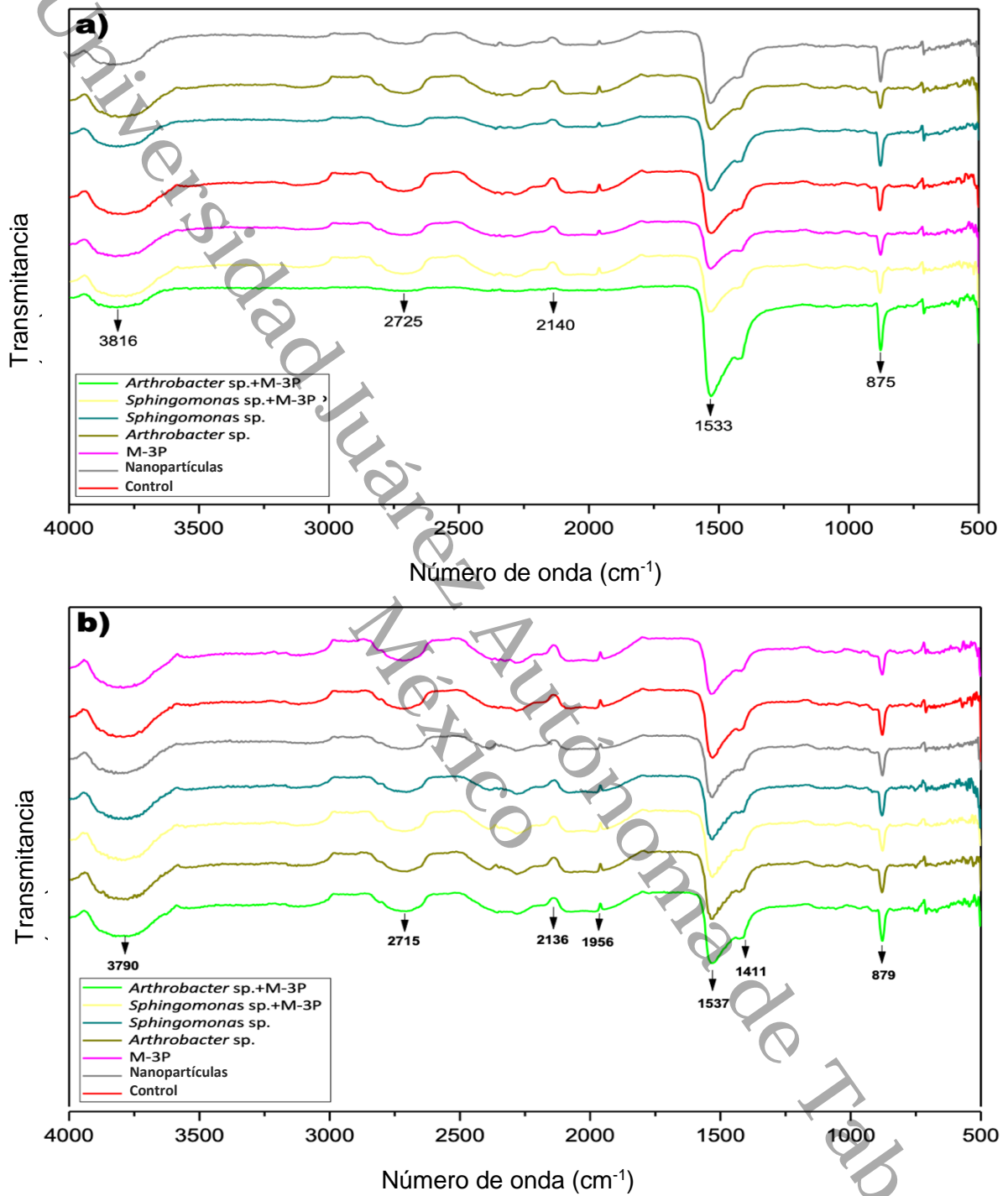


Figura 65. Espectros FTIR de las probetas expuestas en los sitios arqueológicos de **a)** Oxpemul y **b)** Chichén Itzá, comparando los diferentes tratamientos aplicados.

9. DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que en los sitios arqueológicos mayas del sur de México residen una gran diversidad de bacterias con capacidad carbonatogénica. De las 114 cepas aisladas, 83 (72%) mostraron actividad biomineralizante. Entre estas, 25 cepas produjeron simultáneamente 2 o 3 tipos de cristales en distintos medios de cultivo, mientras que 24 cepas demostraron actividad mineralizante en el medio oligotrófico (AEMC), lo cual representa una ventaja significativa en la biorestauración de patrimonio edificado, dado que las rocas constituyen ambientes caracterizados por la limitación de nutrientes. La biomineralización del CaCO_3 ocurre debido a la actividad de enzimas bacterianas, como la ureasa o la anhidrasa carbónica, que generan modificaciones químicas en el medio ambiente al liberar compuestos como el amoníaco, lo que conduce a un aumento en el pH. Estas condiciones facilitan la precipitación de cristales de CaCO_3 a partir de los iones calcio (Ca^{2+}) y carbonato (CO_3^{2-}) presentes en el entorno (Chaparro-Acuña et al., 2018 y Omoregie et al., 2018).

En los experimentos realizados en laboratorio, los iones Ca^{2+} fueron aportados por diferentes fuentes dependiendo el medio de cultivo: el carbonato de calcio en el medio AEMC, el acetato de calcio en los medios M-3P y B4, y el cloruro de calcio en el medio CCP. En este último, también se añadió urea para inducir la hidrólisis, aunque resultó ser el medio con menor precipitación de CaCO_3 . Esto sugiere que la mayoría de las bacterias emplearon rutas metabólicas alternativas para desencadenar la biomineralización en los medios sin urea, como la desaminación oxidativa. En este proceso, los aminoácidos pierden su grupo amino ($-\text{NH}_2$), generando amoníaco (NH_3), lo cual inicia la modificación del pH y facilita la precipitación (González- Muñoz et al., 2008). Varias razones podrían explicar la baja capacidad de las bacterias en el medio CCP. La carbonatogénesis está influenciada por factores como 1) la concentración de calcio, 2) la concentración de carbonato, 3) el pH del medio y 4) la disponibilidad de sitios de nucleación (Al-Thawadi, 2011; Cameotra y Dakal, 2012; Qin et al., 2020). Una hipótesis probable es que el pH en el medio CCP, ajustado a 8.5 (ligeramente superior al resto de tratamientos), pudo influir negativamente en la actividad bacteriana. El pH óptimo al que se produce la ureólisis varía según el grupo bacteriano, ya que la liberación de la enzima ureasa está condicionada a las características específicas de cada microorganismo.

El análisis de los datos obtenidos de las precipitaciones en los medios de cultivo, complementado con los resultados de DRX, confirmó la producción de diferentes tipos de cristales por una misma bacteria dependiendo del medio de cultivo en el que fue cultivada. Algunas cepas, como

Agrobacterium sp (CHGM7-2), *Arthrobacter sp* (OX4-8C) y *Sphingomonas sp* (CHJM-1) mostraron la capacidad de producir simultáneamente dos o tres tipos de cristal: wedelita, calcita y aragonita: *Agrobacterium sp* (CHGM7-2) lo hizo en el medio AEMC y B4, mientras que *Arthrobacter sp* (OX4-8C) y *Sphingomonas sp* (CHJM-1) en el medio B4. Esto evidencia que la biomineralización inducida por microorganismos es altamente sensible a las condiciones del entorno, pues cuando se hizo una modificación al medio B4, disminuyendo la cantidad de glucosa y elevando el acetato de calcio, *Arthrobacter sp* (OX4-8C) produjo calcita y wedelita pero ya no aragonita, lo que demuestra que las características del medio influyen directamente en los productos cristalinos. Estas variaciones en los tipos de cristales están determinadas por factores como la temperatura, el pH, la disponibilidad de nutrientes y el metabolismo de cada bacteria. Además, los exopolisacáridos (EPS) desempeñan un papel importante en la formación y el tamaño de los cristales, ya que proporcionan sitios de nucleación y permiten la unión de pequeños cristales para formar biolitos más grandes (Zamarreño et al., 2009, Jroundi et al., 2021).

