

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES DE *BACILLUS SUBTILIS*
USADO EN LA FABRICACIÓN DE BIOCONCRETO CON SILICE DE CASCARILLA DE
ARROZ



KAREN LORENA PARDO MARTINEZ



UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL
VILLAVICENCIO

2023

2023 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES DE *BACILLUS SUBTILIS*
USADO EN LA FABRICACIÓN DE BIOCONCRETO CON SILICE DE CASCARILLA DE
ARROZ

KAREN LORENA PARDO MARTINEZ

Contenido plan de trabajo auxiliar de investigación presentado como requisito para optar al título
de Ingeniero Ambiental

Director

Mg. DIEGO ANDREY CORTES NARANJO

Ingeniero Ambiental

Magister en Gestión sostenible y tecnologías del agua

Codirector

Mg. ANGELA MARÍA SASTOQUE SALCEDO

Microbióloga Industrial

Magister en Manejo de recursos naturales renovables y medio ambiente

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL

VILLAVICENCIO

2023

Autoridades Académicas

P. Álvaro José ARANGO RESTREPO, O.P.

Rector General

P. Mauricio Antonio CORTÉS GALLEGUO, O.P.

Vicerrector Académico General

P. José Antonio BALAGUERA CEPEDA O.P.

Rector Seccional Villavicencio

P. Rodrigo GARCIA JARA, O.P.

Vicerrector Académico Sede Villavicencio

Mg. JULIETH ANDREA SIERRA TOBÓN.

Secretaria de General Seccional Villavicencio

Mg. WILLIAM PEÑARANDA ZÁRATE

Decano de la Facultad de Ingeniería Ambiental

Contenido

Resumen.....	8
Abstract	10
Introducción	12
1. Justificación	14
2. Objetivos del macroproyecto	16
2.1 Objetivo general.....	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. Objetivos de la auxiliatura	17
3.1 Objetivo general.....	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. Metodología.....	18
4.1 Fase I. Identificación de las Condiciones Óptimas de Cultivo para <i>Bacillus subtilis</i>	19
4.1.1 Actividad 1. Revisión bibliográfica de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i>	19
4.1.2 Actividad 2. Revisión bibliográfica de la utilización de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> en el bioconcreto	20
4.1.3 Actividad 3. Prueba de pureza <i>Bacillus subtilis</i> por tinción de Gram en biofertilizantes.....	20
4.1.4 Actividad 4. Evaluación concentración de <i>Bacillus subtilis</i> en biofertilizantes	20
4.1.5 Actividad 5. Repique cultivos bacterianos de cepa madre	20
4.1.6 Actividad 6. Tinción con verde de Malaquita para determinación de esporas	21
4.1.7 Actividad 7. Cuantificación de esporas bacterianas	21
4.2 Fase II. Estandarización de la Cepa Bacteriana <i>Bacillus subtilis</i> para su uso en Bioconcreto.....	21
4.2.1 Actividad 1. Siembra a diferentes concentraciones de lactato de calcio y concentraciones bacterianas	21
4.2.2 Actividad 2. Evaluación y determinación de carbonatos formados in vitro.....	21
4.2.3 Actividad 3. Elección de la suspensión de <i>Bacillus subtilis</i> que presenta mayor producción de carbonato	22

4.3	Fase III. Evaluación de la Resistencia de <i>Bacillus subtilis</i> en el Bioconcreto	22
4.3.1	Actividad 1. Preparación bioconcreto para evaluar físicamente su resistencia	22
4.3.2	Actividad 2. Resistencia del bioconcreto a los 7, 14 y 28 días de preparación.....	22
5.	Resultados y análisis.....	23
5.1	Evaluación de concentración y pureza de la cepa a utilizar de <i>Bacillus subtilis</i>	23
5.2	Identificación de esporas en la cepa de <i>Bacillus subtilis</i>	24
5.3	Determinación de las condiciones nutricionales óptimas para el crecimiento de esporas de <i>Bacillus subtilis</i> y así favorecer la formación de carbonato de calcio.	25
5.4	Evaluación y determinación de carbonatos formados in vitro	26
5.5	Cuantificación de esporas de <i>Bacillus subtilis</i> para determinar concentraciones bacterianas a usar en el bioconcreto.....	28
5.6	Preparación de suspensiones bacterianas para llevar a cabo el diseño de mezcla del bioconcreto.....	30
5.7	Elaboración de especímenes de bioconcreto para evaluar físicamente su resistencia.....	32
5.8	Comportamiento de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> a los 7, 14 y 28 días	34
5.9	Análisis estadístico	36
6.	Conclusiones	47
7.	Referencias.....	49
8.	Anexos.....	53

Lista de tablas

Tabla 1	26
Tabla 2	29
Tabla 3	31
Tabla 4	31
Tabla 5	37
Tabla 6	38
Tabla 7	39
Tabla 8	40
Tabla 9	41
Tabla 10	42
Tabla 11	43
Tabla 12	44

Lista de Figuras

Figura 1	18
Figura 2	23
Figura 3	24
Figura 4	25
Figura 5	27
Figura 6	28
Figura 7	33
Figura 8	35
Figura 9	45

Resumen

El bioconcreto es un material que tiene beneficios significativos para la construcción sostenible, uno de los componentes más importantes en la producción del bioconcreto es la bacteria *Bacillus subtilis*, dado su capacidad para formar carbonato de calcio a partir de lactato de calcio, y una fuente nutritiva como lo es el extracto de levadura. Utilizada para mejorar la resistencia y durabilidad del material. En esta investigación se busca optimizar las condiciones ambientales en la producción de una cepa de *B. subtilis*, aislada de un biofertilizante, seleccionando los tiempos y temperatura de incubación, también la concentración ideal de lactato de calcio, para finalmente ser entregado en Caldo nutritivo (Shanmugam, 2020). Pero para que esta bacteria pueda mantenerse en diferentes situaciones ambientales adversas como cambios de temperatura, pH, humedad, etc., es necesario determinar inicialmente si se encontraba en su etapa esporulada, lo que le permite tener mayor resistencia a las condiciones nombradas anteriormente (MondaL, 2022), el concreto se caracteriza por su alta resistencia a la compresión pero aun así una de las fallas más comunes es la aparición de grietas produciendo una filtración de agua, las esporas bacterianas que se encuentran en estado latente se reactivarán para dar inicio al proceso metabólico de precipitación de carbonato de calcio (CaCO_3) generando así el de las grietas y los poros del material, relacionándose directamente con un mayor tiempo de vida útil, disminución de costos adicionales en la construcción, disminución de CO_2 generado indirectamente la producción de cemento, siendo este gas el principal causante del efecto invernadero (Cuadros, 2019).

Luego de determinar que la cepa de *Bacillus subtilis* está en su fase esporulada y que produce carbonato de calcio en las concentraciones de lactato de calcio de 1,5% y 5%, se procedió a calcular la concentración de esporas que tiene la cepa bacteriana con el fin de establecer las concentraciones bacterianas que favorecen mejor la formación de carbonatos. Por tanto, se estableció que se trabajarían las concentraciones de 10^5 , 10^7 , 10^9 y 10^{11} UFC/ml (Macaya, 2018).

Se evidencio que las mezclas que contienen 1×10^7 UFC/ml de *Bacillus subtilis* en 1,5% de lactato y 1×10^5 UFC/ml de *Bacillus subtilis* en 5% de lactato presentaron los mayores valores de resistencia reportado en Mega pascales y con respecto a las unidades formadoras de colonias registradas en donde la concentración de 10^5 presenta el mayor crecimiento, 10^7 y 10^9 , presentan crecimiento, pero más bajo que el mencionado inicialmente descartándose así 10^{11} ya que su crecimiento fue bajo (ONU, 2023).

Lo que concuerda con varias investigaciones realizadas a nivel mundial en los últimos años y que permite deducir que la mezcla de concreto adicionado con cenizas de cascarilla de arroz y *Bacillus subtilis* enriquecido con lactato de calcio en las concentraciones específicas permite obtener bioconcreto que mejore naturalmente la calidad de las estructuras además por medio de estudios de innovación en las infraestructuras, la industria y el fortalecimiento, favorecer la creación de ciudades y comunidades sostenibles a través de la exploración de nuevos conocimientos que permite contribuir al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible 9 y 11 en nuestro país (United Nations, 2023).

Palabras clave: *Bacillus*, Esporulación, Carbonatos, Biofertilizante, Concentración bacteriana.

Abstract

Bioconcrete is a material that has significant benefits for sustainable construction. One of the most important components in the production of bioconcrete is the *Bacillus subtilis* bacteria, given its ability to form calcium carbonate from calcium lactate, and a nutritional source as yeast extract. Used to improve the resistance and durability of the material. This research seeks to optimize the environmental conditions in the production of a strain of *Bacillus subtilis*, isolated from a biofertilizer, selecting the incubation times and temperature, as well as the ideal concentration of calcium lactate, to finally be delivered in nutrient broth.

But for this bacteria to be able to maintain itself in different adverse environmental situations such as changes in temperature, pH, humidity, etc., it is necessary to initially determine if it was in its sporulated stage, which allows it to have greater resistance to the conditions mentioned above, the Concrete is characterized by its high resistance to compression but even so one of the most common failures is the appearance of cracks producing a water leak, the bacterial spores that are in a dormant state will be reactivated to begin the metabolic process of precipitation of calcium carbonate (CaCO_3), thus generating the sealing of the cracks and pores of the material, directly relating to a longer useful life, reduction of additional costs in construction, reduction of CO_2 generated indirectly in cement production, this being gas the main cause of the greenhouse effect.

After determining that the *Bacillus subtilis* strain is in its sporulated phase and that it produces calcium carbonate at calcium lactate concentrations of 1.5% and 5%, we proceeded to calculate the concentration of spores that the bacterial strain has with in order to establish the bacterial concentrations that best favor the formation of carbonates. Therefore, it was established that concentrations of 105, 107, 109 and 1011 CFU/ml would be used.

It was evident that the mixtures containing 1×10^7 CFU/ml of *Bacillus subtilis* in 1.5% lactate and 1×10^5 CFU/ml of *Bacillus subtilis* in 5% lactate presented the highest resistance values reported in Mega pascals and with respect to the units forming registered colonies where the concentration of 105 presents the highest growth, 107 and 109, present growth, but lower than that initially mentioned, thus discarding 1011 since its growth was low.

This agrees with several investigations carried out worldwide in recent years and allows us to deduce that the mixture of concrete added with rice husk ash and *Bacillus subtilis* enriched

with calcium lactate in specific concentrations allows obtaining bioconcrete that naturally improves quality. of structures in addition through innovation studies in infrastructure, industry and strengthening, and favor the creation of sustainable cities and communities through the exploration of new knowledge that allows contributing to the fulfillment of Sustainable Development Goals 9 and 11 in our country.

Key words- Bacillus, sporulation, carbonates, biofertilizer, bacterial concentration.

Introducción

Las obras de infraestructura civil elaboradas con concreto pueden llegar a sufrir a través del tiempo de agrietamiento por consecuencia de factores físicos, químicos y hasta biológicos, lo cual conduce al deterioro de la estructura reduciendo de forma parcial o total su vida útil.

Para hacer frente a esta problemática, actualmente se han venido avanzando en el campo de los bioconcreto, los cuales tiene como objetivo principal la implementación de bacterias con capacidad de precipitar cristales de carbonato de calcio (CaCO_3) (Montoya, 2005).

Con la adición de dichas bacterias dentro del concreto se obtienen la formación de los cristales necesarios para el sellamiento de las grietas y poros que allí se presenten, y por consiguiente se logrando un incremento en la resistencia y durabilidad de la infraestructura.

