UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Mecanismos de degradación de concreto mediados por la simbiosis entre *Leucaena leucocephala* y *Aspergillus niger* establecidos en estructuras urbanas

Dallany Milena Urrego García

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias - Biotecnología

Antioquia

Medellín, Colombia

2021

Mecanismos de degradación de concreto mediados por la simbiosis entre *Leucaena leucocephala* y *Aspergillus niger* establecidos en estructuras urbanas

Dallany Milena Urrego García

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Biotecnología

Directora:

Ph.D., MSc. Ing, Erica Mejía Restrepo

Codirector:

Ph.D., MSc. Ing. Jorge Iván Tobón

Línea de Investigación:

Concreto Ecológico

Grupo del Cemento y Materiales de Construcción

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia
2021

AGRADECIMIENTOS

Un buen momento para dar GRACIAS.

Gracias a mi directora de tesis Erica Mejía Restrepo, por mostrarme y guiarme en este camino, no solo académicamente, con toda su sabiduría, también espiritual y emocionalmente.
Gracias a mi co-director, al profe Jorge Iván Tobón por su inmenso conocimiento y motivación en todo momento.
A las dos gracias por su orientación, paciencia y estimulante aprendizaje durante todo el tiempo de investigación y escritura de la tesis.

Agradezco a Dios y a la vida por haberme otorgado un hogar maravilloso, donde el amor recibido, la paciencia y el apoyo incondicional, fueron las bases para que pudiera alcanzar este título.
Gracias a mi esposo Mauricio Restrepo Guzmán, por su aliento, ayuda en todo momento y paciencia, a mi hija Gabriela por apoyarme y su paciencia al esperarme en tantos momentos y mi hermosa cachorra Emma por acompañarme siempre mientras escribía la tesis. A mis padres y hermanos, gracias por todo su amor y estimulo.

RESUMEN

Una gran parte de las estructuras urbanas son elaboradas con concreto el cual, es considerado una roca artificial y sufre procesos de meteorización al estar en contacto con agua, gases atmosféricos, microorganismos, plantas, entre otros. Estas interacciones generan inestabilidad al concreto cambiando sus propiedades químicas, físicas, mecánicas y mineralógicas, las cuáles son inducidas por procesos de actividad metabólica de los organismos vivos. Tanto microorganismo, plantas y animales representan los desencadenantes procesos de biodeterioro de las estructuras urbanas y de concreto en general.

Aspergillus niger ha sido identificado en estructuras generando biodeterioro por mecanismos de acidólisis, al generar ácidos orgánicos como el cítrico, este hongo es considerado un buen agente mineralizador, con capacidades para transformar y solubilizar minerales en sustratos rocosos y de materiales para la construcción. Entre tanto *Leucaena leucocephala*, se ha encontrado establecida en estructuras, generando daños mecánicos en el concreto. Sin embargo, sus interacciones simbióticas en el proceso de biodeterioro, no han sido estudiadas. Por tanto, el objetivo de esta investigación es proponer el tipo de asociación simbiótica y mecanismos de biodeterioro *in vitro* entre *Aspergillus niger* y *Leucaena leucocephala* establecidas en el concreto, por medio de la producción de ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico y oxálico y el ácido glucónico a partir de exudados radicales y el hongo a escala de laboratorio.

Se evidenció que el hongo produce metabolitos ácidos que liberan Ca, Si y P a partir de cilindros de concreto, y que el ácido cítrico es el más fuerte ya que liberó Ca^{2+} y Si^{4+} a razones de 2500 g/L y 1500 g/L respectivamente en 90 días medidos por las técnicas de Absorción atómica y espectroscopia UV-VIS. También se encontró que las hifas del hongo *Aspergillus niger* generan ácido oxálico, a razones de 0,72 mg/L y cítrico 5,52 mg/L, los cuales provocan la disolución de los minerales, mientras que la planta suministra fuentes de carbono y energía por medio de la glucosa (ácido glucónico: 309,11 mg/L) generada en la fotosíntesis, en cultivo *In vitro* medidos por HPLC. Igualmente, se encontró que adiciones de concreto residual y *A. niger* mejora las propiedades nutricionales y mejora el pH del suelo en invernadero. Estos hallazgos mostraron que la meteorización del concreto, mediada por los ácidos orgánicos en simbiosis, modifica el pH del concreto, liberando Ca^{2+} y Si, elementos principales del concreto y fuentes nutritivas para el desarrollo vegetal.

Palabras claves: Biodeterioro, *Aspergillus niger,* ácidos orgánicos, *Leucaena leucocephala,* concreto residual.

Mechanisms of concrete degradation mediated by the symbiosis between *Leucaena leucocephala* and *Aspergillus niger* established in urban structures

ABSTRACT

A large part of urban structures is made with concrete, which is considered an artificial rock and undergoes weathering processes when in contact with water, atmospheric gases, microorganisms, plants, among others. These interactions generate instability in concrete by changing its chemical, physical, mechanical and mineralogical properties, which are induced by processes of metabolic activity of living organisms. Both microorganisms, plants and animals represent the triggers of biodeterioration processes of urban and concrete structures in general. *Aspergillus niger* has been identified in structures generating biodeterioration by acidolysis mechanisms, by generating organic acids such as citric, this fungus is considered a good mineralizing agent, with capacities to transform and solubilize minerals in rocky substrates and construction materials. Meanwhile, *Leucaena leucocephala* has been found to be established in structures, causing mechanical damage to concrete. However, their symbiotic interactions in the biodeterioration process have not been studied. Therefore, the objective of this research is to propose the type of symbiotic association and in vitro biodeterioration mechanisms between *Aspergillus niger* and *Leucaena leucocephala* established in concrete, through the production of organic acids, such as citric and oxalic acid and acid gluconic acid from radical exudates and laboratory-scale fungus.

It was shown that the fungus produces acid metabolites that release Ca, Si and P from concrete cylinders, and that citric acid is the strongest since it released Ca2 + and Si4 + at rates of 2500 g / L and 1500 g / L respectively in 90 days measured by atomic absorption and UV-VIS spectroscopy techniques. It was also found that the hyphae of the fungus *Aspergillus niger* generate oxalic acid, at rates of 0.72 mg / L and citric 5.52 mg / L, which cause the dissolution of minerals, while the plant provides sources of carbon and energy by means of glucose (gluconic acid: 309.11 mg / L) generated in photosynthesis, *In vitro* culture measured by HPLC. Likewise, it was found that additions of residual concrete and A. niger improve the nutritional properties and improve the pH of the soil in the greenhouse. These findings showed that the weathering of concrete, mediated by organic acids in symbiosis, modifies the pH of the concrete, releasing $Ca2^{+}$ and Si, the main elements of concrete and nutritional sources for plant development.