Estudios previos sugieren que, a medida que el pH aumenta, los iones de carbonato (CO_3^{2-}) se vuelven más abundantes, favoreciendo la precipitación de calcita. En contraste, a un pH más bajo, la concentración de CO_2 disuelto aumenta, lo que puede promover la formación de aragonita. Las bacterias tienen la capacidad de inducir la formación de aragonita y vaterita bajo condiciones inestables, y estos polimorfos pueden convertirse después en calcita dependiendo de la estabilidad del medio. Además, se ha propuesto que ciertas proteínas pueden inhibir la formación de calcita, mientras que los polisacáridos tienden a promover la formación de vaterita (Liu et al., 2021). Estos factores también influyen en la forma y coloración de los cristales producidos. En los experimentos, se observaron cristales con tonalidades plateadas, cafés, rosadas y moradas, lo cual se debe a la interacción bacteriana con diversos iones presentes en el medio. Se ha comprobado que, en los espeleotemas, los colores varían según los iones que sustituyen a los iones de Ca^{2+} : Por ejemplo, Fe^{2+} genera tonos rosados, Ni^{2+} produce aragonitos verdes y Cu^{2+} genera un azul verdoso. Sin embargo, los colores amarillos, café claro, naranja y marrón observados en algunos espeleotemas calcáreos no estaban relacionados con óxidos de hierro sino con pigmentos orgánicos, como ácidos: los ácidos húmicos y fúlvicos (Zamarreño et al., 2009).

En los experimentos *in situ*, uno de los principales desafíos fue el proceso de biomineralización en un ambiente desafiante, como el área maya del sur de México. Esta región se caracteriza por

condiciones climáticas extremas, con alta humedad y temperaturas que pueden alcanzar los 40°C. En este contexto, la selección de especies autóctonas resultó crucial para garantizar la efectividad de los tratamientos asperjados en los litotipos calcáreos, ya que estos microorganismos están naturalmente adaptados a estas condiciones ambientales. Este enfoque no solo favorece el éxito del tratamiento, sino que también previene la introducción de organismos exógenos que podrían desplazar a otros colonizadores y alterar el equilibrio de la roca. A pesar de estas adaptaciones, las bacterias demostraron comportamientos diferentes en los experimentos realizados en el laboratorio (*ex situ*) y en el campo (*in situ*), lo cual es consistente con reportes previos que documentan variaciones en el desempeño microbiano debido a diferencias en las condiciones ambientales entre entornos controlados y naturales.

Bajo condiciones controladas, las bacterias exhibieron una destacada capacidad biomineralizante en medios enriquecidos con nutrientes esenciales, logrando una cohesión satisfactoria en los experimentos de bioconsolidación con arena y sascab. Este desempeño estuvo influenciado por varios factores, como el mantenimiento de las bacterias a temperaturas de 24°C a 31°C, consideradas óptimas para la precipitación de carbonatos inducido por microorganismos (MICP), ya que la literatura reporta un intervalo ideal entre 22 y 32°C (Zamarreño et al., 2009). En contraste, los experimentos realizados en el campo bajo condiciones ambientales sin control, como los bioensayos en conchuela y las exposiciones en los sitios arqueológicos de Oxpemul y Chichén Itzá, estuvieron expuestos a temperaturas superiores a los 35°C, lluvias, interacción con animales (principalmente en Oxpemul) y la competencia con otros microorganismos ambientales y del sitio de exposición. Estas condiciones, según reportes previos, puede inhibir la actividad biomineralizante debido a fluctuaciones térmicas. A temperaturas extremas (40-50°C), muchas bacterias pueden inactivarse o presentan una disminución significativa en el proceso de biomineralización (Kim et al., 2018, Wang et al., 2022). Esto fue evidente en el sitio arqueológico de Chichén Itzá, donde los litotipos estuvieron expuestos directamente al sol, sin protección que moderará las altas temperaturas. Hay estudios donde se enfatiza que las condiciones de temperatura ideal para MICP por desaminación oxidativa es de 30 °C a 35 °C (Zhu & Chen, 2001), mientras que el pH óptimo al que se produce está en el rango de pH 7–8.5 (Geisseler et al., 2010). No obstante, a pesar de las condiciones adversas y los resultados discretos, *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) y *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) mostraron comportamientos consistentes con sus capacidades. En Oxpemul, la cepa *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) (aislada del mismo sitio) destacó bajo el estímulo del medio M-3P, logrando sellamiento de poros, síntesis de material, y modificaciones en la superficie de los

litotipos, incluso en condiciones adversas. De manera similar, la cepa *Sphingomonas sp.* (CHJM-1) (originalmente aislada de Chichén Itzá), también mostró actividad positiva en Oxpemul cuando fue asperjada con el medio M-3P, aunque este comportamiento no se replicó en Chichén Itzá, donde los litotipos mostraron una meteorización más evidente y resultados menos favorables. Además, en términos de absorción de agua, los litotipos asperjados con *Sphingomonas sp.* (CHJM-1) demostraron una mayor resistencia, lo cual era esperado dado que esta cepa es conocida por su capacidad para formar biopelículas.

La mayor eficiencia en el sitio arqueológico de Oxpemul se debe a las condiciones térmicas más favorables, una exposición menor a los rayos solares por la abundancia de árboles alrededor, permitiendo un pH más propicio para que se den las condiciones necesarias para la biomineralización; a su vez, cabe mencionar que la bioreceptividad de la roca también parece jugar un papel, pues la eficacia observada en el litotipo conchuela respecto al litotipo Chichén Itzá puede atribuirse a características intrínsecas del sustrato: una distribución de poros que favorecen la retención de película hídrica y nutrientes, mayor rugosidad y microtopografía (refugios), así como diferencias mineralógicas que facilitan la adhesión y la actividad bacteriana. Estudios sobre bioreceptividad muestran que estos factores (porosidad, capilaridad, rugosidad y composición química) son determinantes en la colonización y la biomineralización en roca caliza, por lo que la conchuela, al presentar microficies biomicríticas y fisuralidad, ofrece condiciones microambientales más favorables para la biomineralización (Miller et al., 2012, Chen et al., 2023).

En ambos sitios arqueológicos, se observaron mejores resultados cuando las bacterias asperjadas fueron suspendidas en el medio nutritivo M-3P, en comparación con el uso del M-3P solo. Este hallazgo coincide con el trabajo de Jroundi et al. (2017), quienes demostraron al aire libre en el Monasterio de San Jerónimo (Granada, España), que el tratamiento con M-3P acompañado de un microorganismo autóctono produce resultados más satisfactorios que asperjando solo el medio nutritivo. Estos resultados fueron consistentes con el FTIR donde los tratamientos bacterianos con M-3P tuvieron una mayor definición e intensidad en las bandas características de los carbonatos y otros compuestos minerales asociados a biomineralización, como la presencia de calcita y aragonita.

En este estudio, también se reportó una mayor dureza en los litotipos tratados con la cepa *Arthrobacter sp.* (OX4-8C) combinado con M-3P y la nanopartícula. Cabe destacar que ambas cepas, *Arthrobacter sp.* (OX4-8C) y *Sphingomonas sp.* (CHJM-1), mostraron un desempeño sobresaliente en el medio líquido M-3P bajo condiciones controladas de laboratorio. Además, los

cristales producidos en este medio agarizado tendían a ser más abundantes y de mayor tamaño, lo que sugiere que estas bacterias seguían predominantemente la ruta metabólica de desaminación oxidativa, utilizando el calcio disponible en la roca o en el medio nutritivo para producir cristales de CaCO_3 , principalmente en forma de calcita. Este comportamiento también se correlaciona con nuestros experimentos previos, donde ambas cepas mostraron una baja disolución de calcio, pero produjeron una cantidad significativa de cristales, un factor crucial para considerar su uso en biorestauración, se enfatiza esto, porque diversos estudios han demostrado que el tratamiento de la caliza mediante MICP en condiciones de pH básico moderado ($\approx 8-9.5$) no degrada la roca, sino que la consolida y protege (Rodríguez-Navarro et al., 2003; De Muynck et al., 2010).

Un hallazgo adicional relevante fue la ausencia de hongos en los litotipos tratados con bacterias + M-3P, M-3P solo y nanopartícula CZ, en contraste con el control TSB, que presentó colonización por microorganismos que se desarrollan en los procesos de sucesión ecológica sobre la roca caliza, como los hongos o algas. La ausencia de este tipo de organismos en los tratamientos con las bacterias podría atribuirse a posibles propiedades antibiofilms, lo que añade valor potencial en aplicaciones de biorestauración, al evitar la proliferación de organismos deteriorantes.