Sin embargo, debido a que las condiciones que se presentan dentro del concreto (pH, temperatura, déficit de nutrientes, etc.), que no son favorables para el óptimo crecimiento de las bacterias y la formación de cristales, actualmente se hacen investigaciones que implementan las cepas bacterianas en su forma esporulada. Los estudios han demostrado que las esporas bacterianas pueden sobrevivir durante más de 200 años en ambientes secos; por lo tanto, pueden cumplir con los requisitos de obtener estructuras de concretos más duraderas (Jiang, 2020).

A la mezcla de concreto se aplican, bacterias a base de lactato de calcio, la resistencia del concreto autocurativo resulta mayor que el concreto típico. Este lactato es tomado por la bacteria por medio del proceso de carbonatación, formando los cristales de calcita que pueden sellar grietas y así extender la durabilidad del concreto. La precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias es una forma más eficaz de sellar grietas mediante cristales de calcita (Prosek, 2020).

Por lo tanto, en el marco de esta auxiliatura de investigación, se busca abordar esta problemática, centrándose en la optimización de la producción de la bacteria *Bacillus subtilis*, que desempeña un papel fundamental en la fabricación de bioconcreto, utilizando cascarilla de arroz para dar estructura al concreto.

La importancia de este trabajo radica en la urgente necesidad de encontrar formas más sostenibles de producir bioconcreto, lo que contribuirá a la construcción de edificaciones respetuosas con el medio ambiente y a la reducción de la contaminación asociada con la producción convencional de concreto.

El objetivo general de este trabajo consiste en evaluar el efecto de la bacteria *Bacillus subtilis* en la producción de bioconcreto a partir de cascarilla de arroz como una alternativa sostenible. Para lograr este propósito, se han establecido objetivos específicos que incluyen la identificación de las condiciones óptimas de cultivo para la bacteria, la estandarización de la cepa *Bacillus Subtilis* para su uso como aditivo en el bioconcreto, y la evaluación de la resistencia del bioconcreto en una temporalidad de 7, 14 y 28 días.

1. Justificación

La construcción de edificaciones representa un desafío crucial en la búsqueda de soluciones sostenibles para mitigar el impacto ambiental. La producción de cemento afecta negativamente al medio ambiente, ya que implica la explotación de depósitos naturales de cal y la emisión a la atmósfera de un gran volumen de un gas de efecto invernadero (Naveed, 2022). En este contexto, la ingeniería ambiental enfrenta la necesidad de innovar y encontrar alternativas que reduzcan la huella ecológica que evalúa acumulativamente la huella de energía, carbono, agua, consumo de recursos naturales y el impacto humano general (Husain, 2019).

En ese sentido, el bioconcreto se presenta como una solución que utiliza bacterias para mejorar su resistencia y durabilidad, curando las grietas que se presentan en el concreto aumentando su vida útil y reduciendo así la necesidad de materiales de construcción convencionales. (Preethi, 2023). Por lo tanto, en este trabajo de auxiliatura de investigación se busca optimizar la producción de la bacteria *Bacillus subtilis*, fundamental para la producción de bioconcreto, mediante el uso de cascarilla de arroz como fuente de nutrientes.

En este trabajo de auxiliatura de investigación, la elección de *Bacillus subtilis* como organismo clave para optimizar la producción en el contexto del bioconcreto se basa en diversas características fundamentales respaldadas por la literatura científica. En primer lugar, la capacidad de *Bacillus subtilis* para formar esporas es crucial, ya que estas formas resistentes permiten a la bacteria sobrevivir en condiciones ambientales adversas, asegurando así una producción a largo plazo y la estabilidad del bioconcreto.

Además, la versatilidad en la fuente de nutrientes es un aspecto destacado, ya que *Bacillus subtilis* muestra una notable facilidad de alimentación al consumir lactato de calcio y extracto de levadura. Esta capacidad de utilizar diversas fuentes de nutrientes no solo facilita la optimización del proceso, sino que también contribuye a la sostenibilidad y viabilidad de este.

La elección de *Bacillus subtilis* se respalda también por su comprobada resistencia y adaptabilidad a una amplia gama de condiciones ambientales. Citando estudios previos, se demuestra que esta bacteria puede prosperar en diferentes condiciones de pH, temperatura y otros factores ambientales, lo que es esencial para mantener un rendimiento óptimo en el entorno específico de la producción de bioconcreto.

El respaldo bibliográfico fortalece esta elección, ya que se han llevado a cabo investigaciones previas que han utilizado *Bacillus subtilis* en contextos similares, demostrando su eficacia en la optimización de la producción bacteriana. Este respaldo histórico subraya la idoneidad de *Bacillus subtilis* para el propósito de este estudio.

En última instancia, la relevancia de *Bacillus subtilis* para la producción de bioconcreto se manifiesta en sus características particulares, como la formación de esporas y su capacidad para utilizar lactato de calcio y extracto de levadura. Estos atributos específicos no solo contribuyen a la resistencia y durabilidad del bioconcreto resultante, sino que también respaldan la elección de *Bacillus subtilis* como organismo central en la optimización de la producción para este innovador enfoque bioconcretizador.

La importancia del trabajo radica en la necesidad de encontrar formas más sostenibles de producir bioconcreto, para ayudar a la construcción de edificaciones sostenibles y reducir la contaminación ambiental asociada con su producción convencional. Además, los resultados del proyecto pueden tener implicaciones prácticas para la producción de otros materiales de construcción que utilizan bacterias, lo que hace que los hallazgos sean relevantes y de gran importancia para el avance de la construcción sostenible.

2. Objetivos del macroproyecto

2.1 Objetivo general

Determinar el comportamiento mecánico (compresión, flexión, relación de poisson, elasticidad, impermeabilidad), del concreto con 10% de reemplazo de finos con ceniza de cascarilla de arroz (CCA), bajo diferentes concentraciones de bacterias de la especie *Bacillus*.

2.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones ambientales para el cultivo de bacterias alcalófilas con relación a su capacidad de segregación de carbonato de calcio.
- Implementar un diseño experimental para encontrar las condiciones y concentraciones óptimas para el bioconcreto con bacterias en función de mejorar sus propiedades mecánicas.
- Evaluar el comportamiento mecánico del concreto nutrido con lactato de calcio en una décima parte de adición de sílice de cascarilla de arroz mediante la implementación de bacterias alcalófilas.

3. Objetivos de la auxiliatura

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la bacteria *Bacillus subtilis* en la producción de bioconcreto a partir de sílice de cascarilla de arroz como alternativa sostenible

3.2 Objetivos específicos

- Identificar las condiciones óptimas de cultivo para la bacteria *Bacillus subtilis* para su uso en la producción del bioconcreto.
- Estandarizar el método de la cepa *Bacillus subtilis* para su uso como aditivo en el bioconcreto.
- Evaluar la resistencia del bioconcreto en una temporalidad de 7, 14 y 28 días.

4. Metodología

Se implementó una metodología cuantitativa utilizando herramientas digitales como Excel statistics (ANOVA) (Análisis de la Varianza), esta se utiliza para evaluar y comparar las diferencias significativas en las concentraciones del bioconcreto producido con *Bacillus subtilis* y cascarilla de arroz. Ayuda a determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos de muestras que son 5% y 1,5% de lactato, permitiendo así sacar conclusiones sobre la eficacia y viabilidad de la alternativa sostenible propuesta en la investigación.

Figura 1

Metodología

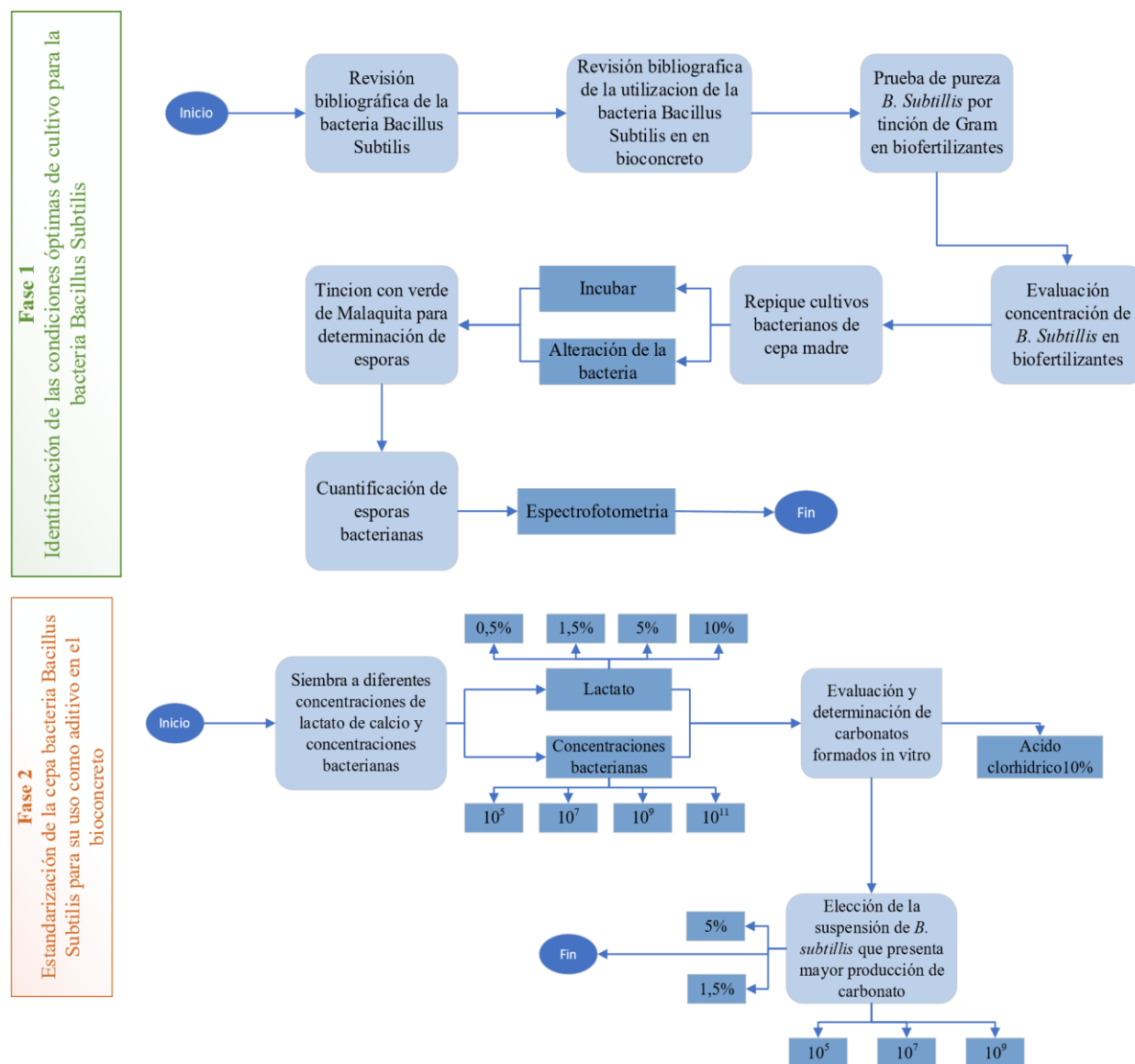
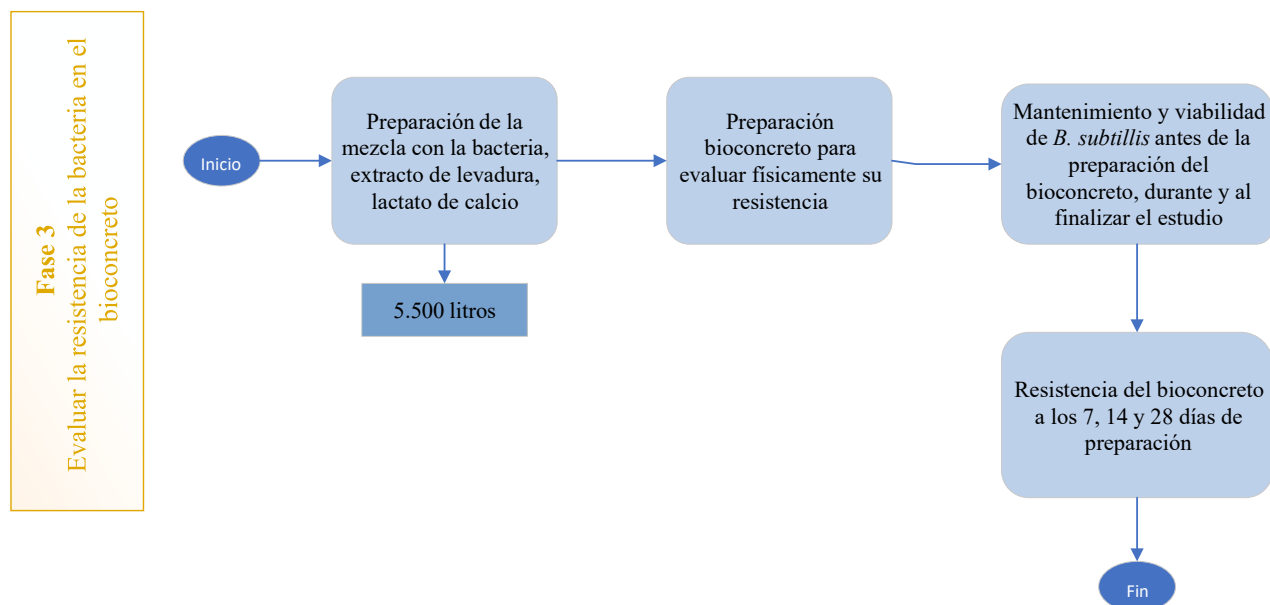