Keywords: Biodeterioration, *Aspergillus niger*, organic acids, *Leucaena leucocephala*, residual concrete.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1. 10
1. INTRODUCCIÓN 10
1.1 Descripción del problema 14
1.2 Alternativa de solución. 16
1.3 HIPÓTESIS 18
1.4 OBJETIVO GENERAL 18
1.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18
CAPITULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 19
2.1 Biodeterioro 19
2.2 Biodeterioro del Concreto 20
2.4 Organismos causantes de biodeterioro 24
2.4.1 Bacterias 24
2.4.2 Líquenes 25
2.4.3 Hongos 26
2.4.4 Plantas 28
2.5 Interacción Planta –Microorganismos 29
2.6 Mineralósfera 32
CAPÍTULO 3. BIODETERIORO *In vitro* GENERADOS EN ESTRUCTURAS URBANAS POR *Aspergillus niger* COMO PRODUCTOR DE ÁCIDOS ORGÁNICOS. 35
3.1 Resumen 35
3.2 Introducción 35
3.3 Materiales y Métodos 37
3.3.1 Morfología y microscopia del hongo 37
3.3.2 Análisis de DNA para el hongo y amplificación por PCR 37
3.3.3 Preparación de probetas 37
3.3.4 Soluciones agresivas: ácido cítrico 38
3.3.5. Solución con *Aspergillus niger* como productor de ácidos orgánicos 38
3.3.6 Soluciones control 39
3.3.7 Monitoreo de parámetros de degradación en el tiempo 39
3.3.8 Ca y Si en solución 39
3.3.9 Análisis químico de las probetas 40

3.3.10 Pruebas de resistencia a la compresión 40
3.4 Resultados y Discusión 40
3.4.2 Identificación por DNA de *Aspergillus niger* 41
3.4.3 Observación macroscópica de probetas 42
3.4.4 Mecanismos de degradación 44
3.4.5 Análisis de los elementos en las diferentes soluciones 45
3.5 Conclusiones. 49
CAPÍTULO 4. MECANISMOS DE ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA Y BIODETERIORO *In vitro* GENERADOS ENTRE *Aspergillus niger* Y *Leucaena leucocephala* ESTABLECIDAS EN EL CONCRETO. 51
4.1 Resumen 51
4.2 Introducción 52
4.3 Materiales Y Métodos 54
4.3.1 Caracterización mineralógica del material por Difracción de rayos X 54
4.3.2 Extracción de metabolitos en cultivo líquido de *Aspergillus niger* 54
4.3.3 Indicador biológico: *Leucaena leucocephala* 54
4.3.4 Medios de cultivo 55
4.3.5 Tratamientos para la Simbiosis 55
4.3.6 Montaje y Monitoreo de parámetros en el tiempo 55
4.3.7 Determinación de ácidos orgánicos: ácido cítrico, ácido oxálico y ácido glucónico por cromatografía líquida (HPLC). 56
4.4 Resultados y Discusión 56
4.4.1 Difracción de rayos X – DRX 56
4.4.2 Crecimiento de plántulas 57
4.4.3 Observación macroscópica de plántulas 60
4.4.3 Cromatograma ácidos orgánicos: glucónico, oxálico y cítrico. 65
4.4.4 Mecanismo ácido oxálico, cítrico y glucónico. 66
4.5 Conclusiones 69
CAPÍTULO 5. MECANISMOS DE ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA EN INVERNADERO GENERADOS ENTRE *Aspergillus niger* Y *Leucaena leucocephala* CON FUENTE DE NUTRIENTES DE CONCRETO RESIDUAL. 70
5.1 Resumen 70
5.2 Introducción 71
5.3 Materiales Y Métodos. 72
5.3.1 Suelo y concreto residual 72
5.3.2 Agente mineralizador: *Aspergillus niger* 72

5.3.3. Análisis de suelo 73
5.3.4 Medición de pH 73
5.3.5 Máxima capacidad de Retención de Agua (MCRH). 73
5.3.6 Especie vegetal: Leucaena leucocephala 74
5.3.7 Montaje y monitoreo de parámetros en el tiempo.....74
5.4 Resultados y discusión 75
5.4.1 Observación de plantas en invernadero 75
5.4.2 Composición nutricional de los tratamientos. 77
5.5 Conclusiones.....80
6. ESQUEMA: MECANISMOS SIMBIÓTICOS.....82
7. CONCLUSIONES GENERALES.....85
8. RECOMENDACIONES FUTURAS 88
9. BIBLIOGRAFÍA.....89

CAPÍTULO 1.

1. INTRODUCCIÓN

El concreto es el material estructural y de ingeniería más antiguo (Kakakhel et al., 2019). Es un material heterogéneo que suele estar compuesto por cemento Portland, áridos (gruesos y finos), agua y aditivos (opcional); dependiendo de las proporciones de sus fases de cemento y agregados, puede éste adaptarse a cualquier aplicación con diferentes propiedades de resistencia, densidad, resistencia química y térmica (Cwalina, 2008; Kakakhel et al., 2019). Sin embargo, el concreto es vulnerable a una gran cantidad de condiciones ambientales que pueden afectar su durabilidad; y, al ser una roca artificial es susceptible a sufrir daños microestructurales y alteraciones mineralógicas a través de acidulación química y actividad biológica. Debido a que estos materiales, contienen comúnmente elementos químicos como el Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Si, Al, K y Na, incluidos en diversos compuestos oxidados, tales como el dióxido de silicio (SiO_2), óxido de aluminio (Al_2O_3), óxidos de hierro (Fe_2O_3), óxido de manganeso (MnO), óxidos de magnesio (MgO), óxidos de calcio (CaO), óxidos de sodio (NaO_2) y óxidos de potasio (K_2O) (Limbachiya et al., 2007). Las fases minerales, donde están estos compuestos, al entrar en contacto con ácidos biogénicos o químicos y disolverse, pueden ocasionar daños severos estructurales, al aumentar la porosidad, reducir la resistencia mecánica y promover la propagación de grietas (Limbachiya et al., 2007).

Los tipos de daños que puede sufrir el concreto pueden ser de origen químico, físico o biológico. Los daños químicos son frecuentes en el concreto y son ocasionados por la meteorización química. Por ejemplo, el concreto curado en presencia de humedad y iones de azufre puede ser susceptible al ataque por sulfatos, al reaccionar con la cal liberada durante la hidratación del cemento Portland y con los aluminatos de calcio presentes en el cemento. Esta reacción da como resultado compuestos de sulfato, que incluyen el yeso y etringita, que es un sulfoaluminato de calcio hidratado, los cuales ocupan mayor volumen en el concreto, provocando expansión y fallas en el concreto (Rendon et al. 2017). Los daños físicos, causados por el cambio de temperatura en el concreto; hace que la roca se agriete, debido a los ciclos de congelamiento-descongelamiento, que ocurren cuando el agua se filtra

continuamente en las grietas, se congela y se expande, eventualmente rompiendo el concreto (Rendon et al. 2017).

Los daños biológicos, causados por la presencia de organismos de origen vegetal, animal y microorganismos sobre las estructuras de concreto, las cuales no solo pueden afectar el confort ambiental y la estética de las construcciones, sino que también pueden cambiar y alterar la composición química y física del material. En otras palabras, el daño por biota de flora o microbiota se conoce como biodeterioro (Kakakhel et al., 2019).

Entre los organismos biológicos responsables del biodeterioro, están los microorganismos, tales como bacterias, líquenes, hongos y organismos superiores como las plantas, su presencia en los materiales de construcción puede interferir en las estructuras y ser perjudiciales provocando procesos de pérdida de masa, decoloración, fisuras y establecimiento de plantas (Cwalina, 2008).

En el mundo, se han identificado diferentes organismos, microorganismos y sus procesos metabólicos, siendo estos últimos los que definen la forma en que interactúan con su entorno y en particular con los sustratos, por ejemplo, los materiales de construcción (Bertron et al. 2014).