A su vez, también se destaca que los litotipos tratados con las bacterias + M-3P fueron los que reportaron una menor pérdida de masa y una mayor rugosidad en el litotipo, mientras que los resultados de colorimetría muestran una tendencia al cambio de color en el tiempo. Aunque la pérdida material ocasionada por el intemperismo limitó la evaluación cuantitativa de la neoformación de carbonatos, la evidencia obtenida por SEM y FTIR confirma la formación de cristales, sobretodo en presencia de M-3P. Esto indica que la estrategia aplicada puede ser beneficiosa en litotipos ya afectados por procesos de alteración ambiental, contribuyendo a su consolidación. Cabe apuntar que la fuente de calcio disponible para los microorganismos que inducen la precipitación de carbonato cálcico (MICP) proviene de diferentes orígenes, en condiciones de laboratorio o en tratamientos diseñados para conservación, como el medio M-3P, el calcio se aporta de manera externa mediante el acetato de calcio, lo que asegura que el ion Ca^{2+} no sea extraído directamente del sustrato pétreo (Rodríguez-Navarro et al., 2015; Jroundi et al., 2017). Pese a ello, cuando las reservas del medio se agotan es probable que las bacterias tomen el calcio de la roca, de allí la importancia del experimento del consumo de calcio bacteriano (ver Fig. 23) donde el consumo de las bacterias elegidas fue menor en comparación con la

cantidad de cristales precipitados a cambio. En este sentido, los tratamientos de conservación basados en MICP están diseñados para aportar externamente la fuente cálcica y favorecer su bioprecipitación, evitando que los microorganismos deban recurrir a la disolución del sustrato, lo que reduce el riesgo de daño en materiales calcáreos históricos.

En los experimentos de bioconsolidación en sascab y arena, siguiendo la metodología propuesta por Cacchio y Del Gallo (2019), no se logró una bioconsolidación efectiva utilizando el medio B4, incluso después de reducir la concentración de glucosa (B4M). Esto se atribuyó a las condiciones ambientales en el sitio experimental, caracterizadas por alta humedad y temperatura, que favorecieron la proliferación de hongos. Se optó por realizar los experimentos en condiciones ambientales naturales para comprobar la resistencia real de las bacterias, en lugar de utilizar condiciones controladas. Ante este desafío, se modificó el experimento, empleando los medios CCP y M-3P, donde no se registraron problemas de contaminación y se obtuvieron resultados destacados, particularmente con nueve cepas *Sphingomonas* sp. (CHJM-1), *Agrobacterium* sp. (CH6M7-2), CHGM1-1, CHL4-1, OX4-8A, *Arthrobacter* sp (OX4-8C), *Agrobacterium* sp (CK1-3C), *Stenotrophomonas* sp. (OX1-1) y *Paenarthrobacter ureafaciens* (CK4-1). Aunque los resultados fueron concluyentes, estos difirieron de los obtenidos por Cacchio y Del Gallo (2019), ya que la calcificación total se alcanzó a los 25 días (y en algunas cepas, hasta los 30 días), en lugar de los 20 reportados por los autores, lo que podría deberse a fluctuaciones de temperatura y a las condiciones de oscuridad en las que se desarrollaron los experimentos. Además, se observó que, aunque las bacterias visualmente habían cohesionado las partículas separadas del sascab y la arena, en manipulación mecánica y pruebas de dureza, se comprobaron diferencias entre las cepas, algunas mostraron desprendimientos en la bioconsolidación durante el estímulo mecánico y diferentes rangos de dureza. Este comportamiento podría estar relacionado con la capacidad observada durante todo el proyecto, de ciertas bacterias autóctonas para penetrar profundamente en el material, proporcionando una consolidación interna más efectiva. Entre las cepas evaluadas, *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) destacó por lograr una cohesión profunda y consistente, probablemente por su capacidad para prosperar en condiciones oligotróficas y a su alta movilidad observada en los experimentos *in vitro*. Esta cepa fue la única capaz de producir cristales (en la caja de Petri) incluso en áreas donde no había sido inoculada. También el desprendimiento mecánico se debe a cuanta cantidad de calcita logró producir la cepa bacteriana en evaluación, entre más calcita mayor resistencia.

Las cepas evaluadas fueron comparadas con un control negativo que no presentó calcificación, lo que permitió atribuir la dureza exclusivamente a la actividad bacteriana. Los análisis de DRX confirmaron un aumento en la cantidad de calcita en los tratamientos con sascab inoculados con bacterias en el medio M-3P. Además, se utilizó como control positivo, la bacteria *Lysinibacillus fusiformis*, una bacteria con capacidad biomineralizante comprobada en un estudio realizado con cepas aisladas de una estatua en Italia (Nigro et al., 2022). Al comparar los valores de dureza superficial en sascab, varias cepas mostraron un desempeño superior al de *L. fusiformis*. Entre ellas destacaron cepas como OX4-8A, que alcanzó valores más altos en los medios M-3P y CCP, y la cepa *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) en el medio CCP. Esta dureza puede ser ocasionada por el grado de inserción logrado por la bacteria, es decir su capacidad de desplazarse y llegar a diferentes niveles, permitiendo una mayor expansión y por ende un mayor aprovechamiento del calcio disponible para precipitar cristales y aumentar así la cantidad de calcita con ayuda del medio.

La secuenciación genómica permitió identificar a las seis cepas más destacadas, ubicándolas en los géneros *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium*, *Paenarthrobacter* y *Sphingomonas*. Estos géneros no son comúnmente reportados en biomineralización, donde predominan los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Sporosarcinas* y *Myxococcus*. Sin embargo, el análisis enzimático confirmó la presencia de la enzima anhidrasa carbonica en 5 cepas (excepto en *Arthrobacter* sp. (OX4-8C). Además, se detectó la enzima fosfatasa alcalina en *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) *Paenarthrobacter ureafaciens* (CK4-1) y *Stenotrophomonas* sp. (OX1-1). Esta enzima juega un papel importante en la biomineralización, ya que ciertos microorganismos calcificadores pueden producir fosfatos inorgánicos mediante su acción, los cuales se combinan con el calcio (Ca^{2+}) disponible en el medio para formar minerales. Por último, la enzima ureasa se identificó en *Sphingomonas* sp. (CHJM-1), *Paenarthrobacter ureafaciens* (CK4-1), *Agrobacterium* sp. (CK1- 3C) y *Agrobacterium* sp. (CHG7-2).

Las cepas *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) y *Paenarthrobacter ureafaciens* (CK4-1), mostraron biomineralización destacada y similitudes en varias pruebas, principalmente en el medio CCP, al que otras bacterias no lograron adaptarse. Ambas demostraron ser versátiles y eficientes en condiciones oligotróficas, lo cual está relacionado con las características propias de su género. *Arthrobacter* se caracteriza por su división por “chasquido” (snapping división), adoptando forma bacilar durante la fase de crecimiento exponencial y forma de coco durante la fase estacionaria. Estas células en forma de coco son altamente resistentes a la desecación y a la falta de

nutrientes. Asimismo, ambas cepas exhibieron una reacción rápida en presencia de urea, logrando producir hydroxylapatite y aragonita en el medio CCP. *Paenarthrobacter ureafaciens* (CK4-1) ha sido reportada con propiedades antifúngicas (Nguyen et al., 2023) y como degradadora de herbicidas como atrazina (Zhao et al., 2023). Por su parte, *Arthrobacter* sp. (OX4- 8C), mostró una alta motilidad, lo que favoreció su desempeño en los ensayos experimentales. *Sphingomonas* sp. (CHJM-1), otra de las cepas destacadas, pertenece a un género conocido por su eficiencia en la biolixiviación de plata y manganeso (Huerta- Rosas et al., 2020). Estas características sugieren que las bacterias autóctonas aisladas en esta investigación tienen potencial no solo en bioconsolidación, sino también en aplicaciones ambientales, como la remediación de contaminantes.

Por último, aunque el 72% de las cepas evaluadas mostraron capacidad biomineralizante bajo condiciones de laboratorio, un porcentaje considerable (51%) no fueron probadas en experimentos de bioconsolidación de arena y sascab, ni en roca, conservándose como cepas potenciales. Esto subraya la riqueza microbiológica de los sitios arqueológicos mayas, lo cuáles aún tienen mucho material vivo inexplorado con actividades desconocidas. El aporte de esta investigación es un preámbulo de la riqueza bacteriana autóctona y su potencial papel en la bioconservación del área maya del sur de México con aplicaciones en entornos realistas para zonas de temperaturas altas y sistemas no controlados. Además de contribuir con nueva información sobre géneros, comportamientos, morfologías, y mineralogía bacteriana.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados mostraron que los sitios arqueológicos de Oxpemul y Chichén Itzá albergan una gran variedad de bacterias con capacidad biomineralizante y con versatilidad para crecer y precipitar cristales en condiciones tanto oligotróficas como nutritivas, ya que el 72% de los aislados al ser ureasa positiva, tienen gran potencial para desencadenar reacciones que culminen en la precipitación de CaCO_3 . Independientemente de la ureasa, también se identificó la presencia de otras enzimas como la anhidrasa carbónica y la fosfatasa alcalina, además del seguimiento de otras rutas de biomineralización como la desaminación oxidativa.

Hubo, a su vez, gran abundancia de morfotipos bacterianos, siendo muy diferentes entre sí los aislados de la roca caliza del sitio arqueológico de Chichen Itzá, pero más abundante en número (aunque fueran del mismo género) los aislados del sitio Oxpemul. En cuanto al sustrato y la

bioreceptividad para albergar bacterias carbonatogénicas, se notó mayor presencia en el litotipo Oxpemul y en los ensayos al aire libre en el litotipo conchuela durante el bioensayo previo a la exposición *in situ*, por las características mineralógicas de esa roca.