Figura 1*Continuación*

4.1 Fase I. Identificación de las Condiciones Óptimas de Cultivo para *Bacillus subtilis*

Comprende una revisión bibliográfica exhaustiva de la bacteria y su uso en bioconcreto, seguida de pruebas de pureza, evaluación de concentración, repiques de cultivos, tinción de esporas y cuantificación a través de espectrofotometría.

4.1.1 Actividad 1. Revisión bibliográfica de la bacteria *Bacillus subtilis*

Esta actividad consiste en realizar una revisión exhaustiva de la literatura existente sobre la bacteria *Bacillus subtilis*, con el objetivo de obtener información relevante sobre sus características, comportamiento, requerimientos de cultivo, en donde toda la información fue soportada gracias a los recursos de la CRAI.

4.1.2 Actividad 2. Revisión bibliográfica de la utilización de la bacteria *Bacillus subtilis* en el bioconcreto

Se realiza una revisión bibliográfica enfocada específicamente en la utilización de la bacteria *Bacillus subtilis* en la producción de bioconcreto. Se busca información sobre estudios previos que hayan evaluado los efectos de esta bacteria en la resistencia y durabilidad del concreto.

4.1.3 Actividad 3. Prueba de pureza *Bacillus subtilis* por tinción de Gram en biofertilizantes

Consiste en realizar una prueba de tinción de Gram para verificar la pureza de las muestras de la cepa de *Bacillus subtilis* utilizadas en el estudio. La tinción de Gram es una técnica microbiológica que permite distinguir entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo el *Bacillus subtilis* del grupo Gram positivo conocidas por su capacidad de producir metabolitos como, enzimas amilolíticas o proteolíticas que son capaces de formar esporas, estructuras de resistencia que le permiten sobrevivir a condiciones extremas de temperatura o de limitación nutricional (Schallmeyer, 2004).

4.1.4 Actividad 4. Evaluación concentración de *Bacillus subtilis* en biofertilizantes

Se evalúa la concentración de la cepa de *Bacillus subtilis* en los biofertilizantes utilizados en el estudio. Se medirá el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en las muestras, utilizando técnicas microbiológicas (Shanmugam, 2020).

4.1.5 Actividad 5. Repique cultivos bacterianos de cepa madre

Consiste en transferir muestras de la cepa madre de *Bacillus subtilis* a nuevos medios de cultivo, con el objetivo de obtener suficientes células bacterianas para la producción del bioconcreto (Feng, 2021).

4.1.6 Actividad 6. Tinción con verde de Malaquita para determinación de esporas

Se realizará una tinción con verde de malaquita para determinar la presencia de esporas de *Bacillus subtilis* en las muestras de biofertilizantes. La tinción con verde de malaquita es un método comúnmente utilizado para la detección de esporas bacterianas, ya que el colorante se une a las capas externas de la pared celular y de la espora. De esta manera, se podrá evaluar la pureza y la calidad del cultivo bacteriano antes de utilizarlo en la producción de bioconcreto (MondaL, 2022).

4.1.7 Actividad 7. Cuantificación de esporas bacterianas

En esta actividad se cuantifica la cantidad de esporas bacterianas presentes en las muestras de la cepa de *Bacillus subtilis*. Las esporas son estructuras de resistencia que forman las bacterias en condiciones desfavorables y que pueden ser importantes para su supervivencia en el bioconcreto (MondaL, 2022).

4.2 Fase II. Estandarización de la Cepa Bacteriana *Bacillus subtilis* para su uso en Bioconcreto

Se centra en la siembra a diferentes concentraciones de lactato de calcio y concentraciones bacterianas, así como en la evaluación y determinación de carbonatos formados in vitro. Se elige la suspensión de *Bacillus subtilis* que presente la mayor producción de carbonato.

4.2.1 Actividad 1. Siembra a diferentes concentraciones de lactato de calcio y concentraciones bacterianas

Se realizan diferentes siembras de la cepa de *Bacillus subtilis* en medios de cultivo con diferentes concentraciones de lactato de calcio y concentraciones bacterianas, con el objetivo de evaluar el efecto de estas variables en la producción del bioconcreto.

4.2.2 Actividad 2. Evaluación y determinación de carbonatos formados in vitro

Se evalúa la formación de carbonatos in vitro en las muestras de bioconcreto producido con la cepa de *Bacillus subtilis*. Los carbonatos son indicadores importantes de la producción de materiales de construcción sostenibles (Cuadros, 2019).

4.2.3 Actividad 3. Elección de la suspensión de Bacillus subtilis que presenta mayor producción de carbonato

En esta actividad se selecciona la suspensión de la cepa de *Bacillus subtilis* que presente mayor producción de carbonato, con el objetivo de utilizarla en la producción del bioconcreto (Catalina, 2015).

4.3 Fase III. Evaluación de la Resistencia de *Bacillus subtilis* en el Bioconcreto

Implica la preparación de la mezcla con la bacteria, extracto de levadura y lactato de calcio, seguida de la preparación del bioconcreto para evaluar su resistencia física y se evalúa la resistencia del bioconcreto a los 7, 14 y 28 días de preparación.

4.3.1 Actividad 1. Preparación bioconcreto para evaluar físicamente su resistencia

Se prepara el bioconcreto utilizando la suspensión de *Bacillus subtilis* seleccionada previamente y se lleva a cabo pruebas de resistencia física, tales como la compresión y la flexión. Esta actividad es importante para determinar la calidad del bioconcreto.

4.3.2 Actividad 2. Resistencia del bioconcreto a los 7, 14 y 28 días de preparación

Se observa y analiza el comportamiento del bioconcreto con la bacteria *Bacillus subtilis* en el a diferentes periodos de tiempo, comprobando el crecimiento de la bacteria a partir de una siembra en agar nutritivo por cada una de las muestras tomadas.

5. Resultados y análisis

5.1 Evaluación de concentración y pureza de la cepa a utilizar de *Bacillus subtilis*

Con el fin de determinar la pureza y confirmar la concentración de las dos cepas a evaluar aisladas de biofertilizantes de diferentes marcas comerciales, se llevó a cabo la siembra masiva en superficie en agar nutritivo de cada una de estas y se llevó a incubación a 36° C durante 24 horas.

Al cabo del período de incubación se evidenció que la cepa del biofertilizante 1 tiene una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, es decir realmente es más baja que la concentración que se referencia en su envase (1×10^9 UFC/ml). Mientras que la cepa del biofertilizante 2 presentó una concentración de $8,4 \times 10^9$ UFC/ml, que se mantiene como lo referencia en su envase (1×10^9 UFC/ml). Por esta razón se utilizaron las colonias obtenidas en las siembras de Bayer, que corresponden con la descripción macroscópica de *Bacillus subtilis* realizada por (Quiros, 2013), las cuales son colonias de borde aserrado, centro elevado en forma de anillo con consistencia cremosa y pegajosa, como se evidencia a continuación.

Figura 2

Colonias de Bacillus subtilis en agar nutritivo obtenidas de Biofertilizante 2.

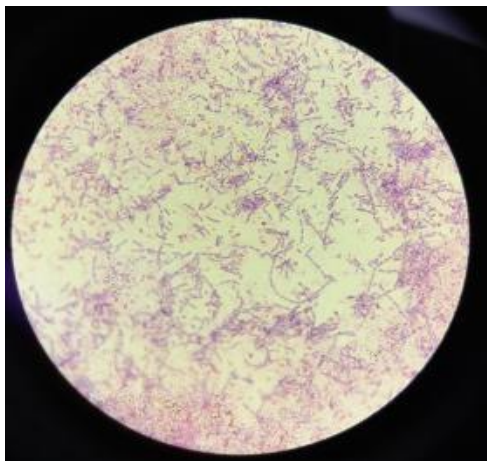


Para valorar la pureza de las colonias obtenidas en el biofertilizante 2 se realizó una coloración de Gram, que permite distinguir las bacterias entre Gram positivas y Gram negativas,

dependiendo de las características de su pared celular. *Bacillus subtilis* es un bacilo Gram positivo, es decir que al realizar la coloración de Gram se observa de color morado bajo el microscopio, debido a la capa gruesa de mureína o peptidoglicano que tienen en su pared celular.

Figura 3

Coloración de Gram de colonias de *Bacillus subtilis* aisladas del biofertilizante de Bayer



5.2 Identificación de esporas en la cepa de *Bacillus subtilis*

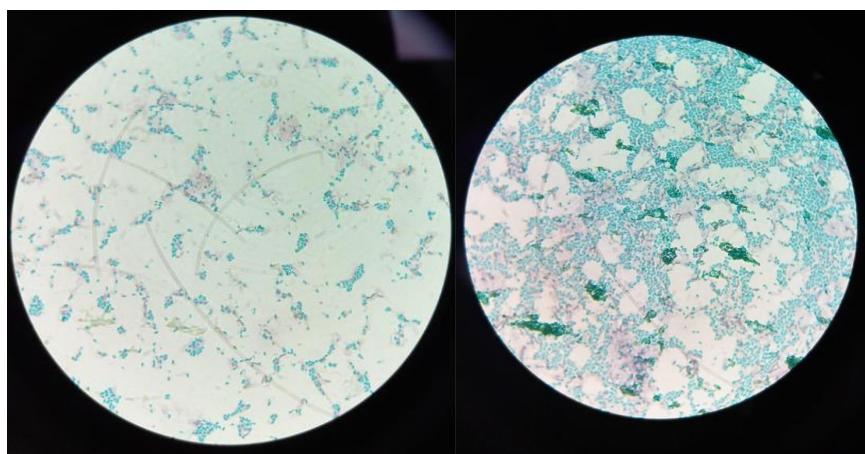
Según lo observado en la coloración de Gram, se pudo evidenciar formación de esporas en la cepa a utilizar en el proyecto, lo cual es lo ideal, ya que normalmente dentro del concreto se generan condiciones bastantes hostiles como un alto pH interno, sequedad relativa, la falta de nutrientes, etc., lo cual dificulta la supervivencia de la célula vegetativa (sin espora) de *Bacillus subtilis* dentro de este. Por lo tanto, el uso en forma esporuladas de la cepa bacteriana garantizara la supervivencia de esta dentro del concreto; esta técnica tiene como mecanismo de acción, que al primer contacto de la espora con el agua del concreto se activara dejándola de nuevo como célula vegetativa y así generar el proceso metabólico de la precipitación de carbonato de calcio (Sunil Pratap, 2010).