En la formación de suelos, los mecanismos de la actividad microbiana se basan en la producción de ácido, que acelera el desgaste de las rocas y la disolución de los minerales. Como estos microorganismos dependen de los aportes de sustancias orgánicas que generan las plantas, la interfase raíz-microbio-mineral es de gran interés en este tema (Bashan et al., 2006)

Las raíces de las plantas, las bacterias y los hongos, afectan la estabilidad de las partículas minerales, lo que lleva a la liberación de los nutrientes inorgánicos. También, el carbono del suelo deriva predominantemente de las plantas, directa o indirectamente, y aunque la meteorización puede deberse a influencias físicas y químicas, la mayoría de los procesos de meteorización involucran plantas, principalmente raíces, o actividades microbianas que dependen del carbono derivado de las raíces (Lambers et al. 2009; Lopez et al. 2020).

La meteorización comienza con la fragmentación por fuerzas físicas, luego puede darse estrés térmico y las sales producen la propagación de grietas que permiten la colonización por comunidades de microorganismos asociados. El crecimiento y desarrollo de colonizadores primarios produce depósitos de C y N disponibles para el establecimiento adicional de plantas. Además, las plantas capaces de vivir en grietas

establecen interacciones con comunidades microbianas y juntas optimizan los recursos rocosos (orgánicos o inorgánicos), mejoran el ciclo de los nutrientes y aceleran el desarrollo del suelo (Lambers et al., 2009).

Mejía (2017), observó varios tipos de plantas creciendo en estructuras de concreto, muchas de ellas pertenecientes a la familia de las *Asteraceae*, como *Galingosa ciliata*, la familia de las leguminosas, *Leucaena leucocephala*. La presencia de estas plantas provocó la pérdida de masa del concreto, el oscurecimiento y el ablandamiento estructural. En tanto los microorganismos juegan un papel esencial en el mantenimiento y suministro continuo de nutrientes inorgánicos para las plantas. Entre los microorganismos asociados, se encuentran los hongos, las especies más comunes identificadas en estructuras de concreto pertenecen al género *Aspergillus, Cladosporium, Trichoderma, Penicillium, Chaetomium, Aureobasidium, Eurotium, Phoma, Scopulariopsis y Rhizopus.* (Corrêa et al., 2019)*,* especialmente, el género *Aspergillus* es muy activo en la producción de ácidos orgánicos, y su especie *Aspergillus niger*, por ejemplo, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido málico, los cuales son responsables de la biometeorización del concreto (Cwalina, 2008).

Aspergillus niger ha demostrado en estudios, la capacidad de transformar y solubilizar sustratos que contienen metales y minerales, incluidos madera, plástico y componentes de la construcción a base de rocas (Zhao et al., 2020). *A.niger* puede solubilizar los minerales a través de mecanismos de disolución por mediación de protones (acidólisis y complexólisis) y también con reacciones redox (Geoffrey M. Gadd, 2007; Zhao et al., 2020).

Muchos ejemplos de solubilización de minerales, se correlaciona con una disminución de pH, que puede resultar de la excreción de ácidos orgánicos y respiración (Zhao et al., 2020).

Entre los ácidos orgánicos generados por *Aspergillus niger*, se encuentra el ácido oxálico, entre otras funciones, participa en la meteorización biológica y el ciclo de no metales como el P y S y otros elementos de disolución y formación de minerales, pues es producido por una amplia variedad de hongos simbióticos, saprófitos y patógenos. Este ácido es relativamente fuerte y tiene la capacidad de formar metales complejos como metal-oxalato; estos oxalatos producidos pueden movilizar metales de sustratos sólidos, por ejemplo, de las rocas y minerales por acidólisis (disolución mediada por protones), formar complejos o inmovilizar metales por la formación de minerales de oxalato insolubles. Es el ácido más abundante después del dióxido de carbono. El

oxalato producido puede causar daño físico por la formación expansiva de los biominerales de oxalatos secundarios, además de la penetración de las hifas en el sustrato rocoso (Gadd et al., 2014).

Entre tanto, el ácido cítrico, un ácido más débil, generado a pH más bajo y que produce la liberación del calcio de la estructura (Mejía et al., 2019), este es generado cuando el ácido oxálico ha bajado el pH de la estructura, teniendo propiedades amortiguadoras y responsable también de la biometeorización .

Existen asociaciones mutualistas entre raíces y algunos hongos del suelo, llamadas micorrizas o "asociación micorrízica" (Landeweert et al. 2001). Este tipo de hongos crece tanto dentro como fuera de la raíz. En esta asociación, la planta, a partir de la fotosíntesis y a través de las raíces, proporciona a estos hongos moléculas de alta energía (azúcares), mientras que los hongos, al tener hifas extra-radiculares con crecimiento prolongado, exploran más volumen de suelo y así absorben más agua y nutrientes que luego se comparten con la raíz (Landeweert et al., 2001). Para comprender los procesos ecológicos del suelo, es esencial conocer la influencia potencial de las raíces de las plantas y su microbiota asociada en los procesos de meteorización. Las sustancias húmicas son menos eficaces para promover la disolución de los minerales que los ácidos orgánicos de bajo peso molecular producidos por los microorganismos del suelo, pues los ácidos orgánicos de bajo peso molecular poseen mayores capacidades complejantes y acidificantes, proporcionando H^+ para la protonación de la superficie mineral y los cationes quelatos, tal como el ácido oxálico y cítrico (Bakker et al. 2013).

Bashan, 2006 y Lopez, 2020, han demostrado en sus estudios, la colonización de microorganismos y su presencia continua en las plantas del desierto, los cuales son parte de procesos biogenéticos y aceleran la disolución de las rocas en zonas áridas y es por esto que algunas plantas pueden crecer en la roca sin presencia de suelo. Esta disolución modifica localmente las propiedades fisicoquímicas del suelo e influye en la nutrición y la actividad fisiológica de los microorganismos y las plantas, este proceso para calificar el entorno mineral del suelo, fue descrito en 2015 por Uroz y colaboradores, acuñando el término de “mineralósfera” dónde se seleccionan los microrganismos por su capacidad de utilizar preferiblemente los nutrientes inorgánicos liberados por los minerales del suelo. Siendo los principales elementos, Aluminio, Calcio y Sílice los que tuvieron mayor impacto en las estructuras de las

comunidades de microorganismos, los cuales están contenidos en rocas y minerales como el granito, caliza, cuarzo y feldespatos, entre otros.

Haciendo la analogía entre lo que pasa en las rocas del desierto con lo que puede pasar en el concreto (roca artificial), es que el objetivo de esta investigación plantea comprender los mecanismos de meteorización mineral del concreto y su posterior formación de “suelo” para el establecimiento simbiótico entre *Aspergillus niger* y *Leucaena leucocephala*, por medio de la generación de ácidos orgánicos como el cítrico, oxálico y glucónico en medios suplementados con concreto residual.

1.1 Descripción del problema

La degradación de edificios, estructuras y monumentos, han sido estudiados en todo el mundo. Esta degradación afecta no solo, la estética de las construcciones, sino que también produce la pérdida de propiedades mecánicas, estabilidad estructural y correcto funcionamiento (Cwalina, 2008; Kakakhel et al., 2019).

Algunos de los principales agentes causantes de la degradación de estructuras son los microrganismos como las bacterias, los líquenes, los hongos y las plantas que pueden colonizar sus superficies, especialmente, a través de sus poros y grietas, generando una meteorización mineral cuando los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos establecidos en las estructuras urbanas entran en contacto con los productos de hidratación del cemento y reaccionan con la portlandita, el silicato de calcio hidratado (C-S-H) y el aluminosilicato de calcio hidratado, dando como resultado procesos de disolución de Si, Ca, sales de Ca y quelatos, que son altamente solubles en agua. Durante este proceso de disolución se aumenta la porosidad del material, disminuyendo la resistencia mecánica y química del concreto y promoviendo la corrosión del acero de refuerzo. Estas interacciones generan inestabilidad al concreto cambiando sus propiedades químicas, físicas, mecánicas y mineralógicas.