Se concluye, además, que las bacterias aisladas tienen propiedades bioconsolidantes de materiales como la arena y el sascab, mostrando una gran afinidad con el sascab, sobre todo cuando se encuentran acompañadas del medio nutritivo M-3P, siendo las cepas OX4-8A, *Arthrobacter* sp. (OX4-8C), *Stenotrophomonas* sp. (OX1-1) y *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) las que mostraron mayores valores de dureza y cohesión.

En cuanto a los litotipos de roca en exposición en los sitios arqueológicos, los mejores resultados fueron cuando las cepas *Arthrobacter* sp. (OX4-8C) y *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) se encontraban suspendidas en el medio M-3P, particularmente la cepa OX4-8C mostró mejor actividad (incluso cuando se encontraba sola) en el sitio arqueológico de Oxpemul, obteniendo biomineralización a una pequeña escala, mientras que los resultados en Chichen Itzá fueron más discretos y las rocas presentaron una mayor erosión. Así mismo los tratamientos con bacterias + M-3P tuvieron menor pérdida de masa, mientras *Sphingomonas* sp. (CHJM-1) mostró una mayor resistencia a la velocidad de absorción de agua por su capacidad de formar biopelículas.

Se concluye finalmente que las bacterias encontradas en estos sitios arqueológicos tienen potencial como cepas biomineralizantes que se podrían utilizar en bioconsolidación y biorestauración, aunque se recomiendan análisis más rigurosos en cuanto al impacto en la rugosidad, dureza y color de la roca (bioreceptividad). Se enfatiza también que las rocas son propensas a sufrir biodeterioro (principalmente fúngico) cuando se encuentran sin ningún tratamiento bacteriano, sin un medio nutritivo o sin la protección de nanopartículas.

Se recomienda, entonces, realizar estudios adicionales con distintos medios de cultivo y condiciones experimentales diferentes (sobre todo rangos estrictos y altos de temperatura y humedad) para conocer a profundidad el comportamiento enzimático de cada cepa aislada cuando se encuentra en ambientes de climas elevados y al aire libre y maximizar así el aprovechamiento de los microorganismos en la zona mesoamericana, a su vez, hacer experimentos que arrojen una idea más concisa sobre cómo es la interacción de la bacteria con el calcio, tanto del medio como de la roca, si usa primero uno y después el otro, o usa ambos simultáneamente; todo esto se debe investigar con más rigor para así aumentar la confianza al realizar aplicaciones de bioconservación en los microambientes de las rocas del patrimonio cultural edificado.

Se recomienda, también, para futuras aplicaciones tener en cuenta la biomasa ya que, a mayor biomasa, mayor precipitación, es probable que en las áreas de climas extremos se necesite mantener estimuladas a las bacterias con regularidad, más allá de los 6 días de tratamiento *in situ* inicial, favoreciendo la supervivencia a largo plazo de las cepas.

11. REFERENCIAS CITADAS

- Achal V, Mukherjee A, Basu PC, Reddy MS. (2009). Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Volume 36: 981–988. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0578-z>
- Achal Varenayam y Mukherjee Abhijit. (2015). A review of microbial precipitation for sustainable construction. *Construction and Building Materials* Volume 93, Pages 1224-1235 <http://dx.doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2015.04.051>
- Achal, V. (2015). Production of Bacteria for Structural Concrete. In: Pacheco Torgal, F., Labrincha, J., Diamanti, M., Yu, CP., Lee, H. (eds). *Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09287-4_14
- Adolphe, J. P., Loubière, J. F., Paradas, J., and Soleilhavoup, F. (1990). Procédé Detraitement Biologique d'une Surface Artificielle. París: Francia European Patent 90400G97.0. (after French patent 8903517, 1989).
- Akmal A. Sakr, Mohamed F. Ghaly, H. G. M. Edwards, Mona F. Ali & Mahmoud E. F. Abdel-Haliem. (2020). Involvement of *Streptomyces* in the Deterioration of Cultural Heritage Materials Through Biomineralization and Bio-Pigment Production Pathways: A Review. *Geomicrobiology Journal*, 37:7, 653-662. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1754533>
- Al-Thawadi, Salwa. (2011). Ureolytic Bacteria and Calcium Carbonate Formation as a Mechanism of Strength Enhancement of Sand. *Journal of Advanced Science and Engineering Research*. 1. 98-114.
- Anbu, P., Kang, CH., Shin, YJ. et al. (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *SpringerPlus* 5, 250. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1869-2>

- Arias Dayana, Cisternas Luis A., y Rivas Mariella. (2017). Biomineralization Mediated by Ureolytic Bacteria Applied to Water Treatment: A Review. *Crystals*, 7(11), 345; <https://doi.org/10.3390/cryst7110345>
- ASTM (American Society for Testing and Materials). (2000). E313-00, Standard practice for calculating yellowness and whiteness indices from instrumentally measured color coordinates, ASTM, West Conshohocken, PA.
- Atlas R. M. (2010). Handbook of microbiological media. Florida, USA CRC Press.
- Benabidi Parra, Sarah. (2023). Evaluación de los contaminantes higiénicos asociados a la restauración y conservación de obras de arte. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Braissant O., Decho A.W., Dupraz C., Glunk C., Przekop K.M., Visscher P.T. (2007). Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology* 5(4): 401-411. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00117.x>
- Cacchio Paola y Del Gallo Maddalena. (2019). A Novel Approach to Isolation and Screening of Calcifying Bacteria for Biotechnological Applications. *Geosciences* 2019, 9, 479. <https://doi.org/10.3390/geosciences9110479>
- Camacho, M., Yovera, M. (Eds) (2022). Contribuciones Investigativas en Ciencias y Biotecnología. San Felipe, Venezuela. Ediciones UNEY.
- Cameotra Swaranjit S. y C. Dakal Tikam. (2012). Carbonatogenesis: microbial contribution to the conservation of monuments and stone artwork. *Conservation Science in Cultural Heritage* [en línea], v. 12, pp. 79-108. DOI: <https://doi.org/10.6092/issn.1973-9494/3383>
- Carter MS, Tuttle MJ, Mancini JA, Martineau R, Hung C, Gupta MK. (2023). Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation by *Sporosarcina pasteurii*: a Case Study in Optimizing Biological CaCO₃ Precipitation. *Appl Environ Microbiol* 89:e01794-22 <https://doi.org/10.1128/aem.01794-22>
- Castanier, S., Levrel-Le Metayer, G., Loubiere, J.F. (1995). Nouvelles compositions pour mortier biologique, procede de recouvrement d'une surface ou de comblement d'une cavite a l'aide des compositions. French Patent No. 95 05861.

- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G., Orial, G., Loubière, JF., Perthuisot, JP. (2000). Bacterial Carbonatogenesis and Applications to Preservation and Restoration of Historic Property. In: Ciferri, O., Tiano, P., Mastromei, G. (eds). *Of Microbes and Art*. pp 203–218. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4239-1_14
- Castro Alonso, M. J., Montañez-Hernández, L. E., Sanchez-Muñoz, M. A., Franco, M., Rubi, M., Narayanasamy, R., & Balagurusamy, N. (2019). Microbially Induced Calcium carbonate Precipitation (MICP) and its potential in Bioconcrete: Microbiological and molecular concepts. *Frontiers in Materials*, 6, 126. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00126>
- Chahal Navneet, Rajor Anita and Siddique Rafaf. (2011). Calcium carbonate precipitation by different bacterial strains. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(42), pp. 8359-8372. <https://doi.org/10.5897/AJB11.345>
- Chaparro Acuña, Sandra Patricia, Becerra-Jiménez, Mónica Liliana, Martínez-Zambrano, José Jobanny, & Rojas-Sarmiento, Hugo Alfonso. (2018). Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: mechanism and applications of the process. *Acta Agronómica*, 67(2), 277-288. <https://doi.org/10.15446/acag.v67n2.66109>
- Chen, X., Bai, F., Huang, J. et al. (2021). The Organisms on Rock Cultural Heritages: Growth and Weathering. *Geoheritage* 13, 56. <https://doi.org/10.1007/s12371-021-00588-2>
- Chen J, Zhao Q, Li F, Zhao X, Wang Y, Zhang L, Liu J, Yan L and Yu L (2023) Nutrient availability and acid erosion determine the early colonization of limestone by lithobiontic microorganisms. *Front. Microbiol.* 14:1194871. doi: 10.3389/fmicb.2023.1194871
- Consejo Internacional de Museos - Comité Internacional para la Conservación (ICOM-CC). (2008). Terminología para definir la conservación del patrimonio cultural tangible. Resolución que se presentará a los miembros del ICOM-CC durante la XVa Conferencia Triannual, Nueva Delhi.
- Coronado Vila, I. (2022). Biomineralización: Cuando los organismos crean minerales. *Ambiociencias*, (20), 77-100.
- Cosmidis Julie, and Benzerara Karim. (2022). Why do microbes make minerals?. *Comptes Rendus. Géoscience*, Volume 354, pp. 1-39. <https://doi.org/10.5802/crgeos.107>