Para asegurar la presencia de esporas en *Bacillus subtilis* se realizó la coloración con verde de malaquita la cual penetra la pared celular y permite observarla bajo el microscopio de color verde, al interior del bacilo Gram positivo. La presencia de esporas nos permitirá trabajar con una cepa mucho más resistente a lo largo del tiempo y a diferentes condiciones ambientales, lo que la

hace una excelente candidata para la obtención del bioconcreto. En la ilustración 3 se evidencian las esporas y el contraste de color mencionado anteriormente.

Figura 4

Coloración con verde de malaquita de la cepa de *Bacillus subtilis* aislada del biofertilizante Bayer



5.3 Determinación de las condiciones nutricionales óptimas para el crecimiento de esporas de *Bacillus subtilis* y así favorecer la formación de carbonato de calcio.

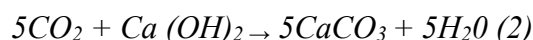
Para determinar las concentraciones de lactato, al igual que la concentración bacteriana ideal para lograr la precipitación biológica del carbonato de calcio, inicialmente es importante entender que esta se da cuando *Bacillus subtilis* se encuentra en un medio enriquecido, como lo es al caldo nutritivo usado en esta investigación además de 5% de extracto de levadura, la cual contiene aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en agua e hidratos de carbono y se usó como aditivo para el medio de cultivo usado. Además, se debe determinar el porcentaje ideal de lactato de calcio usado para favorecer tanto el crecimiento bacteriano como la producción de carbonatos de calcio.

Teniendo en cuenta lo anterior, la fuente de calcio proporcionada para este estudio consistió en el lactato de calcio y la conversión metabólica bacteriana del lactato de calcio ocurre de acuerdo a la siguiente reacción



Una molécula de lactato de calcio ($\text{CaC}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$) reacciona con 6 moléculas de oxígeno (O_2), lo que produce una molécula de carbonato de calcio (CaCO_3), 5 moléculas de dióxido de carbono (CO_2) y 5 de agua (H_2O).

Las moléculas de CO_2 producidas son capaces de reaccionar con el hidróxido del calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) aportado por el cemento y formar mayor cantidad de CaCO_3 junto con moléculas de agua (2) (Jonkers, 2010).



Como se observa en la ecuación 2 al final del proceso metabólico de *Bacillus subtilis* se genera a partir de una molécula de lactato de calcio 5 moléculas de carbonato, lo que se traduce como un proceso muy eficiente en términos del metabolito de interés producido y a muy bajo costo económico. Conociendo claramente el proceso metabólico producido por *Bacillus subtilis* y después de revisar varias investigaciones en donde se llevó a cabo la producción de carbonato de calcio a partir de lactato de calcio para la elaboración de bioconcreto se concluyó que se trabajarían las siguientes concentraciones bacterias y de lactato, con el fin de determinar en cuál de estas se da una mayor producción de carbonatos evaluadas en el laboratorio.

Tabla 1

Concentración bacteriana y de lactato de calcio usadas para este proyecto

Extracto de levadura	5 g/l				
Lactato de calcio	0,5%	1,5%	5%	10%	20%
B. subtilis	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5
	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7
	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9

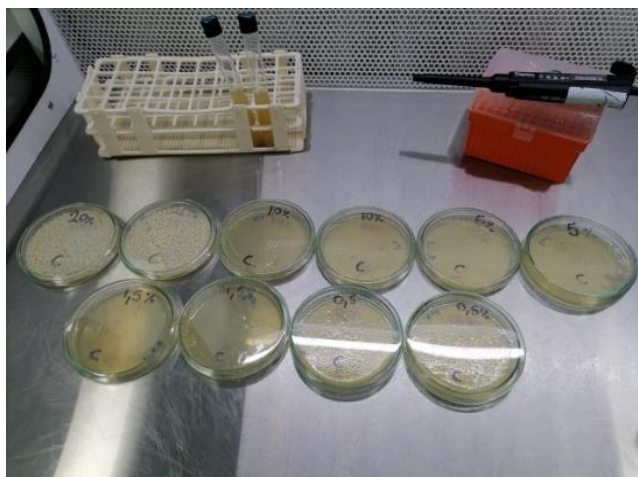
5.4 Evaluación y determinación de carbonatos formados in vitro

Con el fin de poder encontrar las concentraciones ideales de lactato de calcio usadas para las diferentes mezclas y así mismo conocer en cuál de estas se presentó la mayor cantidad de

carbonato de calcio producido por *Bacillus subtilis*; se realizó la siembra 10 ml de la cepa de *Bacillus subtilis* del biofertilizante 2 en 90 ml de Caldo nutritivo y se llevó a incubación durante 48 horas a 35 °C. A partir de esta suspensión bacteriana se realizó una siembra masiva de 0,1 ml en cada una de las cajas de Petri que contienen las concentraciones de lactato descritas en la tabla 2, y estas cajas se llevaron a incubación por 15 días a 35 °C.

Figura 5

Siembra de Bacillus subtilis a diferentes concentraciones de lactato de calcio para determinar producción de carbonatos



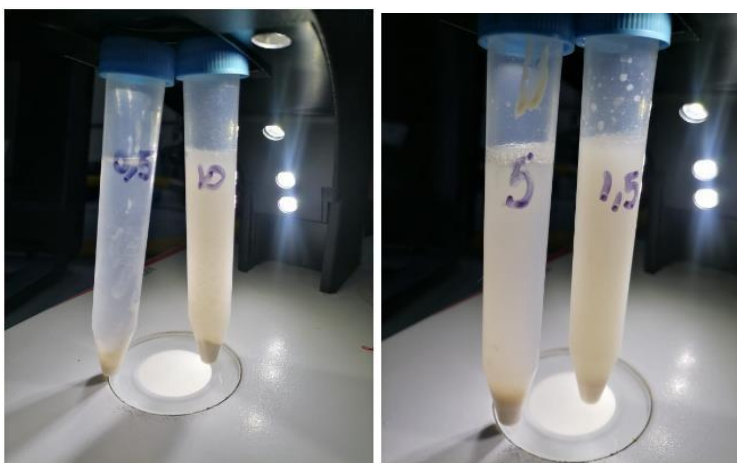
Luego del período de incubación se evaluó la formación de carbonato de calcio por medio del método descrito por (Montoya, 2005), en donde los cristales obtenidos en la superficie de las cajas de Petri se lavaron con 5 ml de agua destilada estéril y se llevaron a un frasco schott. De allí se sometieron a ebullición (97-98°C) por 15 min, después se llevaron a centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos. Posterior a este proceso se descarta el sobrenadante con el fin de desligar los cristales de los somas bacterianos y recuperar la mayor cantidad posible de mineral, esta operación se repite tres veces.

Finalmente, la suspensión se filtra, para su posterior análisis. De los anteriores cristales recogidos se debe determinar la presencia de carbonatos, esto se hace utilizando HCl al 10% en frío, donde la reacción de los carbonatos con el ácido clorhídrico disuelve los cristales y produce un desprendimiento de, esto se determina mediante la aparición de efervescencia en la muestra.

Los resultados mostraron aparición de carbonatos en las concentraciones de lactato de calcio de 0,5%, 1,5%, 5% y 10%, como se observa en la ilustración 4.

Figura 6

Formación de carbonatos por adición de HCl evidenciado por efervescencia en la muestra.



5.5 Cuantificación de esporas de *Bacillus subtilis* para determinar concentraciones bacterianas a usar en el bioconcreto

Teniendo en cuenta esta información se realizó la siembra de *Bacillus subtilis*, pero en líquido, es decir en caldo nutritivo adicionado con 5% de extracto de levadura y cada una de las concentraciones de lactato en donde se dio la aparición de carbonato, para poder establecer definitivamente cuál de estas concentraciones presenta mayor concentración de esporas y por tanto mayor producción de carbonato como metabolito bacteriano.

La cuantificación de esporas se realizó usando una suspensión bacteriana. Se adicionaron 10 ml de esta suspensión a 4 frascos Schoot con 90 ml de caldo nutritivo, 5% de extracto de levadura y adicionado con 0,5%, 1,5%, 5% y 10% de lactato de calcio, respectivamente. Los 4 frascos se llevaron a incubación por 15 días a 35 °C para mantener las mismas condiciones de las pruebas hechas en la caja de Petri.

Después del período de incubación, la solución se lavó para eliminar el medio de cultivo y obtener una solución más concentrada de bacterias. Para ello, los medios de cultivo con diferentes concentraciones de lactato y bacterias se centrifugaron en tubos Falcon durante 20

minutos a 3600 rpm de centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se reemplazó con solución salina al 0,85 %. El experimento se repitió dos veces ($n = 2$).

La cuantificación de las bacterias cultivadas se realizó con el espectrofotómetro con lectura a una longitud de onda de 600 nm. Para esta prueba se utilizaron dos muestras: el control con solución salina al 0,85% y la bacteria crecida en caldo nutritivo disuelta en solución salina al 0,85%. Para calcular la concentración de bacterias en el medio a través de la absorbancia se aplicó la Ecuación $Y = 8,59 \times 10^7 \times X^{1,3627}$, donde Donde X = Absorbancia y Y = Concentración de esporas en ml (Schwantes-Cezario, 2017)

A partir de esta cuantificación de esporas se obtuvieron los resultados evidenciados en la tabla 2, en donde en las pruebas realizadas con 1,5% y 5% presentaron concentraciones de esporas de *Bacillus subtilis* mayores a los 2 millones, y este resultado comparado con el obtenido en la formación de carbonatos, permite deducir que estas serán las concentraciones de lactato de calcio que se usarán para proceder a realizar las pruebas de resistencia en la mezcla de bioconcreto, en donde se presenta una mayor concentración de esporas que representa a su vez una mayor producción de carbonatos que reducirán a largo plazo las fisuras y desgastes propios del paso del tiempo.

Tabla 2

Resultados concentración de esporas a concentraciones de lactato de 0,5%, 1,5%, 5% y 10%

Cepa + Caldo + Lactato			
	Absorbancia		Concentración Esporas/ml
0,5%	0,043	0,014	1179833,24
1,5%	0,072	0,028	2381662,16
5%	0,069	0,026	2247464,39
10%	0,021	0,00517	444305,2007

Se llevaron a cabo mediciones para establecer las concentraciones adecuadas de esporas de *Bacillus subtilis* a utilizar en la producción de bioconcreto. Los resultados destacan dos concentraciones específicas que sobresalen significativamente: el 1,5% con una cantidad de 2,381,662.16 esporas y el 5% con una cantidad de 2,247,46439 esporas.

Estos hallazgos son de particular relevancia ya que demuestran que las concentraciones de esporas más altas, especialmente en el caso del 1,5%, superan significativamente a otras concentraciones evaluadas en este estudio. La presencia de una cantidad sustancial de esporas en estas concentraciones podría ser un factor clave para mejorar la efectividad del *Bacillus subtilis* como aditivo en el bioconcreto.