Por otra parte, la industria de la construcción, en los procesos de demoler-construir, afecta el suelo, no solo en los procesos de extracción de materia prima sino también en los procesos de disposición de los residuos generados. Estos daños antropogénicos no permiten el uso del suelo en paisajismo o agricultura generando impactos ecológicos sobre la tierra.

Desde el punto de vista geomicrobiano, los grupos de microorganismos importantes que participan directamente en las transformaciones geoquímicas, incluyen bacterias oxidantes y reductoras de hierro, bacterias oxidantes y reductoras de manganeso, bacterias reductoras de sulfato, bacterias oxidantes y reductoras de azufre y muchas otras procariotas y eucariotas que pueden formar o degradar silicatos, carbonatos, fosfatos y otros minerales (Gadd et al. 2013).

Todo tipo de microorganismos, incluidos los procariotas y eucariotas y sus asociaciones simbióticas entre sí y con “organismos superiores”, pueden contribuir a los fenómenos geológicos (Gadd et al. 2013). La meteorización biológica en estructuras de concreto es un conjunto de procesos que comprenden gran variedad de mecanismos, comenzando con la fragmentación por fuerzas físicas, estrés térmico por congelamiento – descongelamiento que genera grietas, y ataque químico, por la producción de ácidos y producción de minerales secundarios, debido al metabolismos de biota colonizadora (microorganismos, plantas y animales). Esta bioclimatización de las estructuras en simbiosis, produce fuerzas mecánicas y compuestos metabólicos, como ácidos orgánicos y quelantes que alteran los minerales formadores de rocas y finalmente generando biodeterioro (Lopez & Bacilio, 2020). El hongo *Aspergillus niger*, tiene la capacidad de producir ácidos orgánicos, especialmente cítrico y oxálico; los cuales son influenciados por los nutrientes presentes en la roca, estos ácidos son excretados al medio provocando la disolución de carbonatos presentes en el concreto y hacen disponibles elementos químicos como Mg, Fe y Mn que no solo utiliza para su metabolismo (Siegesmund et al. 2014), sino que los deja en solución para otros organismos, como las plantas. Sin embargo, los mecanismos de degradación del concreto mediados por microorganismos, como los hongos, productores de ácidos orgánicos en simbiosis con las plantas, no son bien conocidos y han sido poco investigados en la literatura hasta el momento. Las investigaciones se han limitado principalmente a la colonización por bacterias, hongos, líquenes y algas, sin tener en cuenta el deterioro inducido por el crecimiento de vegetación, especialmente árboles grandes, los cuales pueden provocar daños estructurales severos con sus raíces, estas, no solo producen humus para acidificar el sustrato, sino que también se asocian con microorganismos, especialmente, hongos para nutrirse y establecerse en la estructura de concreto, ejemplo de ello, es la interacción de plantas y microorganismos en rocas del desierto.

En síntesis, se sabe que siempre hay microorganismos y plantas coexistiendo en el suelo y sustratos rocosos, que los microorganismos, en especial los hongos generan ácidos orgánicos para descomponer las rocas y a través de las hifas ayudan al transporte del agua y nutrientes y que las plantas proveen el carbono. En rocas del desierto y en el concreto donde no hay “suelo”, se ha encontrado plantas y hongos creciendo, coexistiendo y deteriorando el concreto. Sin embargo, las simbiosis fúngicas para la transformación de minerales, solo se han informado en los líquenes y micorrizas en raíces de las plantas, como adaptaciones para la explotación de suelos y entornos rocosos(Geoffrey M. Gadd, 2007), y en estas asociaciones simbióticas, los hongos reciben el carbono de sus socios fotosintéticos, mientras que el hongo protege la simbiosis y proporciona mayor acceso a los nutrientes minerales (Geoffrey M. Gadd, 2007).

Entre tanto, hay otras interacciones entre hongos de vida libre y las raíces de las plantas que sean significativas en la meteorización mineral y la nutrición de las plantas (Xu and Sparks et al. 2014), y hacen que la meteorización biogénica y el biodeterioro en el concreto sean el resultado de interacciones.

Sin embargo, los factores biogénicos que conducen al biodeterioro del concreto no se distinguen claramente de la meteorización física o química, siendo ellos parte de este proceso; por tanto, los procesos de meteorización deben considerarse como el resultado de factores combinados que actúan juntos.

Por tanto, en esta investigación se pretende conocer los mecanismos de degradación mediados por la producción de ácidos orgánicos como el cítrico, oxálico y glucónico proveniente del metabolismo del hongo *Aspegillus niger* y en simbiosis con la planta *Leucaena leucocephala* en diferentes medios suplementados con concreto residual.

1.2 Alternativa de solución.

Comprender la interacción compleja, entre la colonización de hongos como el *Aspergillus niger* en estructuras de concreto y determinar su papel en la meteorización mineral, el ciclo de nutrientes y el funcionamiento de un ecosistema planta-mineral-microorganismo es el objeto principal de esta investigación.

Se espera que al generar una interacción entre un agente mineralizador como el *Aspergillus niger* y las raíces de las plantas en un medio de cultivo *In vitro*

suplementado con concreto residual, permitan la meteorización del concreto, liberación de nutrientes y su posterior establecimiento. Esta interacción estará mediada por la producción de ácidos orgánicos como el cítrico, oxálico y glucónico, los cuales al ser excretados en el medio permiten la liberación y disponibilidad de nutrientes como el $Ca^{2+,}$ Si^{4+}, P, Mg^{2+}, entre otros; esenciales para el crecimiento y desarrollo de la vegetación en estructuras urbanas y su consecuente biodeterioro.

1.3 HIPÓTESIS

Los metabolitos generados por la simbiosis entre plantas – microorganismos – mineral aceleran los procesos de biodeterioro de las estructuras urbanas.

1.4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los mecanismos de biodeterioro *in vitro* generados por *Aspergillus niger* en simbiosis con *Leucaena leucocephala* en estructuras urbanas y el efecto que tienen en los procesos de meteorización de estas.

1.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar los mecanismos de biodeterioro *in vitro* generados en estructuras urbanas por *Aspergillus niger* productor de ácidos orgánicos.

Definir los mecanismos de biodeterioro *in vitro* generados en estructuras urbanas por las plantas establecidas en éstas.

Proponer el tipo de asociación simbiótica y mecanismos de biodeterioro *in vitro* entre *Aspergillus niger* y *Leucaena leucocephala* establecidas en concreto.

CAPITULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodeterioro

El biodeterioro de materiales orgánicos e inorgánicos, es un complejo proceso de alteraciones inducidas por la actividad creciente y metabólica de los organismos. Se puede reconocer en monumentos, pinturas murales, roca, madera, papel, fibras vegetales y/o animales y obras de arte en pergamino (Cwalina, 2008; Palla & Barresi, 2017; Siegesmund & Snethlage, 2014)

Palla, 2017, en su investigación, definen el biodeterioro como “cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material causado por las actividades vitales de los organismos” y que tanto los organismos superiores (como animales, plantas y musgos) como los microorganismos (bacterias autótrofas o heterótrofas, hongos, cianobacterias, algas y líquenes) representan los desencadenantes del biodeterioro en el patrimonio cultural y en general en estructuras de concreto.