- De Muynck W., De Belie N., Verstraete W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecol. Eng.* 36 (2010) 118–136. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.02.006>
- De la Rosa García, Susana, Sierra-Fernández, Aránzazu, García Solís, Claudia, Soberanes García, Neftalí, Quintana, Patricia, Gómez-Cornelio, Sergio, Fort, Rafael. (2024). Fungal community dynamics on limestone at the Chichén Itzá archaeological site in Mexico driven by protective treatments. *Science of The Total Environment*, Volume 906,2024,167563,ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167563>
- De Lerma Perdomo, Naira. (2020). Propuesta de conservación y restauración para el conjunto escultórico "Niños con Jarrón de Cibeles". [Grado en conservación y restauración del patrimonio cultural]. Madrid: Universidad complutense de Madrid.
- De Turrís Antonio, Ocando Lisseth, De Romero Matilde F., Fernández Marianela. (2013). ¿pueden los microorganismos impactar los materiales de construcción? una revisión. *Gaceta técnica*, Volumen N ro. 10. Pp. 23-33. I.S.N.N.Nro. 1856-9560.
- Dhami Navdeep K., M. Sudhakara Reddy and Mukherjee Abhijit. (2013). Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Front. Microbiol.*, Sec. Terrestrial Microbiology. Volumen 4, artículo 314. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00314>
- Elert, K., Ruiz-Agudo, E., Jroundi, F. et al. (2021). Degradation of ancient Maya carved tuff stone at Copan and its bacterial bioconservation. *npj Mater Degrad* 5, 44 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41529-021-00191-4>
- Ershad-Langroudi, A., Fadaei, H. & Ahmadi, K. (2019). Application of polymer coatings and nanoparticles in consolidation and hydrophobic treatment of stone monuments. *Iran Polym J* 28, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s13726-018-0673-y>
- Folan William J., González Heredia Raymundo, Morales López Abel, Domínguez Carrasco Ma. Del Rosario, Zamora Crecencio Pedro, Barnes Edwin B., Robichaux Hubert, Anaya Hernández Armando, Gunn Joel D., y Pruett Candace. (2009). Las ruinas de Oxpemul: un sitio fortificado en la frontera entre el Petén campechano y el río Bec. *Estudios de cultura maya*, 34, 11-44.

Fort Gonzalez Rafael. (2009). La piedra natural y su presencia en el Patrimonio Histórico. *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra*. (17.1) 16-25.

Fouladi, Amir & Arulrajah, Arul & Chu, Jian. (2023). Application of Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP) technology in construction materials: A comprehensive review of waste stream contributions. *Construction and Building Materials*. 388. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2023.131546>

Frankel, R. B., & Bazylinski, D. A. (2003). Biologically induced mineralization by bacteria. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 95-114. <https://doi.org/10.2113/0540095>

Gadd G.M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* 111: 3–49. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.12.001>

Gadd, G., (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156: 609-643. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>

Garces Manosalva, R. D. (2023). Caracterización de la Microbiocenosis Asociada al Deterioro en Edificaciones Antiguas y Posibles Bienes de Interés Cultural en el área Metropolitana de Bucaramanga: una Aproximación Metagenómica [Tesis de Pregrado], Universidad de Santander). Repositorio Digital.

García Avelino Pilar Amalia. (2021). Evaluación de la capacidad de biomineralización de un consorcio bacteriano aislado de suelos arcillosos [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado.

Gebru Kbrom Alebel, Kidanemariam Tekleweyni Gebremicael y Gebretinsae Haile Kidane. (2021). Bio-cement production using microbially induced calcite precipitation (MICP) method: A review. *Chemical Engineering Science* Volume 238, 116610. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2021.116610>

Geisseler, D., Horwath, W.R., Joergensen, R.G., Ludwig, B. (2010). Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 2058–2067. doi:10.1016/j.soilbio.2010.08.021

González Gómez W. S. (2016). Efecto de la temperatura y colonización fúngica sobre las propiedades físicas y químicas de litotipos calcáreos de Yucatán y caracterización de

- jades de Guatemala. [Tesis de doctorado]. Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional. Unidad Mérida. Departamento de física aplicada.
- González Gómez W. S., Quintana P., Gómez-Cornelio S., García-Solis C., Sierra-Fernandez A., Ortega-Morales O., De la Rosa-García S. C. (2018). Calcium oxalates in biofilms on limestone walls of Maya buildings in Chichén Itzá, Mexico. *Environmental Earth Sciences* 77:230. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7406-6>
- González-López Irvin, Medrano-Félix José Andrés, Castro-del Campo Nohelia, López-Cuevas Osvaldo, González-Gómez Jean Pierre, Valdez-Torres José Benigno, Aguirre-Sánchez José Roberto, Martínez-Urtaza Jaime, Gómez-Gil Bruno, Lee Bertram G., Quiñones Beatriz y Chaidez Cristóbal. (2022). Prevalence and Genomic Diversity of *Salmonella enterica* Recovered from River Water in a Major Agricultural Region in Northwestern Mexico. *Microorganisms* 2022, 10, 1214. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061214>
- Gonzalez Muñoz M. T., Ben Omar N. y Arias J.M. (1996). Biomineralización: una revisión de algunos de sus aspectos más destacados. Departamento de Microbiología. *Ars pharmaceutica*, 37:3; 483-518. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. E-18071. Granada. España.
- González Muñoz, María Teresa; Rodríguez Navarro, Carlos; Jiménez López, Concepción y Rodríguez Gallego, Manuel. (2008). Método y producto para la protección y consolidación de materiales de construcción y ornamentales.
- Görgen Sigrid, Benzerara karim, Skouri-Panet Fériel, Gugger Muriel, Chauvat Franck & Cassier Chauvat Corinne. (2021). The diversity of molecular mechanisms of carbonate biomineralization by bacteria. *Discover Materials* 1:2 | <https://doi.org/10.1007/s43939-020-00001-9>
- Guerrero Hernández Cirilo Joaquín. (2001). Rocas calizas: Formación, ciclo del carbonato, propiedades, aplicaciones, distribución y perspectivas en la Mixteca Oaxaqueña. *temas de ciencia y tecnología* vol. 5 número 14, pp 3-14.
- Guia LP, da Motta ALTS (2015) Criteria of waxes' performance in the consolidation of steatites (soapstone) in heritage buildings. *WIT Trans Built Env* 168:637–648

- Gu Ji-Dong and Katayama Yoko. (2021). Microbiota and Biochemical Processes Involved in Biodeterioration of Cultural Heritage and Protection. Chapter 2. E. Joseph (ed.), *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*. Editorial Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-69411-1_2
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 29(8):1072–1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086.
- Hammes, F.; Seka, A.; De Knijf, S.; Verstraete, W. (2003). A Novel Approach to Calcium Removal from Calcium-Rich Industrial Wastewater. *Water Res*, 37, 699–704. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00308-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00308-1)
- Hansen E, Doehne E, Fidler J, Larson J, Martin B, Matteini M, Rodriguez-Navarro C, Pardo ES, Price C, Tagle AD, Teutonico JM, Weiss N. (2003). A review of selected inorganic consolidants and protective treatments for porous calcareous materials. *Stud Conserv* 48:13–25.
- Harrison, D.J. (1993) Limestone: Industrial Minerals Laboratory Manual. British Geological Survey. Technical Report WG/92/29.45.
- Heirman Gert; Herremans Timmy, Vangheel Tinne, Van Gemert Dionys, De Graef Bernard, De Belie Nele, De Windt Wim & Verstraete Willy. (2003). Biological repair of damaged concrete and mortar surfaces: biomineralisation.
- 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. <https://doi.org/10.29057/icbi.v10iEspecial2.8667>
- Huang, X.; Sresakoolchai, J.; Qin, X.; Ho, Y.F.; Kaewunruen, S. (2022). Self-Healing Performance Assessment of Bacterial-Based Concrete Using Machine Learning Approaches. *Materials*, 15, 4436. <https://doi.org/10.3390/ma15134436>
- Huerta-Rosas, B., Cano-Rodríguez, I., Gamiño-Arroyo, Z. et al. Aerobic processes for bioleaching manganese and silver using microorganisms indigenous to mine tailings. *World J Microbiol Biotechnol* 36, 124 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02902-6>
- Jáidar Benavides Yareli, Magar Meurs Valerie y Ruiz Martín María Cristina. (2025). Criterios de conservación del patrimonio en piedra [recurso electrónico] introd. de María del Carmen