La concentración de 1,5% es especialmente notable, ya que no solo tiene una alta cantidad de esporas, sino que también es más baja en comparación con el 5%, lo que podría resultar en un uso más eficiente de los recursos. Puede implicar una producción más eficaz de bioconcreto sin comprometer la calidad ni aumentar innecesariamente el uso de la bacteria.

Los resultados resaltan que las concentraciones de 1,5% y 5% son las más prometedoras en términos de cantidad de esporas de *Bacillus subtilis*, lo que sugiere que estas concentraciones deben considerarse como las principales opciones a utilizar en la producción de bioconcreto. Estos resultados brindan una base sólida para avanzar en la investigación y el desarrollo de bioconcreto sostenible y eficaz.

5.6 Preparación de suspensiones bacterianas para llevar a cabo el diseño de mezcla del bioconcreto.

Para poder obtener las suspensiones bacterianas de 10^5 , 10^7 , 10^9 y 10^{11} determinadas, se realizaron una serie de siembras a diferentes concentraciones tomada de la suspensión inicial de *Bacillus subtilis*. Esta suspensión inicial se obtuvo sembrando 10 ml de la cepa de *Bacillus subtilis* del biofertilizante de Bayer en 90 ml de Caldo nutritivo y se llevó a incubación durante 48 horas a 35 °C.

Luego de este periodo de incubación se realizaron diluciones de esta suspensión de 10^1 hasta 10^9 , para cuantificar las esporas por medio del método espectrofotométrico descrito y de igual manera cuantificar las colonias obtenidas por siembra en superficie en cajas de Petri con Agar Nutritivo.

Conocer los datos de la concentración de esporas antes de iniciar el proceso de mezcla del bioconcreto, permitirá extrapolar la información al momento de hacer la cuantificación de colonias de *Bacillus subtilis* luego del tiempo de fraguado del bioconcreto, y determinar si siguen manteniendo la misma concentración de esporas. En la tabla 3 se muestran los resultados de la

concentración de esporas obtenidas a diferentes diluciones de la suspensión inicial de *Bacillus subtilis*.

Tabla 3

Concentración de esporas Bacillus subtilis en diferentes diluciones a partir de la suspensión inicial

Diluciones			
	Absorbancia	Concentración Esporas/ml	
1.00E+09	0,124	0,058	4995729,26
1.00E+08	0,029	0,008	689767,80
1.00E+07	0,009	0,002	140035,91
1.00E+06	0,007	0,001	99427,90
1.00E+05	0,011	0,002	184076,77
1.00E+04	0,002	0,000	18034,61
1.00E+03	0,012	0,002	207249,48
1.00E+02	0,003	0,000	31337,64
1.00E+01	0,005	0,001	62860,75

En la tabla 4 se observa la concentración bacteriana obtenida luego de diluir la suspensión inicial que es de 1×10^9 UFC/ml; esta información permite conocer la dilución que debe hacerse para obtener las concentraciones de 10^5 , 10^7 , 10^9 y 10^{11} que se usaron para ser las mezclas de bioconcreto.

Tabla 4

Concentración de Bacillus subtilis en diferentes diluciones a partir de la suspensión inicial

Diluciones	Caja 1	Caja 2	UFC total	UFC LOG 10
4	1860000	2500000	2.18E+06	6.34
5	10700000	Incontable	1.07E+07	7.03

Tabla 4*Continuación*

6	150000000	175000000	1.63E+08	8.21
7	1810000000	700000000	1.26E+09	9.10
8	6600000000	Incontable	6.60E+09	9.82
9	123000000000.00	57000000000	9.00E+10	10.95

Para conocer las diluciones se puede tomar el ejemplo para obtener la concentración 10^7 UFC/ml, en donde a partir de la suspensión inicial se deben hacer 5 diluciones seriadas, y así se obtiene la concentración de $1,07 \times 10^7$ UFC/ml como se observa en la tabla 4. Para el caso de la dilución de 10^9 UFC/ml, a partir de la suspensión inicial se deben hacer 3 diluciones seriadas, y así se obtiene la concentración de $1,26 \times 10^9$ UFC/ml. Para la dilución de 10^5 UFC/ml se deben hacer 8 diluciones seriadas, y así se obtiene la concentración de $1, \times 10^5$ UFC/ml, y por último para la concentración de 10^{11} UFC/ml no se hacen diluciones, por el contrario, se deja crecer la suspensión inicial durante 72 horas incubando a 35°C .

De esta manera se hacen las mezclas de bioconcreto cambiando el agua adicionada por la cepa en la concentración definida contenida en caldo nutritivo, extracto de levadura 5% y el porcentaje de lactato de calcio, bien sea 1,5% o 5%.

5.7 Elaboración de especímenes de bioconcreto para evaluar físicamente su resistencia

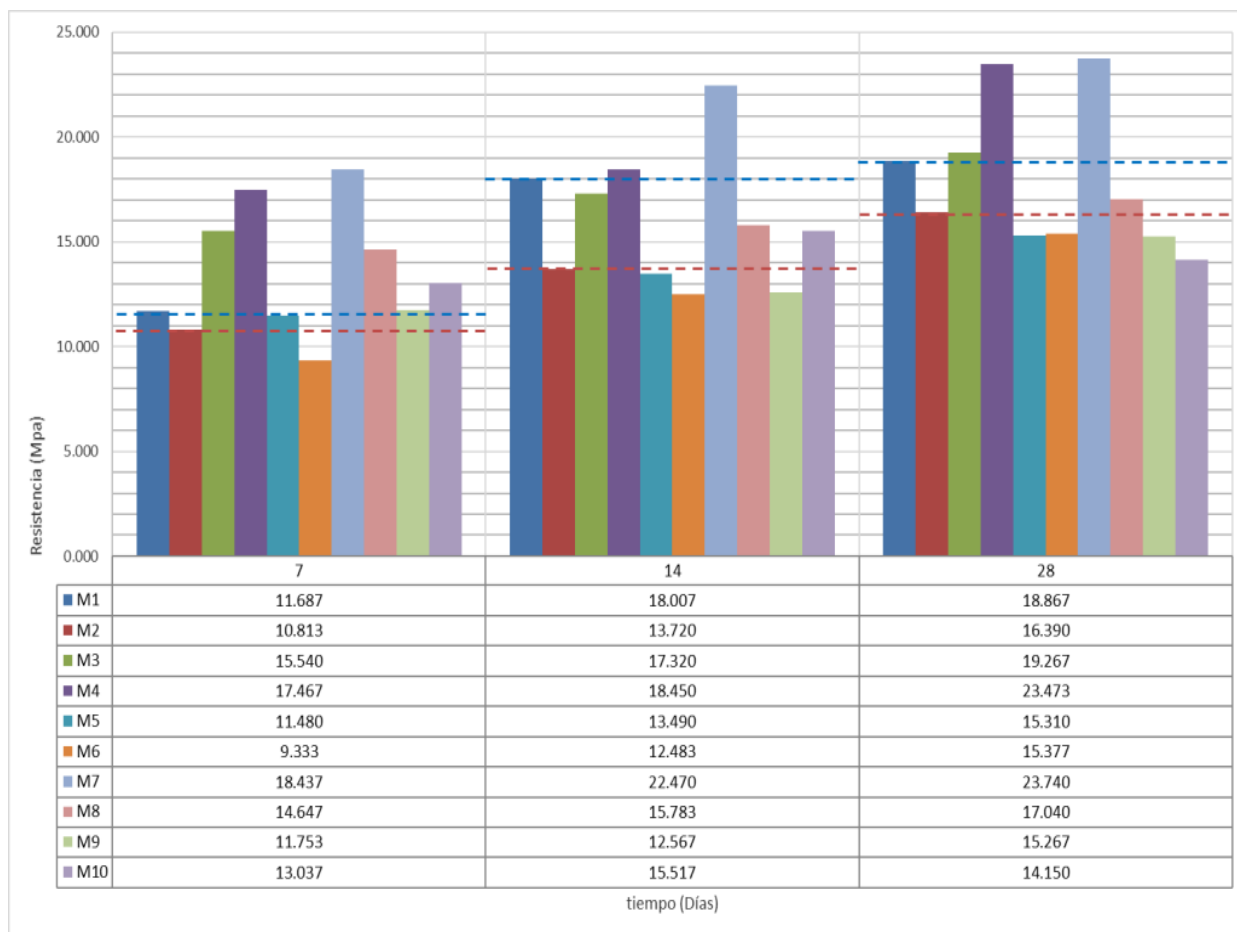
Se realizó la fabricación de los especímenes de concreto, teniendo en cuenta una muestra de concreto convencional, otra muestra con adición del 10% de Cenizas de Cascarilla de Arroz y finalmente otra muestra con adición Cenizas de Cascarilla de Arroz nutrida con lactato de calcio en combinación con la bacteria *Bacillus subtilis* en diferentes concentraciones (10^5 , 10^7 , 10^9 y 10^{11} UFC/ml), estos se desencoformarán y se pondrán en la piscina de curado.

Luego de preparar las muestras de concreto se realizaron ensayos a compresión en los días 7, 14 y 28 días del tiempo de fraguado del concreto, teniendo en cuenta las fechas del cronograma presentado en la tabla 5 (anexos), donde se obtendrán y recolectarán los diferentes resultados para su respectivo análisis.

Las mezclas que contienen 1×10^7 UFC/ml de *Bacillus subtilis* en 1,5% de lactato y 1×10^5 UFC/ml de *Bacillus subtilis* en 5% de lactato presenta los mayores valores de resistencia reportado en Mpa, como se muestra en la siguiente gráfica.

Figura 7

Gráfica de resistencia del concreto a diferentes concentraciones de *Bacillus subtilis* y lactato al 1,5% y 5%



Estos resultados coinciden con lo reportado por (Osman, 2021), en donde se evaluó la aplicación interna de bacterias del género *Bacillus sp.* y nutrientes en concretos bacterianos agrietados tratados en agua dulce y agua de mar, revelando que 5×10^7 células/ml fueron más eficaces en el proceso de curación, en agua dulce que los concreto pre curados en agua de mar. La grieta de estos especímenes fue rellenada en su totalidad, con depósitos blancos después de una semana de tratamiento. La matriz curada en agua dulce, preparada con 5×10^5 células de *Bacillus*

sp. mostró una microestructura refinada y homogénea y un crecimiento significativo de cristales de calcita, los cristales son de formas esféricas, cúbicas y romboédricas.

De igual manera según los estudios de (Rajani, 2019) el hormigón con *Bacillus*, *E.coli* y *Bacillus subtilis* JC3, inducido a una concentración celular de 10^5 células/ml, mejora las propiedades del hormigón, respecto a las muestras de control, obteniendo una mayor resistencia a la compresión el hormigón con *Bacillus subtilis* JC3. Así mismo, en el estudio realizado por (Rong, 2020), incorporando *Bacillus subtilis* en concentraciones de 10^3 , 10^5 y 10^7 células/ml, el mejor resultado se obtuvo con una concentración bacteriana de 10^5 células/ml. Estos resultados se debieron a la reacción del ion carbonato con el ion calcio, producido como consecuencia de la actividad metabólica de las bacterias ureolíticas, induciendo la formación de carbonato cálcico.