El proceso de degradación del concreto es un proceso complejo que conlleva la interacción de los microorganismos con su sustrato y el medio ambiente (Dakal et al. 2012). Las estructuras de roca son altamente susceptibles a daños por intemperie y las condiciones atmosféricas (luz, temperatura, humedad, contaminantes y lluvia ácida), debido a su naturaleza química y propiedades petrológicas (textura, porosidad, microestructura, etc) (Dakal et al. 2012). La alta porosidad permite la penetración de agua junto con iones corrosivos, ácidos y sales dentro de la roca y les causan graves daños. Además de esto, la superficie de la roca soporta el crecimiento de microorganismos que incluyen endolíticos (viven dentro de una roca o poro), alcalófilos (valores de pH entre 8.5 – 11), halófilos (toleran grandes cantidades de sales) y epilíticos (crecen sobre la roca) que causan deterioro de muchas formas (Dakal et al. 2012).

Estos microorganismos, a través de diferentes mecanismos de deterioro, causan daños en las superficies pétreas de obras, monumentos, estructuras urbanas, lo que resulta en una pérdida irreversible e irreparable de su resistencia física, apariencia estética, valor e información (Dakal et al. 2012).

Casi todos los materiales de construcción pueden deteriorarse debido a la oxidación / reducción microbiana de compuestos que contienen C, Fe, S y N, la hidrólisis de la

celulosa y hemicelulosa de la madera, la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos o álcalis y la generación de radicales de oxígeno (Ivanov et al. 2017)

2.2 Biodeterioro del Concreto

En la actualidad los templos, monumentos y en general, estructuras urbanas de rocas y concreto, están completamente expuestas a condiciones ambientales y una muestra visible es la colonización y deterioro por la flora y las comunidades microbianas en estas estructuras, siendo estas causas importantes de daños a través de procesos químicos y mecánicos. Mecanismos físicos, químicos y bioquímicos directos e indirectos están involucrados en el biodeterioro mineral por microorganismos (Geoffrey Michael Gadd, 2013). Este tipo de daño por biota de flora o microbiota, se conoce, como Biodeterioro y, se refiere a cualquier actividad biológica que afecte la apariencia y la integridad de los materiales, principalmente causados por organismos pequeños (microorganismos), como bacterias, arqueas, hongos y líquenes (Kakakhel et al., 2019).

Los microorganismos pueden inducir la corrosión mediante la estimulación de la reacción anódica, formación de ácidos, por estimulación catódica, producción microbiana de H_2S, por la biodegradación de las películas protectoras y por el aumento de la conductividad del medio líquido (Ivanov & Stabnikov, 2017).

El biodeterioro mecánico de rocas y minerales puede ocurrir a través de la penetración, perforación y excavación en material en descomposición, por ejemplo, en rocas calcíticas y dolomíticas. La penetración puede ocurrir con líquenes, plantas y animales que excavan y crecen a través de sustratos generando cambios geomórficos. Mientras que los microorganismos simbióticos y asociados a plantas participarían más en las transformaciones biofísicas y bioquímicas. La meteorización bioquímica de sustratos rocosos y minerales puede ocurrir mediante la excreción de, por ejemplo, H^+, ácidos orgánicos y otros metabolitos, resultando en cambios del mineral a través de picaduras y grabado de superficies hasta su completa disolución (Geoffrey Michael Gadd, 2013).

La presencia y la actividad de estas arqueas, bacterias, algas, líquenes, hongos, a veces animales y plantas superiores, provocan el biodeterioro, desencadenando agrietamiento, fisuras y daño en general en los materiales de construcción lo que resulta en el debilitamiento y eventual destrucción de la estructura o monumento, ya

que pueden colonizar la superficie del material, sus poros y microfisuras (Cwalina, 2008).

El principal daño biológico lo produce el biodeterioro estético debido a la producción de pigmentos orgánicos y la cobertura de la superficie por biopelículas coloreadas, continúa con el biodeterioro físico resultante de las fuerzas mecánicas producidas por el micelio y raíces dentro de los poros que provocan la ruptura del material, y biodeterioro químico debido a la acción directa de los productos metabólicos excretados (Gámez et al., 2020)

2.3 Mecanismo microbiano causante del biodeterioro

El metabolismo microbiano, se refiere al conjunto de reacciones químicas que tiene lugar en la célula, y tiene 3 funciones específicas a saber:

- Obtener energía química del entorno, almacenarla, para utilizar luego en diferentes funciones celulares,
- Convertir los nutrientes exógenos en unidades precursoras de los componentes macromoleculares de la célula bacteriana,
- Formar y degradar moléculas necesarias para funciones celulares específicas, como por ejemplo, movilidad y captación de nutrientes (Varela, n.d.)

Los efectos del metabolismo microbiano son principalmente de naturaleza química y posteriormente, pueden influir en los procesos físicos.

Todo tipo de microorganismo (bacteria, algas, líquenes, levaduras y hongos), puede estar implicado en el biodeterioro, dónde pueden actuar por separado o en conjunto en una serie de interacciones complejas.

Son extremadamente corrosivos por la producción de ácidos orgánicos biogénicos (ácido acético, láctico, butírico y cítrico y el dióxido de carbono (CO_2) (Rendon Diaz Miron & Koleva, 2017).

Ejemplo de estos procesos bioquímicos causantes de biodeterioro por microorganismos, como se relaciona en la Tabla 1, incluyen sustancias como ácidos, álcalis, gases, aceites y grasas, azúcares, entre otros agentes muy corrosivos que causan biodeterioro químico en el concreto, teniendo en cuenta que el concreto es un material heterogéneo. La evaporación del agua de la pasta de cemento conduce a formación de poros que permiten la entrada de agua y reactivos agresivos como Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2}- y CO_3^{2-}. También, algunos microorganismos se establecen sobre la superficie del concreto y excretan sustancias poliméricas extracelulares, liberación de

muchos ácidos, como el sulfuro, hidrógeno, el nítrico, producto de las bacterias nitrificantes y las bacterias oxidantes del azufre (Tabla 1) que también afectan la porosidad y permeabilidad, estas producciones continuas de metabolitos microbianos reaccionan fácilmente con el concreto, provocando su deterioro (Cwalina, 2008; Gámez-Espinosa et al., 2020; Harbulakova et al., 2013)

Tabla 1. Procesos bioquímicos esenciales para el biodeterioro de los materiales minerales influenciados por microorganismos que indican agresividad corrosiva (Modificado de Cwalina, 2008)

Procesos bioquímicos	Materiales minerales corroídos	Microorganismos que causan biodeterioro
Oxidación $NH_4 \longrightarrow NO_2^-$	Rocas naturales, ladrillos, concretos, morteros	Bacteria: *Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosospira, Nitrosolobus*
Oxidación $NO_{2-} \longrightarrow NO_3^-$	Rocas naturales, ladrillos, concretos, morteros	Bacteria: *Nitrobacter, Nitrococcus*
Reducción $NO3^- \longrightarrow NO_2^-$	Rocas naturales, ladrillos, concretos, morteros	Bacteria: *Escherichia, Pseudomonas*
Reducción $NO3^- \longrightarrow NH_4^+$	Concreto	Bacteria: *Clostridium*
Reducción $SO_4^{2-} \longrightarrow H_2S$	Rocas naturales, ladrillos, concretos, morteros	Bacteria: *Clostridium,* bacterias sulfato reductoras: *Desulfovibrio, Desulfotomaculum, Desulfomonas,*
Oxidación H_2	Ladrillos, concretos, morteros	Bacteria *Alcaligenes, Micrococcus, Desulfovibrio*