- Castro Barrera. México: Secretaría de Cultura, INAH, UNAM-IIE, ICCROM, 2025 488 p.:
ilus.: 23 x 17 cm – (Colec. Conservación y Restauración del Patrimonio, Ser. Memorias)
- Jroundi Fadwa, Schiro Mara, Ruiz-Agudo Encarnación, Elert Kerstin, Martín-Sánchez Inés,
González-Muñoz María Teresa y Rodríguez-Navarro Carlos. (2017). Protection and
consolidation of stone heritage by self-inoculation with indigenous carbonatogenic
bacterial communities. *Nature Communications* vol 8, Article number: 279.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00372-3>
- Jroundi Fadwa, González-Muñoz María Teresa, Rodríguez-Navarro Carlos. (2021). Protection
and consolidation of stone heritage by bacterial carbonatogenesis. Chapter 13. E. Joseph
(ed.), *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*,
https://doi.org/10.1007/978-3-030-69411-1_13
- Kango, N. (2013). Textbook of Microbiology. India: I.K. International Publishing House Pvt.
Limited.
- Krklec K., Domínguez-Villar D. y Perica D. (2020). Use of rock tablet method to measure rock
weathering and landscape denudation, *Earth-Science Reviews*.
<https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2020.103449>
- Kim, G., Kim, J., & Youn, H. (2018). Effect of Temperature, pH, and Reaction Duration on
Microbially Induced Calcite Precipitation. *Applied Sciences*, 8(8), 1277.
<https://doi.org/10.3390/app8081277>
- Lee Jason S. y Little Brenda J. (2022). Biomineralization: Applied to biodeterioration and
bioremediation. *Water-Formed Deposits*. Capítulo 4, páginas 69-77.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822896-8.00032-7>
- Le Me´tayer-Levrel G., Castanier S., Oriol G., Loubiére J. F., Perthuisot J.P. (1999). Applications
of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings
and historic patrimony. *Sedimentary Geology* 126 (1999) 25–34.
[https://doi.org/10.1016/S0037-0738\(99\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0037-0738(99)00029-9)
- Ley federal sobre monumentos y zonas arqueológicas, artísticas e históricos. (1972). Última
reforma publicada DOF 16-02-2018. Cámara de diputados del H. congreso de la unión.
Secretaría General. Secretaría de Servicios Parlamentarios

- Li W, Liu LP, Zhou PP, Cao L, Yu LJ, Jiang SY. (2011). Calcite precipitation induced by bacteria and bacterially produced carbonic anhydrase. *Curr Sci* 100:502–508.
- Liu, X., Koestler, R.J., Warscheid, T. et al. (2020). Microbial deterioration and sustainable conservation of stone monuments and buildings. *Nat Sustain* 3, 991–1004 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41893-020-00602-5>
- Liu R, Huang S, Zhang X, Song Y, He G, Wang Z, Lian B. (2021). Bio-mineralisation, characterization, and stability of calcium carbonate containing organic matter. *RSC Adv*. 2021 Apr 19; 11(24):14415-14425. doi: 10.1039/d1ra00615k. PMID: 35423988; PMCID: PMC8697732.
- Liu, X., Qian, Y., Wu, F., Wang, Y., Wang, W., & Gu, J. (2022). Biofilms on stone monuments: biodeterioration or bioprotection?. *Trends in Microbiology*, Vol. 30, No. 9. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.05.012>
- Luo Y, Xiao L, Zhang X (2015) Characterization of TEOS/PDMS/HA nanocomposites for application as consolidant/hydrophobic products on sandstones. *J Cult Herit* 16:470–47. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2014.08.002>
- Magar Valerie. (2019). Conservación de los bienes culturales en el INAH. INAH 80 años.
- Marvasi Massimiliano, Mastromei Giorgio y Perito Brunella. (2020). Bacterial Calcium Carbonate Mineralization *in situ* Strategies for Conservation of Stone Artworks: From Cell Components to Microbial Community. *Frontiers in Microbiology*. Volumen 11, artículo 1386. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01386>
- McNamara, C. J., & Mitchell, R. (2005). Microbial Deterioration of Historic Stone. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 3(8), 445–451. <https://doi.org/10.2307/3868661>
- Meier-Kolthoff JP, Göker M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun*. 10(1):2182. doi:10.1038/s41467-019-10210-3.
- Miller AZ, Sanmartín P, Pereira-Pardo L, Dionísio A, Saiz-Jimenez C, Macedo MF, Prieto B. (2012). Bioreceptivity of building stones: a review. *Sci Total Environ*. 2012 Jun 1;426:1-12. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.03.026. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22534363.

- Nayanthara, P.G.N.; Dassanayake, A.B.N.; Nakashima, K.; Kawasaki, S. (2019). Microbial Induced Carbonate Precipitation Using a Native Inland Bacterium for Beach Sand Stabilization in Nearshore Areas. *Appl. Sci*, 9, 3201. <https://doi.org/10.3390/app9153201>
- Negi, A., Sarethy, I.P. (2019). Microbial Biodeterioration of Cultural Heritage: Events, Colonization, and Analyses. *Microb Ecol* 78, 1014–1029. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01366-y>
- Nguyen T, Meng D, Chang C, Su P, Ou C, Hou P, Sung H, Chou C, Ohme-Takagi M, Huang H. (2023). Antifungal mechanism of volatile compounds emitted by Actinomycetota *Paenarthrobacter ureafaciens* from a disease-suppressive soil on *Saccharomyces cerevisiae*. *mSphere* 8:e00324-23. <https://doi.org/10.1128/msphere.00324-23>
- Nichols, G. (2009). *Sedimentology and Stratigraphy*, 2nd edn. Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- Nieto Laura Inés, Silvia Donolo Ana, Bava Amadeo Javier, Yantorno Osvaldo Miguel. (2004). Empleo de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier para diferenciar bacterias de importancia clínica. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2004; 38 (3): 289-95.
- Nigro, Lorenzo & Mura, Francesco & Toti, Maria & Cirigliano, Angela & Rinaldi, Teresa. (2022). Carbonatogenic bacteria on the 'Motya Charioteer' sculpture. *Journal of Cultural Heritage*.57. 256-264. [10.1016/j.culher.2022.09.009](https://doi.org/10.1016/j.culher.2022.09.009).
- Okewale, I.A., Grobler, H. & Mulaba-Bafubiandi, A.F. Assessment of carbonate rocks for engineering applications considering mineralogical, geochemical and geotechnical attributes. (2024). *Innov. Infrastruct. Solut.* 9, 382 (2024). <https://doi.org/10.1007/s41062-024-01701-4>
- Omoregie Armstrong Ighodalo, Runnie Henry Ginjom, Peter Morin Nissom. (2018). Microbially Induced Carbonate Precipitation Via Ureolysis Process: A Mini-Review. *Transactions on Science and Technology* Vol. 5, No. 4, 245 - 256, 2018.
- Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) (1972). Convención sobre la protección del patrimonio mundial, cultural y natural

- Pacheco, F., Loeff, A., Müller, V., Ehrenbring, H. Z., Christ, R., Modolo, R. C. E., Oliveira, M. F., Tutikian, B. F. (2022), "Análisis de la autorregeneración de matrices cementicias mediante diferentes métodos de inserción de soluciones químicas y bacterianas", *Revista ALCONPAT*, 12 (1), pp. 32 – 46, DOI: <https://doi.org/10.21041/ra.v12i1.559>
- Panchuck, K. (2021). *Physical geology (H5P edition)*. Chapter 9. Sedimentary Rocks BCcampus. <https://opentextbc.ca/physicalgeologyh5p/>
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 25(7):1043–1055. doi:10.1101/gr.186072.114
- Patil, S. M., Kasthurba, A. K., & Patil, M. V. (2021). Characterization and assessment of stone deterioration on Heritage Buildings. *Case Studies in Construction Materials*, 15, e00696. <https://doi.org/10.1016/j.cscm.2021.e00696>
- Pérez Ostos, Katia Josceline. (2021). Efectos de la aplicación de nanopartículas de $\text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en el comportamiento de piedras calizas expuestas a degradación en el entorno tropical del sitio arqueológico de Oxpeul, Campeche [Tesis de maestría]. Laboratorio Nacional en Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC). Centro de Investigación en Corrosión (CICORR) de la Universidad Autónoma de Campeche.
- Pérez Ruiz, Francisco. (2005). Recintos amurallados: Una interpretación sobre el sistema defensivo de Chichén Itza, Yucatán. En XVIII Simposio de Investigaciones Arqueológicas en Guatemala, 2004 (editado por J.P. Laporte, B. Arroyo y H. Mejía), pp.881-890. Museo Nacional de Arqueología y Etnología, Guatemala.
- Phua Y. J. y Røyne A. (2018). Bio-cementation through controlled dissolution and recrystallization of calcium carbonate. *Construction and Building Materials*, 167, 657-658. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.02.059>
- Piñar G, Jimenez-Lopez C, Sterflinger K, Etenauer J, Jroundi F, Fernandez-Vivas A, Gonzalez-Muñoz MT. (2010). Bacterial community dynamics during the application of a *Myxococcus xanthus*-inoculated culture medium used for consolidation of ornamental limestone. *Microb Ecol.* 60(1):15-28. doi: 10.1007/s00248-010-9661-2