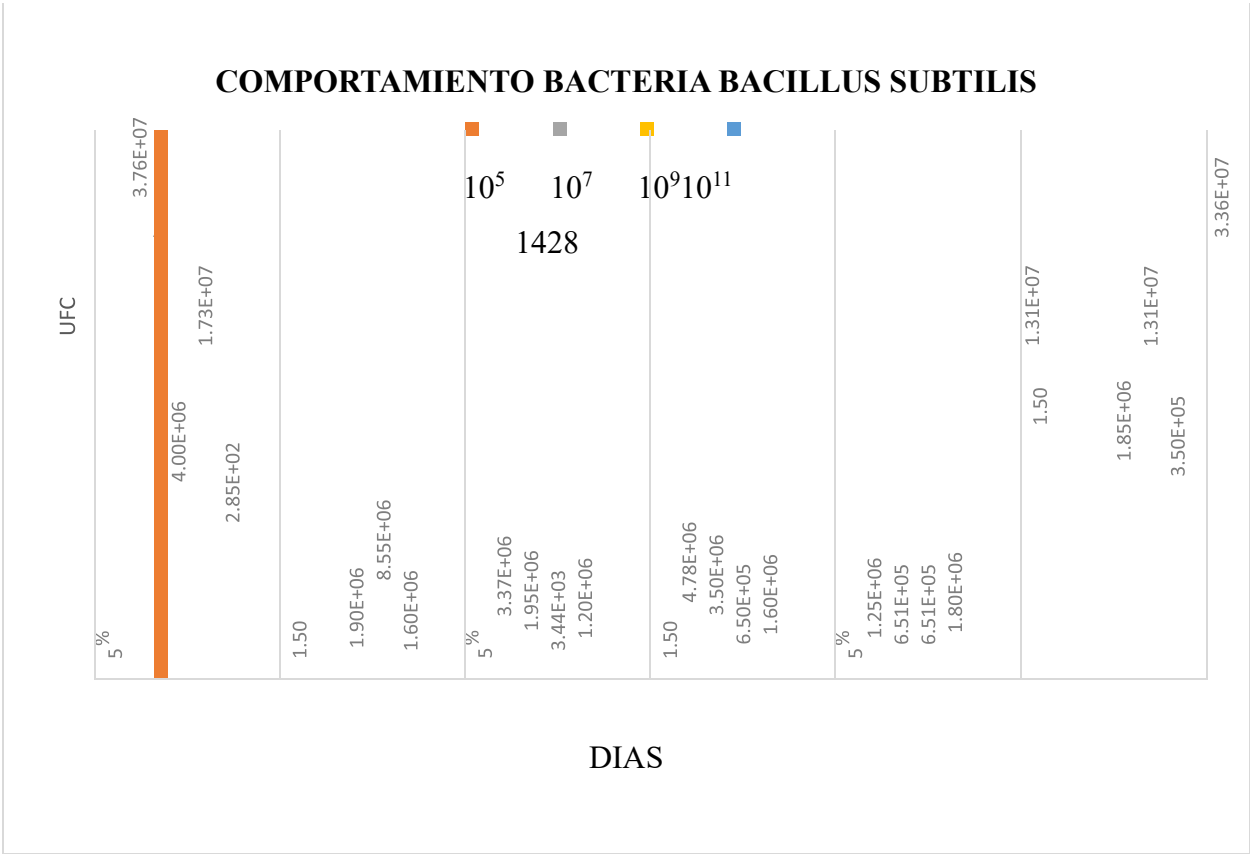
5.8 Comportamiento de la bacteria *Bacillus subtilis* a los 7, 14 y 28 días

Los datos recolectados se basan en una serie de diluciones generales de *Bacillus subtilis*. Estas diluciones generales incluyen 10^5 , 10^7 , 10^9 y 10^{11} . Cada una de estas diluciones generales se divide en tres diluciones específicas, que son 10^1 , 10^3 y 10^5 .

Estas diluciones específicas se aplican en diferentes momentos, es decir, a los 7, 14 y 28 días del estudio. Por lo tanto, se obtiene una matriz de datos que comprende la combinación de las diluciones generales (10^5 , 10^7 , 10^9 , 10^{11}), las diluciones específicas (10^1 , 10^3 y 10^5), y los tres intervalos de tiempo (7, 14 y 28 días).

Además, es importante tener en cuenta que, durante estas pruebas, se emplearon dos porcentajes de lactato, que son el 5% y el 1,5%. Estos porcentajes de lactato se utilizan como factores adicionales que pueden influir en el comportamiento de *Bacillus subtilis* en el bioconcreto. Los datos recopilados en esta actividad se evidencian en el gráfico 2, incluyen una amplia gama de condiciones experimentales, que se derivan de las diferentes diluciones generales, diluciones específicas, intervalos de tiempo y los dos porcentajes de lactato empleados. Esto permitirá analizar cómo estos factores afectan el comportamiento de *Bacillus subtilis* en el contexto del bioconcreto y proporcionará una visión detallada de su respuesta en diferentes condiciones.

Figura 8
Gráfica de comportamiento de la bacteria



Los recuentos de colonias realizados a los 7, 14 y 28 días tienen un propósito fundamental en esta investigación. Su objetivo principal es evaluar cómo la concentración inicial de la bacteria *Bacillus subtilis*, representada por diferentes diluciones (10^5 , 10^7 , 10^9 y 10^{11}), afecta su crecimiento en el contexto del bioconcreto y cómo este crecimiento se ve influenciado por dos porcentajes de lactato, 1,5% y 5%.

Luego de realizar el recuento de las colonias se logra identificar que la dilución en la que la bacteria mantuvo su crecimiento fue 10^5 y 10^9 sin descartar que en la dilución de 10^7 se evidencia crecimiento, garantizando así que se introduzca una cantidad adecuada de bacterias para lograr los efectos deseados en el material. Se realizó el ejercicio con el 10^{11} en donde su crecimiento no fue significativo ni en la temporalidad ni con los porcentajes de lactato trabajados.

El seguimiento a lo largo del tiempo (7, 14 y 28 días) permite comprender cómo la bacteria se comporta a medida que avanza el proceso de fraguado y endurecimiento del concreto. Esto es vital para evaluar la viabilidad de usar *Bacillus subtilis* en proyectos de construcción a largo plazo.

Es importante resaltar que los datos obtenidos en los 28 días confirman que la bacteria se mantiene en esta temporalidad y preferiblemente con el 1,5% de lactato, con 10^7 se evidencia mayor crecimiento a los 7 y 14 días en los dos porcentajes de lactato.

5.9 Análisis estadístico

En el contexto de esta investigación sobre el comportamiento de la bacteria *Bacillus subtilis* en el bioconcreto, se llevó a cabo un análisis estadístico fundamental para evaluar las diferencias significativas entre grupos de muestras. Este análisis se realizó con el objetivo de obtener una comprensión más profunda y cuantitativa de cómo los factores específicos, como las diferentes diluciones y la presencia de lactato, afectan el crecimiento bacteriano. El proceso de análisis estadístico se dividió en varias etapas:

- **Prueba F para Varianza:** Inicialmente, se aplicó la prueba F para la varianza a dos muestras de cada dilución. Esta prueba evaluó si las muestras dentro de cada dilución presentaban diferencias significativas en términos de varianza.
- **Prueba t para Dos Muestras con Suposición de Varianzas Iguales:** A partir de los resultados de la prueba F, se procedió a realizar la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales. Esto se hizo cuando las varianzas entre las muestras comparadas se consideraron similares. La prueba t se utilizó para determinar si existían diferencias significativas en las medias de las muestras.
- **Prueba t para Dos Muestras con Suposición de Varianzas Desiguales:** En los casos donde las varianzas entre las muestras comparadas resultaron significativamente diferentes, se optó por realizar la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales. Esta prueba ajusta el análisis teniendo en cuenta las diferencias en la varianza y evalúa si las diferencias en las medias de las muestras son estadísticamente significativas.

5.9.1 Prueba estadística datos de concentración 10^5

Tabla 5

Prueba F para varianza de dos muestras 10^5

Prueba F para varianzas de dos muestras		
10^5		
	5%	1.50%
Media	776265	226370.5
Varianza	4.5037E+11	1.02486E+11
Observaciones	2	2
Grados de libertad	1	1
F	4.39441104	
P (F<=f) una cola	0.28336384	
Valor crítico para F (una cola)	161.447639	

En esta prueba F, estamos comparando las varianzas de dos muestras de la dilución 10^5 con diferentes porcentajes de lactato: 5% y 1,5%. El valor calculado de F es 4.39441104, mientras que el valor crítico para F (una cola) es 161.447639.

Dado que el valor calculado de F (4.39441104) es mucho menor que el valor crítico para F (161.447639), no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula de que las varianzas de las dos muestras son iguales o similares.

El valor p (P(F<=f) una cola) obtenido es 0.28336384, que es mucho mayor que (0.05) (Domínguez, 2020). Esto respalda aún más la conclusión de que las varianzas son similares. Dado que no hay evidencia estadística para afirmar que las varianzas son diferentes, podemos asumir que las medias también son parecidas entre las dos muestras.

Según los resultados de la primera Prueba F, no hay diferencias significativas en las varianzas de las dos muestras de la dilución 10^5 con porcentajes de lactato del 5% y 1,5%. Esto sugiere que las medias de estas muestras también pueden considerarse parecidas. Estos hallazgos son importantes para el análisis estadístico posterior que es la prueba t para dos muestras

suponiendo varianzas iguales y brindar una base para comparar adecuadamente las medias de las muestras.

Tabla 6

Prueba t para dos muestras iguales 10^5

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
10^5		
	<i>5%</i>	<i>1.50%</i>
Media	1767510	201913.6667
Varianza	3.17288E+12	53037560620
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	1.61296E+12	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1.509779627	
P (T<=t) una cola	0.102805308	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P (T<=t) dos colas	0.205610615	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

En esta prueba t, estamos comparando las medias de dos grupos de datos, uno con un porcentaje de lactato del 5% y otro con un porcentaje del 1,5%, ambas muestras con 3 observaciones. El valor calculado del estadístico t es 1.509779627, mientras que el valor crítico de t (una cola) es 2.131846786.

Dado que el valor calculado de t es menor que el valor crítico de t (una cola), no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula de que las medias de los dos grupos son

iguales. El valor p ($P(T \leq t)$ una cola) obtenido es 0.102805308, que es mucho mayor que el nivel de significancia al 5% (0.05). Esto respalda la conclusión de que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los dos grupos. El valor p ($P(T \leq t)$ dos colas) también es mayor que 0.05.

Según los resultados de la Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales, no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos con porcentajes de lactato del 5% y 1,5%. Esto sugiere que, en términos de crecimiento bacteriano, no se observan diferencias significativas entre estas dos condiciones. Estos hallazgos son importantes para comprender mejor el comportamiento de la bacteria en diferentes condiciones de lactato en el contexto del bioconcreto.

5.9.2 Prueba estadística datos de concentración 10^7

Tabla 7

Prueba F para varianza de dos muestras 10^7

Prueba F para varianzas de dos muestras		
10^7		
	5%	1.50%
Media	1300312.5	2675142.5
Varianza	8.4419E+11	1.36078E+12
Observaciones	2	2
Grados de libertad	1	1
F	0.62037054	
P ($F \leq f$) una cola	0.42472492	
Valor crítico para F (una cola)	0.00619396	

En esta primera Prueba F, estamos comparando las varianzas de dos muestras de la dilución 10^7 con diferentes porcentajes de lactato: 5% y 1,5%.

El valor calculado de F es 0.62037054, mientras que el valor crítico para F (una cola) es extremadamente bajo, 0.00619396. Dado que el valor calculado de F es mayor que el valor crítico para F (una cola), hay evidencia estadística para decir que las varianzas de las dos muestras no son iguales. El valor p ($P(F \leq f)$ una cola) obtenido es 0.42472492, que es mucho mayor que (0.05). Esto sugiere que las varianzas no son similares.