Oxidación S°,RSC" $\longrightarrow$ H_2SO_4	Rocas naturales, ladrillos, concretos, morteros	Bacterias oxidantes de sulfuros: *Acidithiobacillus, Thiobacillus, Sulfobacillus, Sulfolobus*
Oxidación $Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+}$	Rocas naturales, ladrillos, concretos, morteros	Bacteria: *Crenothrix, Gallionella, Leptothrix*, *Sphaerotilus, Sulfobacillus, Acidithiobacillus ferroxidans*
Oxidación $Mn^{2+} \longrightarrow Mn^{4+}$	Rocas naturales, ladrillos, concretos, morteros	Bacteria: *Bacillus, Gallionella, Pseudomonas, Sphaerotilus*
Procesos fermentativos $\longrightarrow$ ácidos orgánicos, CO_2	Rocas naturales, ladrillos, concretos, morteros, vidrio (hongos)	**Bacterias***: Achromobacter, Bacillus, Clostridium, Escherichia, Flavobacterium, Lacotbacillus, Proteus, Pseudomonas, Salmonella* **Hongos:** *Aspergillus, Ceratostomella, Cladosporium, Fusarium, Hormoconis, Hormodendrum, Penicillium, Spicardia, Trichosporon*
*RSC compuestos de sulfuro reducidos (Inorgánicos)		

2.4 Organismos causantes de biodeterioro

Prácticamente la totalidad de grupos de microorganismos, sean quimiosintéticos (microorganismos que elaboran su alimento a partir de la energía de las sustancias o superficies que contienen hierro, hidrógeno, azufre y nitrógeno), heterótrofos (bacterias y hongos que utilizan el carbono orgánico, como única fuente de energía y carbono) o fotoautótrofos (microorganismos que sintetizan compuestos a partir de sustancias inorgánicas utilizando el solo como fuente de energía), intervienen en el deterioro de la roca y materiales de construcción (calizas, areniscas, morteros, adobe, ladrillos). Abarcan desde las bacterias, aqueas, hongos, algas, líquenes, hasta plantas superiores. En muchos casos aparece una colonización inicial por organismos pioneros (bacterias, algas, líquenes) que abren camino a otros pudiéndose observar sucesiones de distintas comunidades. Debido a que los microorganismos son ominipresentes y versátiles metabólicamente hablando, es normal su presencia en materiales de construcción (Rendon Diaz Miron & Koleva, 2017).

2.4.1 Bacterias

Las bacterias implicadas en el deterioro de monumentos, estructuras y obras de arte, pertenecen principalmente a tres grupos nutricionales: fotoautótrofas, quimioautótrofas y quimioorganótrofas. Entre los fotótrofos y quimiolitoautótrofas se encuentran las cianobacterias y bacterias nitrificantes y oxidantes del azufre (Dakal & Cameotra, 2012), debido a sus necesidades nutricionales simples (como minerales inorgánicos, amoniaco atmosférico, etc) y ecológicas (como la presencia de luz, CO_2 y agua), estas bacterias se desarrollan fácilmente en estructuras y monumentos al aire libre, y están presentes en superficies de roca, liberando diferentes tipos de ácidos, tales como el nítrico, ácido sulfúrico y ácido nitroso, que cambia el pH local y causa el deterioro (Kakakhel et al., 2019) (Dakal & Cameotra, 2012). Entre tanto, la colonización de bacterias fotosintéticas en las superficies externas, está relacionada con la formación de biopelículas, secreción de ácidos orgánicos e inorgánicos corrosivos resultantes de un biodeterioro mecánico (debido a ciclos alternos de contracción e hinchamiento de la biopelícula), tinción antiestética indeseable de las estructuras (por ácidos secretados, pigmentos y bioproductos metabólicos), agrandamiento de poros (debido a la penetración de hifas), alteración del tamaño de los poros, distribución y permeabilidad del agua de los minerales (por deposición de surfactantes) y meteorización, como consecuencia de la absorción de calcio, precipitación de la sal de calcio y formación de nuevas fases minerales, entre otras(Dakal et al. 2012).

Los principales géneros de bacterias metabólicamente activos sobre el concreto, son del género *Acidithiobacillus* y *Thiobacillus*, especialmente el de la especie *A. Thiooxidan*s. Debido a la acción de biodeterioro ocasionada por estas bacterias se han demolido canales de alcantarillados producto de las pérdidas de masa de las estructuras (Cwalina, 2008), pues éstas bacterias quimioautotróficas bajan el pH, oxidando compuestos de azufre para producir ácido sulfúrico que reacciona con la cal libre produciendo una capa corrosiva sobre la superficie del concreto (George et al., 2013).

2.4.2 Líquenes

Los líquenes, son simbiontes entre algas verdes o vede azuladas y hongos, el componente fúngico cubre la mayor parte del cuerpo y los nutrientes puede ser sintetizados por las algas, algunos de los cuales son absorbidos por el hongo. Los líquenes pueden sobrevivir en una amplia gama de condiciones ambientales y pueden excavar hasta varios milímetros de profundidad de la superficie del concreto, al adherirse a la superficie del sustrato mediante las hifas o raíces con preferencia por la piedra caliza (Rendon Diaz Miron & Koleva, 2017).

Crecen como una biopelícula visible en la superficie de las rocas y debido a su estructura macroscópica, su presencia en las superficies es evidente, siendo los organismos pioneros que habitan superficies expuestas; teniendo una contribución significativa en el deterioro biogeofísico y biogeoquímico de la roca (Dakal & Cameotra, 2012). Su crecimiento puede verse favorecido por la presencia de excrementos de aves, ricos en nitrógeno orgánico, y, el CO_2 producido durante la respiración se transforma en ácido carbónico (un potente agente meteorológico) dentro del talo (estructura del liquen). Con la ayuda de sus partes especializadas como las hifas (líquenes crustozos) y rizoides (líquenes folioso y fructosa), los líquenes se adhieren y penetran en los poros, grietas y fisuras de las piedras, lo que provoca daños estructurales y físicos (Dakal & Cameotra, 2012). Sus actividades metabólicas, se asocian con la liberación de ácidos carboxílicos orgánicos altamente corrosivos (como el ácido oxálico) y compuestos quelantes mediante los cuales forman complejos con cationes minerales del sustrato. También se sabe que la fijación de nitrógeno por ellos, mejora el potencial de bioclimatización. (Dakal & Cameotra, 2012). Después de su muerte, los líquenes dejan una corrosión por picaduras con marcas de grabado, debido a su actividad metabólica y la incorporación de fragmentos minerales en el talo, y, la contracción-expansión de los líquenes como

consecuencia de la desecación y rehidratación da como resultado la descamación y desprendimiento dela capa mineral superficial (Dakal & Cameotra, 2012).

2.4.3 Hongos

Los hongos son microorganismos presentes en formas obicuas que representan el grupo de quimioheterótrofos caracterizados por presencia de hifas uni y multicelulares (Dakal & Cameotra, 2012). En un entorno construido, los hongos filamentosos están asociados con daños físicos y estéticos, además con problemas de salud humana, como reacciones alérgicas y tóxicas (Loukanov et al., 2020); son metabólicamente más versátiles que otros biodeteriógenos en el grupo de los microorganismos, pues su versatilidad les permite colonizar una amplia variedad de sustratos que incluyen madera, rocas y metales, lo cual mejora su potencial en el biodeterioro. Además, pueden establecer asociaciones mutualistas con cianobacterias y algas como líquenes, lo que le permite adoptar diversas estrategias estructurales, morfológicas y metabólicas mejorando su adaptabilidad (Dakal & Cameotra, 2012).