- Pyzik, A.; Ciuchcinski, K.; Dziurzynski, M.; Dziewit, L. (2021). The Bad and the Good—Microorganisms in Cultural Heritage Environments—An Update on Biodeterioration and Biotreatment Approaches. *Materials* 2021, 14, 177. <https://doi.org/10.3390/ma14010177>
- Qin Wen, Wang Chen-yu, Ma Yu-xuan, Shen Min-juan, Li Jing, Jiao Kai, Tay Franklin R., and Niu Li-na. (2020). Microbe-Mediated Extracellular and Intracellular Mineralization: Environmental, Industrial, and Biotechnological Applications. *Adv. Mater*, 32, 1907833. <https://doi.org/10.1002/adma.201907833>
- Rahman Farzana, Afroz Sumaiya, Efaz Ikram Hasan, Huq Shams Rafid and Manzur Tanvir. (2015). Application of microbiologically induced precipitation process in cement and concrete research: a review. First International Conference on Advances in Civil Infrastructure and Construction Materials MIST, Dhaka, Bangladesh, 14–15 December 2015.
- Rajasekar A., Wilkinson b Stephen, Moy Charles K.S. (2021). MICP as a potential sustainable technique to treat or entrap contaminants in the natural environment: A review. *Environmental Science and Ecotechnology* 6 (2021) 100096. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.es.2021.100096>
- Ramachandran SK, Ramakrishnan V, Bang SS. (2001). Remediation of concrete using microorganisms. *ACI Mater J* 98:3–9. <http://dx.doi.org/10.14359/10154>
- Rautaray D, Ahmad A, Sastry M. (2004). Biological synthesis of metal carbonate minerals using fungi and actinomycetes. *J Mater Chem* 14(14):2333–2340. doi:10.1039/B401431F
- Rivas Pavón Samuel Álvaro. (2021). Tratamientos de conservación de monumentos en piedra. Precipitación biológica de carbonato cálcico como método alternativo. [Tesis de Licenciatura]. Dpto. de Ingeniería Química y Ambiental. Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Universidad de Sevilla.
- Rodrigues dos Santos, J., Eftting, C., Serbent, M. P., & Matsuda, J. B. (2023). Biomineralization of calcium carbonate in concrete by the action of *Bacillus pumilus*. *Engenharia Sanitaria E Ambiental*, 28, e20220277. <https://doi.org/10.1590/S1413-415220220277>
- Rodríguez-Navarro, C., Jroundi, F., Schiro, M., Ruiz-Agudo, E., & González-Muñoz, M. T. (2015). Influence of substrate mineralogy on bacterial mineralization of calcium carbonate:

- Implications for stone conservation. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4017–4029. <https://doi.org/10.1128/AEM.06852-11>
- Rodríguez-Navarro, C., Jroundi, F., Schiro, M., Ruiz-Agudo, E., & González-Muñoz, M. T. (2003). Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2182–2193. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2182-2193.2003>
- Røyne Anja, Phua Yi Jing, Balzer Le Simone, Grosås Eikjeland Ina, Domaas Josefsen Kjell, Markussen Sidsel, Myhr Anders, Throne-Holst Harald, Sikorski Pawel, Wentzel Alexander. (2019). Towards a low CO₂ emission building material employing bacterial metabolism in a two step process of limestone dissolution and recrystallization: The bacterial system and prototype production. *Plos one* 14(4): e0212990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212990>
- Ruíz Oviedo Cory Valeria. (2020). Precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente como alternativa para remediar entornos naturales contaminados con metales y metaloides tóxicos. [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias- Departamento de Química.
- Sameño Puerto Marta. (2018). El biodeterioro en edificios del patrimonio cultural metodología de evaluación de tratamientos biocidas. [Tesis de doctorado]. Dpto. Ingeniería Química y Ambiental. Escuela técnica superior de ingeniería (US). Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico (IAPH). Junta de Andalucía
- Samuels Toby, Bryce Casey, Landenmark Hanna, Loudon Claire-Marie, Nicholson Natasha, Stevens Adam H., and Cockell Charles. (2020). Microbial Weathering of Minerals and Rocks in Natural Environments. Chapter 3. Biogeochemical Cycles: Ecological Drivers and Environmental Impact, Geophysical Monograph 251, First Edition. Edited by Katerina Dontsova, Zsuzsanna Balogh-Brunstad and Gaël Le Roux. <https://doi.org/10.1002/9781119413332.ch3>
- Sanchez Silva M, Rosowsky David. (2008). Biodeterioration of Construction Materials: State of the Art and Future Challenges. ASCE. *Journal of materials in civil engineering*. 20;5,352–365.

- Secretaría de Turismo (SECTUR). (2017). Compendio estadístico del turismo en México. México: Secretaría de Turismo.
- Soffritti Irene, D'Accolti Maria, Lanzoni Luca, Volta Antonella, Bisi Matteo, Sante Mazzacane Sante y Caselli Elisabetta. (2019). The Potential Use of Microorganisms as Restorative Agents: An Update. *Sustainability*, 11, 3853. <https://doi.org/10.3390/su11143853>
- Soria Castro Monserrat. (2019). Análisis petrográficos y petrofísicos en dos litotipos calcáreos, recubiertos con nanomaterias para la conservación del patrimonio cultural de Yucatán. [Tesis de doctorado]. Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional. Unidad Mérida. Departamento de física aplicada.
- Strzałkowski, P., Köken, E., & Sousa, L. (2023). Guidelines for Natural Stone Products in Connection with European Standards. *Materials*, 16(21), 6885. <https://doi.org/10.3390/ma16216885>
- Sun,G.;Liu,X.; Lian, B.;Wang,S. (2025). Research Progresson Vaterite Mineral and Its Synthetic Analogs. *Minerals* 2025, 15, 796. <https://doi.org/10.3390/min15080796>
- Tang, CS., Yin, Ly., Jiang, Nj. et al. (2020). Factors affecting the performance of microbial-induced carbonate precipitation (MICP) treated soil: a review. *Environ Earth Sci* 79, 94 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12665-020-8840-9>
- Tatis Castro Roy David, y Barbosa López Aida Lilliana. (2012). Enfoque químico del deterioro y biodeterioro de rocas calcáreas conformantes de monumentos patrimoniales de importancia histórica y cultural. Universidad de Caldas. *Revista Luna Azul*, (36),247-284.
- Tejero Andrade Andrés, Argote-Espino Denisse L., Cifuentes-Nava Gerardo, Hernández-Quintero Esteban, Rene E. Chávez Rene E., García-Serrano Alejandro. (2018). 'Illuminating' the interior of Kukulkan's Pyramid, Chichén Itzá, México, by means of a non-conventional ERT geophysical survey. *Journal of Archaeological Science* 90 1e11. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2017.12.006>
- Trujillo García Pablo. (2021). La gestión del patrimonio cultural urbano en México, a partir de las declaratorias de Zona de Monumentos Históricos (1972-2018) [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México. Programa de Maestría y Doctorado en Urbanismo. Facultad de Arquitectura.