Según los resultados de la primera Prueba F para varianzas de las muestras de la dilución 10^7 , aunque el valor calculado de F es mayor que el valor crítico para F (una cola), el valor p indica que las varianzas no son similares. Esto sugiere que las diferencias observadas en las varianzas podrían deberse al azar y no son estadísticamente significativas. Por lo tanto, se podría considerar que las varianzas no son iguales.

Tabla 8

Prueba t para dos muestras desiguales 10^7

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
10^7		
	5%	1,5%
Media	2200375	2417008.333
Varianza	2.85243E+12	8.8029E+11
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-0.194210696	
P ($T \leq t$) una cola	0.429208975	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P ($T \leq t$) dos colas	0.858417949	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

En esta prueba t, estamos comparando las medias de dos grupos de datos, uno con un porcentaje de lactato del 5% y otro con un porcentaje del 1,5%, ambas muestras con 3 observaciones. Dado que la varianza agrupada es 0 (indicando que no se asume igualdad de varianzas), se realiza la prueba t asumiendo varianzas desiguales. El valor calculado del estadístico t es -0.194210696, mientras que el valor crítico de t (una cola) es 2.353363435.

A pesar de que no se asume igualdad de varianzas, los resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos con porcentajes de lactato del 5% y 1,5%. Esto sugiere que, en términos de crecimiento bacteriano, no se observan diferencias significativas entre estas dos condiciones, incluso considerando varianzas desiguales. Los resultados de la Prueba t suponiendo varianzas desiguales respaldan la conclusión de que las medias de los grupos son parecidas, lo que es coherente con los resultados anteriores en los que se asumió igualdad de varianzas.

5.9.3 Prueba estadística datos de concentración 10^9

Tabla 9

Prueba F para varianza de dos muestras 10^9

Prueba F para varianzas de dos muestras		
10^9		
	5%	1.50%
Media	326992.5	6875825
Varianza	2.0937E+11	7.75136E+13
Observaciones	2	2
Grados de libertad	1	1
F	0.00270111	
P (F<=f) una cola	0.03305677	
Valor crítico para F (una cola)	0.00619396	

En esta primera Prueba F, estamos comparando las varianzas de dos muestras de la dilución 10^9 con diferentes porcentajes de lactato: 5% y 1,5%. El valor calculado de F es 0.00270111, mientras que el valor crítico para F (una cola) es 0.00619396. Dado que el valor calculado de F es menor que el valor crítico para F (una cola), las varianzas de las dos muestras no son iguales. El valor p ($P(F \leq f)$ una cola) obtenido es 0.03305677, que es mayor que (0.05). Esto sugiere que las varianzas no son similares.

Tabla 10

Prueba t para dos muestras desiguales 10^9

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
10^9		
	<i>5%</i>	<i>1.50%</i>
Media	5984661.667	3683606.667
Varianza	9.61323E+13	1.81228E+13
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	0.372863374	
P(T<=t) una cola	0.367018014	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.734036028	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

En esta prueba t, estamos comparando las medias de dos grupos de datos, uno con un porcentaje de lactato del 5% y otro con un porcentaje del 1,5%, ambas muestras con 3 observaciones. Dado que la varianza agrupada es 0 (indicando que no se asume igualdad de varianzas), se realiza la prueba t asumiendo varianzas desiguales.

El valor calculado del estadístico t es 0.372863374, mientras que el valor crítico de t (una cola) es 2.353363435. El valor p ($P(T \leq t)$ dos colas) también es mayor que 0.05, por ende, las varianzas no son similares. A pesar de no asumir igualdad de varianzas, los resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos con diferentes porcentajes de lactato del 5% y 1,5%. Esto sugiere que, en términos de crecimiento bacteriano, no se observan diferencias significativas entre estas dos condiciones, incluso considerando varianzas desiguales.

5.9.4 Prueba estadística datos de concentración 10^{11}

Tabla 11

Prueba F para varianza de dos muestras 10^{11}

Prueba F para varianzas de dos muestras		
10^{11}		
	5%	1.50%
Media	1500520	975075
Varianza	1.8062E+11	7.81138E+11
Observaciones	2	2
Grados de libertad	1	1
F	0.23123271	
P ($F \leq f$) una cola	0.28534831	
Valor crítico para F (una cola)	0.00619396	

En esta primera Prueba F, estamos comparando las varianzas de dos muestras de la dilución 10^{11} con diferentes porcentajes de lactato: 5% y 1,5%. El valor calculado de F es 0.23123271, mientras que el valor crítico para F (una cola) es 0.00619396.

Dado que el valor calculado de F es menor que el valor crítico para F (una cola), las varianzas de las dos muestras no son iguales. El valor p ($P(F \leq f)$ una cola) obtenido es 0.28534831, que es mayor que (0.05).

Dado que no hay evidencia estadística para afirmar que las varianzas son diferentes, se puede continuar asumiendo desigualdad de varianzas. Según los resultados de la primera Prueba F para varianzas de las muestras de la dilución 10^{11} , aunque el valor calculado de F es mayor que el valor crítico para F (una cola), el valor p indica que las varianzas no son similares. Esto sugiere que las diferencias observadas en las varianzas podrían deberse al azar y no son estadísticamente significativas. Por lo tanto, se podría considerar que las varianzas no son iguales.

Tabla 12

Prueba t para dos muestras desiguales 10^{11}

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
10^{11}		
	5%	1.50%
Media	1000441.667	1183383.333
Varianza	8.40547E+11	5.20746E+11
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0.27157978	
P (T<=t) una cola	0.399692756	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P (T<=t) dos colas	0.799385513	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

En esta prueba t, estamos comparando las medias de dos grupos de datos, uno con un porcentaje de lactato del 5% y otro con un porcentaje del 1,5%, ambas muestras con 3 observaciones. Dado que la varianza agrupada es 0 (indicando que no se asume igualdad de varianzas), se realiza la prueba t asumiendo varianzas desiguales.

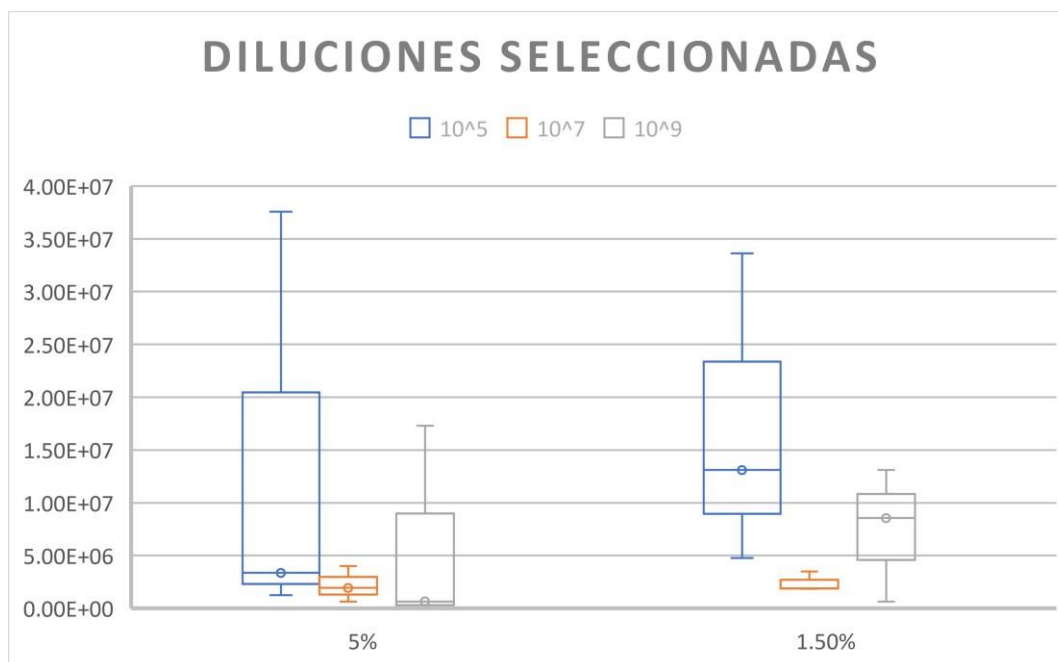
El valor calculado del estadístico t es -0.27157978 , mientras que el valor crítico de t (una cola) es 2.131846786 . El valor p ($P(T \leq t)$ una cola) obtenido es 0.399692756 , que es mayor que (0.05) . El valor p ($P(T \leq t)$ dos colas) también es mayor que 0.05 .

A pesar de no asumir igualdad de varianzas, los resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos con diferentes porcentajes de lactato del 5% y 1,5%. Esto sugiere que, en términos de crecimiento bacteriano, no se observan diferencias significativas entre estas dos condiciones, incluso considerando varianzas desiguales.

Después de realizar pruebas estadísticas para comparar las muestras con diferentes diluciones y porcentajes de lactato, se procedió a realizar un análisis visual de la variabilidad mediante la creación de un gráfico de caja de bigotes. Esta representación gráfica ayudará a visualizar la dispersión de los datos y a identificar posibles valores atípicos en las diluciones seleccionadas. A continuación, se presenta la caja de bigotes con las diluciones específicas para un análisis más detallado.

Figura 9

Diagrama de diluciones seleccionadas



Luego de analizar detenidamente todos los datos recopilados, se ha determinado que las diluciones 10^5 , 10^7 y 10^9 son aquellas en las que la bacteria se mantiene en condiciones adecuadas. Para una interpretación conjunta de estas tres diluciones, se han dividido en dos grupos según los diferentes porcentajes de lactato empleados. Para realizar este análisis, se ha utilizado un diagrama de cajas y bigotes, el cual nos permite visualizar la dispersión de los datos de manera efectiva.

En el caso de la dilución 10^7 , se observa que los datos están concentrados en una gama más estrecha, lo que se refleja en cajas más pequeñas. Esto indica que esta dilución presenta menos variabilidad en comparación con las otras. Por otro lado, las diluciones 10^5 y 10^9 muestran una distribución asimétrica con sesgo positivo, ya que la parte superior de las cajas es más grande que la parte inferior. Esto sugiere que, en general, los datos en estas diluciones son confiables y consistentes.

El uso del diagrama de cajas y bigotes ha permitido una mejor comprensión de la variabilidad de los datos en las diferentes diluciones y ha facilitado la identificación de tendencias y patrones en los resultados.

6. Conclusiones

- Para la obtención de la cepa de la bacteria *Bacillus subtilis* se realiza la evaluación de concentración y pureza de dos biofertilizantes sembrándose en agar nutritivo y cumpliendo con sus condiciones, en el momento de realizar la lectura de estos es evidente que la cepa de biofertilizante 2 presenta una concentración de $8,4 \times 10^9$ UFC/ml, manteniendo la referencia de su envase (1×10^9 UFC/ml), para corroborar la colonia se realiza una tinción de Gram en donde el *Bacillus subtilis* es un bacilo Gram positivo, es decir que al realizar la coloración de Gram se observa de color morado bajo el microscopio.
- La bacteria para empezar a trabajarla debe estar esporulada, esto se hace ya que la bacteria con espora es más resistente a las condiciones ambientales por que al ser mezclada con el concreto se enfrenta a diferentes situaciones como alteración de pH, para comprobar que la bacteria ya contaba con las esporas necesaria se realiza una tinción de verde de malaquita en donde su contraste entre el color verde y el morado es evidente, siendo el verde la espora y el morado el bacilo positivo.
- En la determinación de las condiciones nutricionales óptimas para el crecimiento de las esporas, se evaluaron diferentes concentraciones de extracto de levadura y lactato de calcio. Tras someter las muestras a análisis de espectrofotometría y pruebas de HCl al 10%, se observó que las concentraciones más efectivas fueron 1,5% y 5% de lactato de calcio debido a la evidente liberación de CO_2 al reaccionar con el ácido clorhídrico. Estas concentraciones se seleccionaron para futuros experimentos debido a su capacidad para promover la creación de carbonatos de manera eficiente.
- Los ensayos de los 7, 14 y 28 días, en donde las mezclas que Las mezclas que contienen 1×10^7 UFC/ml de *Bacillus subtilis* en de lactato y 1×10^5 UFC/ml de *Bacillus subtilis* en 5% de lactato presenta los mayores valores de resistencia, y realizando una comparación con el crecimiento de la bacteria en los mismos días se logra identificar que los datos concuerdan ya que en donde se evidencio mayor crecimiento fue en las diluciones $10^5, 10^7$ y 10^9

- Para evaluar el comportamiento de la bacteria a los 7, 14 y 28 días en el laboratorio se lleva a cabo la siembra de cada mezcla y el registro de las unidades formadoras de colonias, en donde todos los datos fueron registrados y analizados por el método ANOVA en donde finalmente se registraron los resultados para mayor comprensión en un diagrama de cajas y bigotes.