Al ser heterótrofos, los hongos pueden consumir el sustrato de carbonato inorgánico para sustentar su crecimiento, pero pueden crecer en el producto de desecho o células muertas de comunidades anteriores y depósitos de materia orgánica nitrogenada de excrementos de aves, hojas en descomposición y aerosoles presentes en la superficie de la roca, fisuras y subsuelo (Dakal & Cameotra, 2012) (Guerra et al., 2019). Su capacidad para crecer como oligótrofo y recolectar material nutritivo del agua atmosférica y de lluvia le permite el crecimiento en ambientes inhóspitos de rocas (Coutinho et al., 2015).

La excreción de ácidos orgánicos e inorgánicos en las superficies de roca pueden alterarla severamente; estos ácidos orgánicos generados metabólicamente (como el ácido cítrico y el ácido oxálico) tienen propiedades quelantes por las cuales debilitan el enlace metal-oxígeno, aumentando la solubilidad de algunos metales y forman complejos con los cationes minerales presentes en la matriz superficial (Dakal & Cameotra, 2012). Por literatura se sabe que la intrusión de hifas de hongos a lo largo de la estructura, desestabilizan la estructura de la roca y da como resultado su deterioro mecánico. Otro medio de daño mecánico resulta de la contracción y expansión alternas del talo, bajo condiciones fluctuantes de humedad. Algunos hongos endolíticos por medios bioquímicos causan picaduras en la superficie de la roca, lo que parece tener muchos agujeros pequeños (Dakal & Cameotra, 2012).

Los hongos pueden transformar y resistir la superficie mineral de la roca al precipitar carbonato de calcio en oxalato de calcio. La excreción de ácido oxálico, puede reaccionar con la calcita ($CaCO_3$), constituye importante en muchos morteros, dando como resultado la producción de oxalatos de calcio (CaC_2O_4), en diferentes estados de hidratación, que provoca la formación de eflorescencias y el consiguiente deterioro de las superficies. (Guerra et al., 2019)

También, el ácido oxálico para formar oxalato de calcio da como resultado la disolución de paredes internas de los poros de la matriz del mortero, produciendo soluciones enriquecidas en carbonatos libres. El oxalato puede considerarse uno de los metabolitos claves de gran importancia en la transformación de metales y minerales a partir de los hongos desarrollados (Guerra et al., 2019).

El origen de los túneles de hongos dentro de los minerales del suelo se ha explicado como resultado de la disolución y “excavación” dentro de la matriz mineral: la hipótesis de los “hongos come rocas” o “hongos formadores de rocas” que explica cómo pueden ocurrir túneles de hongos dentro de los minerales (Dakal & Cameotra, 2012). Es probable que los hongos excaven dentro de las grietas, fisuras, poros y puntos débiles preexistentes en minerales meteorizables y, durante la colonización y disolución mineral, formen una matriz de minerales secundarios con la misma composición química que la roca huésped, por ejemplo; precipitación secundaria de $CaCO_3$ en suelo y roca calcáreos y cómo resultado, las fisuras y grietas se cementan con los minerales micogénicos (Dakal & Cameotra, 2012).

Los géneros de hongos que se encuentran con mayor frecuencia en ambientes construidos interiores y exteriores son *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Stachybotrys*; especialmente, especies de hongos como *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger* y *Stachybotrys sp.* (Loukanov et al., 2020)(Dakal & Cameotra, 2012).

En *Aspergillus niger*, la biosíntesis de ácido oxálico ocurre exclusivamente por conversión de oxaloacetato (que surge de la acción de prituvato carboxilasa sobre piruvato producido por glucólisis) en oxalato y acetato por una oxalacetato acetilhidrolasa (OAH) citoplasma dependiente de Mn^{2+}, con producción óptima en el rango de pH de 5 a 8 (Gadd et al., 2014).

2.4.4 Plantas

Algunos de los microorganismos mencionados, muestran acciones pedogéneticas, haciendo que la superficie de la piedra sea polvorienta y así allanar el camino para la sucesión de musgos y plantas hepáticas. Los musgos encuentran en sustratos con alto contenido de humus y contienen depósitos de células de algas muertas. La muerte de los musgos provoca daños indirectos en monumentos, piedras y en general en las estructuras, al enriquecer y aumentar el contenido de humus, lo que favorece el crecimiento sucesivo de especies vegetales superiores (Dakal et al. 2012).

Las plantas superiores representan una grave amenaza, especialmente para la conservación de restos arqueológicos y edificios, ya que pueden implicar enfermedades físicas y químicas; este daño por plantas es bien conocido y está relacionado con formas biológicas particulares o con las características de los sistemas de las raíces (Palla et al. 2017). Los tipos de colonización que presentan las plantas son: ataque a la estructura de la pared, generalmente resultado de factores abióticos que crean condiciones adecuadas para el crecimiento microbiano (bacterias, hongos y líquenes), que aceleran el deterioro de la estructura y conduce a la formación de un sustrato para la germinación de la semilla; comprometiendo la integridad y estabilidad estructural de las estructuras y monumentos, debido a su aparato radical y biomasa. El segundo modo de colonización se produce principalmente en superficies horizontales con suministro de agua, las plantas pioneras son musgos que atrapan gases y polvos atmosféricos, permitiendo la formación de sustrato adecuado para la germinación de otras plantas. Además, las plantas superiores con un sistema de raíces pueden penetrar profundamente en la estructura y crecer, causando daños físicos y químicos, a través de la exudación de ácidos orgánicos (Palla et al. 2017).

Las raíces de las plantas, también pueden generar ácidos y variar el pH y la intensificación de la meteorización mineral de las superficies, pues sus raíces pueden alterar físicamente las partículas minerales exponiendo nuevas áreas de la superficie a la intemperie y, los metabolitos, como los ácidos orgánicos y protones, se activan provocando la meteorización mineral (Uroz et al., 2009).

Luego, se intensifica la meteorización mineral de las superficies de los materiales de construcción, por hongos y bacterias asociadas, como sucede en la rizósfera; ejemplo de ello, está en las plantas de los manglares, cactus, plantas del desierto y especies arbóreas de bosques templados, en las cuales, también se apoya la hipótesis de que las plantas pueden seleccionar las comunidades de microorganismos para mejorar su nutrición,

garantizando el establecimiento y supervivencia en entornos bajos en nutrientes (Uroz et al., 2009).

Estas asociaciones pueden: I) cambiar el pH del medio, II) reducir el tamaño de partícula de la roca para formar minerales del suelo, III) aumentar la lixiviación de metales IV) aumentar la disolución de rocas y varios tipos de minerales (que pueden ser útiles para el crecimiento de plantas) por segregación de ácidos orgánicos volátiles y no volátiles y, V) fijar nitrógeno (Mejía et al, 2017). Es por eso que, la simbiosis entre microorganismos y plantas, con la ayuda de la fotosíntesis, es la clave para los procesos de meteorización y nutrición de las plantas en estos ambientes extremos en ausencia de suelo.

En la investigación desarrollada por Mejía y colaboradores (2019), evidencian que algunas estructuras urbanas en Medellín, especialmente, edificios antiguos y sitios abandonados, mostraron crecimiento de plantas y microorganismos, asociados con la degradación de estas superficies, incluida la pérdida de masa del concreto, oscurecimiento y ablandamiento. Se observaron diferentes tipos de plantas, entre ellas, las pertenecientes a la familia *Asteraceae*, como *Galingosa ciliata* y a la familia de *Leguminosae*, como *Leucaena leucocephala*, las cuales tienen bajos requerimientos nutricionales y asociado a la rizósfera se encontraba asociada microorganismos como el *Aspergillus carbonarius.* Esta interacción acelera los procesos de biodeterioro, generando daños físicos, químicos y biológicos; pues, la actividad acidificante del *A. carbonarius permite* la disminución del pH del medio y el aumento de Ca y Si en solución para la nutrición de la planta.