- Valencia-González, Y., de Carvalho-Camapum, J., & Lara-Valencia, L. A. (2015). Influence of biomineralization on a profile of a tropical soil affected by erosive processes. *Dyna*, 82(192), 221-229.
- Wang, Yuze & Wang, Yong & Soga, Kenichi & Dejong, Jason & Kabla, Alexandre. (2022). Micro-scale investigations of temperature-dependent Microbial-Induced Carbonate Precipitation (MICP) in the temperature range 4-50°C. Department of Ocean Science and Engineering, Southern University of Science and Technology, Shenzhen, China. DOI: 10.48550/arXiv.2202.09815
- Wei S, Cui H, Jiang Z, Liu H, He H, Fang N. (2015). Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments. *Braz J Microbiol* 46 (2): 455-464. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140533>
- Weiner, S., & Dove, P. M. (2003). An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 54(1), 1-29. <https://doi.org/10.2113/0540001>
- Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol*, 173, 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wiktor, V.; Jonkers, H.M. (2011). Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement and Concrete Composites*, v. 33, n. 7, p. 763-770, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012>
- Wu, Yang, Huimin Li, and Yang Li. (2021). Biomineralization Induced by Cells of *Sporosarcina pasteurii*: Mechanisms, Applications and Challenges. *Microorganisms* 9, no. 11: 2396. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112396>
- Yan, Y.; Wang, Y. (2024). A Review of Atmospheric Deterioration and Sustainable Conservation of Calcareous Stone in Historical Buildings and Monuments. *Sustainability* 2024, 16, 10751. <https://doi.org/10.3390/su162310751>
- Zamarreño, D. V., May, E., & Inkpen, R. (2009). Influence of Environmental Temperature on Biocalcification by Non-spring Freshwater Bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 26(4), 298–309. <https://doi.org/10.1080/01490450902895962>

- Zamarreño DV, Inkpen R, May E. (2009). Carbonate crystals precipitated by freshwater bacteria and their use as a limestone consolidant. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Sep;75(18):5981-90. doi: 10.1128/AEM.02079-08. Epub 2009 Jul 17. PMID: 19617383; PMCID: PMC2747845.
- Zamora Crescencio Pedro, Gutiérrez Báez, Folan William J., Domínguez Carrasco Ma. Del Rosario, Villegas Pascale, Cabrera Mis Geucilio, Castro Angulo Claudeth Marielli y Carballo Juan Carlos. (2012). La vegetación leñosa del sitio arqueológico de Oxpemul, municipio de Calakmul, Campeche, México. *Polibotánica* Núm. 33, pp. 131-150, ISSN 1405-2768; México, 2012.
- Zhang, K., Tang, CS., Jiang, NJ. et al. (2023). Microbial-induced carbonate precipitation (MICP) technology: a review on the fundamentals and engineering applications. *Environ Earth Sci* 82, 229 (2023). <https://doi.org/10.1007/s12665-023-10899-y>
- Zhao, Xingqing, Min Wang, Hui Wang, Ding Tang, Jian Huang, and Yu Sun. (2019). "Study on the Remediation of Cd Pollution by the Biomineralization of Urease-Producing Bacteria". *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16, no. 2:268. <https://doi.org/10.3390/ijerph16020268>
- Zhao Y, Li X, Li Y, Bao H, Nan J and Xu G (2023) Rapid biodegradation of atrazine by a novel *Paenarthrobacter ureafaciens* ZY and its effects on soil native microbial community dynamic. *Front. Microbiol.* 13:1103168. doi: 10.3389/fmicb.2022.1103168
- Zhu Z. y Chen P. (2001). Influence of temperature on the ammonification of amino acids in activated sludge. *Water Research.*
- Zulaika, E., Utomo, M. A. P., Pangestu, A. S., Alami, N. H., Shovitri, M., Prasetyo, E. N., & Irawan, C. (2021). Novel carbonatogenic bacterial strain isolated from limestone quarry in East Java, Indonesia to improve concrete performance: Novel bioconcrete bacteria from East Java Limestone Mining. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(9). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220935>

Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
Título de Tesis:	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOMINERALIZANTE Y CONSOLIDANTE DE BACTERIAS CARBONATOGÉNICAS AISLADAS DE ROCAS CALCÁREAS
Autor(a) o autores(ras) de la Tesis:	Biol. Viviana Marcela Gutiérrez Foronda Dra. Susana Del Carmen De la Rosa García Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio.
ORCID:	https://orcid.org/0009-0002-3104-9520
Resumen de la Tesis:	<p>El patrimonio histórico edificado enfrenta un deterioro continuo debido a factores bióticos y abióticos, lo que resalta la necesidad de desarrollar estrategias de conservación sustentables y efectivas. La precipitación de carbonatos inducida por microorganismos (MICP) es una tecnología innovadora con potencial en la bio restauración. En esta investigación, se evaluó la capacidad biomineralizante de 114 bacterias carbonatogénicas autóctonas aisladas de dos sitios arqueológicos mayas (Oxpemul y Chichén Itzá) mediante su crecimiento en diferentes medios de cultivo. Se determinó su actividad ureolítica y el potencial de 22 cepas para la consolidación de arena y sascab, empleando medios líquidos (CCP, B4 y M-3P). Posteriormente, se analizó la capacidad de restauración de estas bacterias en roca caliza (litotipo Chichén Itzá) bajo condiciones <i>in situ</i>, evaluando cinco tratamientos a través de ensayos fisicoquímicos y mecánicos. Nueve cepas destacaron en todo el proceso, precipitando minerales como calcita, aragonita, vaterita, hidroxiapatita y wedelita. De estas, las cepas <i>Arthrobacter sp.</i> (OX4-8C) y <i>Sphingomonas sp.</i> (CHJM-1) fueron las seleccionadas para los ensayos de exposición <i>in situ</i> durante seis meses en los sitios arqueológicos, demostrando una mayor efectividad cuando se encontraban en el medio nutritivo M-3P. La cepa <i>Arthrobacter sp.</i> (OX4-8C) mostró la mejor actividad en todas las etapas experimentales, especialmente en el sitio de Oxpemul, de donde fue originalmente aislada, posicionándola como una candidata prometedora para la bio conservación de estructuras calcáreas en ambientes tropicales.</p>

Palabras claves de la Tesis:	Biom mineralización, Bioconsolidación, Roca caliza, Monumentos históricos, Deterioro.
Referencias citadas:	<p>Achal, V. (2015). Production of Bacteria for Structural Concrete. In: Pacheco Torgal, F., Labrincha, J., Diamanti, M., Yu, CP., Lee, H. (eds). <i>Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering</i>. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09287-4_14</p> <p>Cacchio Paola y Del Gallo Maddalena. (2019). A Novel Approach to Isolation and Screening of Calcifying Bacteria for Biotechnological Applications. <i>Geosciences</i> 2019, 9, 479. https://doi.org/10.3390/geosciences9110479</p> <p>Cameotra Swaranjit S. y C. Dakal Tikam. (2012). Carbonatogenesis: microbial contribution to the conservation of monuments and stone artwork. <i>Conservation Science in Cultural Heritage</i> [en línea], v. 12, pp. 79-108. DOI: https://doi.org/10.6092/issn.1973-9494/3383</p> <p>Elert, K., Ruiz-Agudo, E., Jroundi, F. et al. (2021). Degradation of ancient Maya carved tuff stone at Copan and its bacterial bioconservation. <i>npj Mater Degrad</i> 5, 44 (2021). https://doi.org/10.1038/s41529-021-00191-4</p> <p>Gonzalez Muñoz M. T., Ben Omar N. y Arias J.M. (1996). Biom mineralización: una revisión de algunos de sus aspectos más destacados. Departamento de Microbiología. <i>Ars pharmaceutica</i>, 37:3; 483-518. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. E-18071. Granada. España.</p> <p>González Muñoz, María Teresa; Rodríguez Navarro, Carlos; Jiménez López, Concepción y Rodríguez Gallego, Manuel. (2008). Método y producto para la protección y consolidación de materiales de construcción y ornamentales.</p>

<p style="text-align: center; font-size: 2em; opacity: 0.2; transform: rotate(-45deg);"> Universidad Juárez del Estado de Chihuahua México </p>	<p>Jroundi Fadwa, Schiro Mara, Ruiz-Agudo Encarnación, Elert Kerstin, Martín-Sánchez Inés, González-Muñoz María Teresa y Rodríguez-Navarro Carlos. (2017). Protection and consolidation of stone heritage by self-inoculation with indigenous carbonatogenic bacterial communities. <i>Nature Communications</i> vol 8, Article number: 279. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00372-3</p> <p>Lee Jason S. y Little Brenda J. (2022). Biomineralization: Applied to biodeterioration and bioremediation. <i>Water-Formed Deposits</i>. Capítulo 4, páginas 69-77. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822896-8.00032-7</p> <p>Pyzik, A.; Ciuchcinski, K.; Dziurzynski, M.; Dziewit, L. (2021). The Bad and the Good—Microorganisms in Cultural Heritage Environments—An Update on Biodeterioration and Biotreatment Approaches. <i>Materials</i> 2021, 14, 177. https://doi.org/10.3390/ma14010177</p> <p>Zhang, K., Tang, CS., Jiang, NJ. et al. (2023). Microbial-induced carbonate precipitation (MICP) technology: a review on the fundamentals and engineering applications. <i>Environ Earth Sci</i> 82, 229 (2023). https://doi.org/10.1007/s12665-023-10899-y</p> <p>Zhao, Xingqing, Min Wang, Hui Wang, Ding Tang, Jian Huang, and Yu Sun. (2019). "Study on the Remediation of Cd Pollution by the Biomineralization of Urease-Producing Bacteria". <i>International Journal of Environmental Research and Public Health</i> 16, no. 2:268. https://doi.org/10.3390/ijerph16020268</p>
---	--