7. Referencias

- Achal, V., Mukherjee, A., & Reddy, M. S. (2011). Microbial concrete: Way to enhance the durability of building structures. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 23(6), 730-734. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)mt.1943-5533.0000159](https://doi.org/10.1061/(asce)mt.1943-5533.0000159)
- Akhtar, N., Ahmad, T., Husain, D., Majdi, A., Alam, M. T., Husain, N., & Wayal, A. K. S. (2022). Ecological footprint and economic assessment of conventional and geopolymer concrete for sustainable construction. *Journal of Cleaner Production*, 380, 134910. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134910>
- Alberto, H. C. C. (2021). Aplicación del bioconcreto para reparar agrietamientos de los decantadores de la planta de tratamiento de agua La Atarjea - Lima. [Trabajo de grado, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas]. Repositorio. <https://repositorioacademico.upc.edu.pe/handle/10757/655332>
- Amjad, H., Khushnood, R. A., & Memon, S. A. (2023). Biomimetic robust self-healing of bacillus subtilis immobilized through sisal fiber for next-generation concrete infrastructure. *Construction and Building Materials*, 368, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2023.130299>
- Ascate Mego, C. P., & Miranda Torres, M. A. (2019). Diseño de bioconcreto con *Bacillus subtilis* para mejorar la resistencia en un concreto $F'C=210 \text{ kg/cm}^2$, Tarapoto - 2019. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UCVV_1140d4d53e5e63adbf9feeb7039be68a
- Astorga Quiros, K. A., Meneses Montero, K. M., Zuñiga Vega, C. Z., Brenez Madriz, J. B., & Rivera Mendez, W. R. (2014). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en Marcha*, Vol. 27(2), 82-91. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4835434.pdf>
- Cezario, N. S. (2018). Crack filling in concrete by addition of *Bacillus subtilis* spores –Preliminary study. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6476369>
- Corrales Ramirez, L. C., Caicedo Lozano, L., Gómez, M. A., Ramos Rojas, S. J., & Rodriguez Torres, J. (2019.). *Bacillus* Spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos

- enzimáticos [Trabajo de grado, Universidad Nacional Abierta y a Distancia].
<https://repository.unad.edu.co/handle/10596/29823>
- Corrales Ramirez, L. C., Caicedo Lozano, L., Gómez, M. A., Ramos Rojas, S. J., & Rodriguez Torres, J. (2017.). *Bacillus Spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos* Revista Nova. 15(27). 45-65. <https://doi.org/10.22490/24629448.1958>
- Cuadros, J. A., Sosa, G. J., Avalos, F., & Musquiz, E. M. (2019). Obtención de CaCO_3 con *Bacillus Subtilis* para la fabricación de concreto autoreparable. *Avacient*, II(2), 29-38
<http://chetumal.tecnm.mx/images/2019/12DICIEMBRE/AVACIENT/2/4.pdf>
- Domínguez, H. G. (2020). Estadística para no estadísticos: una guía básica sobre la metodología cuantitativa de trabajos académicos. Dialnet.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=779767>
- Feng, J., Chen, B., Sun, W., & Wang, Y. (2021). Microbial induced calcium carbonate precipitation study using *Bacillus subtilis* with application to self-healing concrete preparation and characterization. *Construction and Building Materials*, 280,
<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.122460>
- Jiang, L., Jia, G., Jiang, C., & Li, Z. (2020). Sugar-coated expanded perlite as a bacterial carrier for crack-healing concrete applications. *Construction and Building Materials*, 232,
<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.117222>
- Jonkers, H., Thijssen, A. P., Muyzer, G., Çopuroğlu, O., & Schlangen, E. (2010). Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological Engineering*, 36(2), 230-235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.036>
- Kirupakaran, S., Preethi, Prabhavathy, A., Preyadarshi, S., & Chandana, S. (2023). A study on the mechanical and durability properties of bacterial culture with ground granulated blast furnace SLAG (GGBS) as partial replacement for cement. *Case Studies in Construction Materials*, 19, e02325. <https://doi.org/10.1016/j.cscm.2023.e02325>
- Macaya, A. C. (2018). Estudio sobre el rendimiento de bacterias como agente de auto reparación en el hormigón bajo diferentes condiciones de temperatura y tipo de cemento. [Trabajo de grado, Universidad técnica Federico Santa Maria].
<https://repositorio.usm.cl/handle/11673/43497>
- Mendoza Nina, R. H. (s. f.). Análisis de la permeabilidad del agua en el concreto mediante la aplicación de bacterias (bioconcreto), Cusco - 2018 [Trabajo de grado, Universidad

- Nacional de San Antonio Abad del Cusco].
<https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/6765>
- Mondal, S., & Ghosh, A. (2021). Spore-forming *Bacillus subtilis* vis-à-vis non-spore-forming *Deinococcus radiodurans*, A novel bacterium for self-healing of concrete structures: a Comparative study. *Science direct*, 266.
<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121122>
- Montoya, C. (2005). Caracterización de cristales de calcita bioprecipitada por un aislamiento nativo de *Bacillus subtilis*. *Revista de Colombia Biotecnología*, 19-25.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2351555>
- Muñoz, S. P., Sánchez, J. C., & Peralta, M. (2023). Influencia de las bacterias en la autocuración del concreto. *Revista UIS Ingenierías*, 22 (1). <https://doi.org/10.18273/revuin.v22n1-2023007>
- Núñez Valenzuela, L. E. (2020). Evaluación de las propiedades del bioconcreto autorreparable con la bacteria *Bacillus subtilis*, Lima - 2021 [Trabajo de grado, Universidad Cesar Vallejo].
<https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/80823>
- Osman, K. M., Taher, F. M., Eltawab, A. A., & Faried, A. S. (2021). Role of different microorganisms on the mechanical characteristics, self-healing efficiency, and corrosion protection of concrete under different curing conditions. *Journal of Building Engineering*, 41, 102414. <https://doi.org/10.1016/j.jobbe.2021.102414>
- Prošek, Z., Ryparová, P., & Tesárek, P. (2020). Application of bacteria as Self-Healing agent for the concrete and microscopic analysis of the microbial calcium precipitation process. *Key Engineering Materials*, 846, 237-242.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.846.237>
- Rajani, V. A., Sunil, S. K., Jitendra, S., & Dhananjay, M. (2019). Compressive strength of bacterial concrete by varying concentrations of *E.Coli* and *JC3* bacteria for Self-Healing Concrete. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering (IJITEE)*, 9 (1).
<https://www.ijitee.org/portfolio-item/A4749119119/>
- Reddy, S. P., Rao, M. S., Aparna, P., & Ch, S. (2010). Performance of ordinary grade bacterial (*Bacillus subtilis*) concrete. *ResearchGate*.
https://www.researchgate.net/publication/294684765_Performance_of_ordinary_grade_bacterial_Bacillus_subtilis_concrete

- Rivera, I. C. (2015). Autocuración del concreto a partir de la encapsulación DEL *Bacillus subtilis* en un biopolímero de almidón. [Trabajo de grado, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales UDCA]. Repositorio. <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/5140?show=full>
- Rong, H., Wei, G., Ma, G., Zhang, Y., Zheng, X., Zhang, L., & Xu, R. (2020). Influence of bacterial concentration on crack self-healing of cement-based materials. *Construction and Building Materials*, 244, 118372. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.118372>
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Shanmugam, R., Gowsalya, M., Gowshalya, P., Ramathi, J., & Bhavithra, R. (2022). Optimization of fault in structure by using *bacillus subtilis*. *Materials Today: Proceedings*, 68, 1408-1414. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.06.463>
- Tan, L., Xu, J., Wei, Y., & Yao, W. (2022). The effect of bacteria *bacillus cohnii* on the synthesised calcium silicate hydrate (C–S–H) with various calcium to silica ratio in nanoscale. *Cement and Concrete Composites*, 134, 104779. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2022.104779>
- United Nations. (2023). Objetivos de desarrollo sostenible. United Nations Development Programme. <https://www.undp.org/es/sustainable-development-goals>
- Vargas, J. D. (2018). Diseño y optimización de un medio de cultivo para producción de esporas de *Bacillus* SP. [Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/35019>
- Wu, Y., Kawabata, H., Kita, K., Ishikawa, S., Tanaka, K., & Yoshida, K. (2022). Constitutive glucose dehydrogenase elevates intracellular NADPH levels and luciferase luminescence in *bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01993-0>

8. Anexos

Anexo 1 Cronograma para pruebas de falla a los 7, 14 y 28 días

CRONOGRAMA					
ACTIVIDAD	fecha de mezclado	fecha desencofrado	fecha falla 7 días	fecha falla 14 días	fecha falla 28 días
Mezcla 10 ⁷ -1.5%-lactato	lunes, 5 de junio de 2023	miércoles, 7 de junio de 2023	miércoles, 14 de junio de 2023	miércoles, 21 de junio de 2023	miércoles, 5 de julio de 2023
Mezcla 10 ⁷ -5%-lactato	viernes, 9 de junio de 2023	martes, 13 de junio de 2023	martes, 20 de junio de 2023	martes, 27 de junio de 2023	martes, 11 de julio de 2023
Mezcla 10 ⁹ -1.5%-lactato	martes, 13 de junio de 2023	viernes, 16 de junio de 2023	viernes, 23 de junio de 2023	viernes, 30 de junio de 2023	viernes, 14 de julio de 2023
Mezcla 10 ⁹ -5%-lactato	viernes, 16 de junio de 2023	martes, 20 de junio de 2023	martes, 27 de junio de 2023	martes, 4 de julio de 2023	martes, 18 de julio de 2023
Mezcla 10 ⁵ -1.5%-lactato	viernes, 23 de junio de 2023	lunes, 26 de junio de 2023	lunes, 3 de julio de 2023	lunes, 10 de julio de 2023	lunes, 24 de julio de 2023
Mezcla 10 ⁵ -5%-lactato	lunes, 26 de junio de 2023	miércoles, 28 de junio de 2023	miércoles, 5 de julio de 2023	miércoles, 12 de julio de 2023	miércoles, 26 de julio de 2023
Mezcla 10 ¹¹ -1.5%-lactato	miércoles, 28 de junio de 2023	viernes, 30 de junio de 2023	viernes, 7 de julio de 2023	viernes, 14 de julio de 2023	viernes, 28 de julio de 2023
Mezcla 10 ¹¹ -5%-lactato	viernes, 30 de junio de 2023	lunes, 3 de julio de 2023	lunes, 10 de julio de 2023	lunes, 17 de julio de 2023	lunes, 31 de julio de 2023