Los mecanismos de actividad microbiana se basan en la producción de ácidos que aceleran el desgaste de las rocas y disolución de los minerales. Como éstos microorganismos dependen de los aportes de sustancias orgánicas dadas por las plantas por medio de exudados, la interfaz raíz-mineral-microorganismo es de gran interés (Mejía et al., 2019).

2.5 Interacción Planta –Microorganismos

La meteorización de minerales microbianos es un proceso clave generalizado, no solo por su importancia ecológica, sino también porque afecta la salud humana, así como el patrimonio arquitectónico, artístico (Uroz et al., 2009) y todo tipo de estructuras urbanas.

Uno de los principales componentes bióticos con los que se encuentran los minerales atrapados en las rocas, son los microorganismos, y los factores que afectan a los microrganismos pueden influir en la medida en que meteorizan los minerales (Jones et

al., 2020).Directamente, las bacterias y los hongos absorben los iones disueltos en los nutrientes de la meteorización de los minerales y producen una variedad de compuestos como ácidos orgánicos de bajo peso molecular y sideróforos que aumentarán la disolución del mineral atrapado (Jones et al., 2020; Uroz et al., 2009).

Indirectamente entran en juego otras influencias; por ejemplo, el carbono como nutriente limitante para el crecimiento microbiano, la presencia de un carbono preferido, como la glucosa, el pH de suelo (neutro para bacterias) y la presencia de huéspedes mutualistas (Jones et al., 2020). En este sentido, otro componente biótico que encuentran los minerales son las raíces de las plantas. Como los microorganismos, las plantas pueden considerarse en términos de sus acciones directas e indirectas hacia la meteorización mineral. Directamente, pueden aumentar la meteorización exudando ácidos orgánicos, como, por ejemplo, ácido isocítrico, y absorbiendo iones recién liberados de la solución mineral cercana. Indirectamente, un mayor crecimiento se beneficia de los mutualistas microbianos, ya que los microorganismos que se encuentran pueden acceder tanto al carbono vegetal como a los nutrientes minerales (Jones et al., 2020).

En su investigación, (Banfield et al., 1999), propone que el carbono autotrófico de las raíces de las plantas impulsa la meteorización microbiana de los minerales portadores de nutrientes. Su modelo se basa en la interacción conocida entre minerales y líquenes: como el componente de algas que proporciona el carbono para impulsar el metabolismo del componente fúngico, éste último, durante su crecimiento, libera ácidos orgánicos y penetra en el mineral con sus hifas. Es así como estos procesos promueven la liberación de nutrientes que luego son utilizados por hongos y algas para su crecimiento, lo que a su vez aumenta más la meteorización. Además, (Banfield et al., 1999), concluye que esto también ocurre con las raíces de las plantas y los microorganismos.

Los mecanismos de actividad microbiana se basan en la producción de ácidos que aceleran el desgaste de las rocas y disolución de los minerales. En éste sentido, los suelos han sido foco de la mayoría de estudios funcionales sobre la capacidad de los microorganismos para la meteorización mineral, estos entornos son complejos y están compuestos por diversos nichos (Uroz et al., 2009) como se relaciona en la Figura 1, el ciclo de nutrientes en los ecosistemas forestales se forma de cinco componentes principales: absorción, reciclaje, suministros atmosféricos, exportación de madera y drenaje. Dos de ellos (captación y reciclaje) están fuertemente influenciados por los microorganismos del suelo de diferentes nichos: la rizosfera (suelo que rodea las raíces no micorrízicas), la microrrizósfera (suelo que rodea las raíces micorrízicas) y las

superficies minerales (mineralósfera). Las raíces de los árboles, las bacterias y los hongos afectan la estabilidad de las partículas minerales, lo que lleva a la liberación de nutrientes inorgánicos. Ésta disolución modifica localmente las propiedades fisicoquímicas del suelo e influye en la nutrición y actividad fisiológica de bacterias, hongos y plantas (Stéphane Uroz et al., 2009).

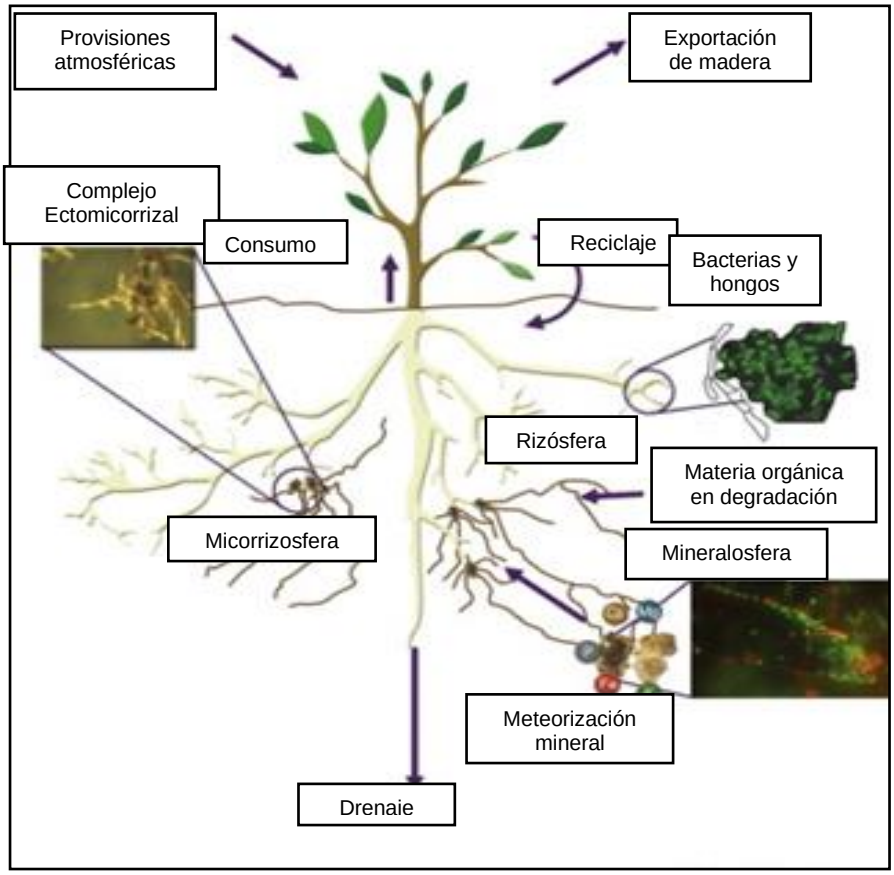


Figura 1. Meteorización microbiana de minerales del suelo (Modificado de Uroz et al., 2009)

En conclusión, se propone considerar los minerales de suelo como análogos inorgánicos de las raíces de las plantas en términos de sus efectos sobre el crecimiento de la población microbiana, como tal, los autores acuñaron el término “mineralósfera”, la zona donde el mineral determina las comunidades de los microorganismos; así como la rizosfera es la zona alrededor de la raíz donde las comunidades de microrganismos son moldeadas por la influencia de la raíz (Uroz et al., 2009). Lo anterior justifica el interés en la realización del presente estudio, pues da un entendimiento de la simbiosis que podría presentarse entre los microorganismos, especialmente, el hongo *Aspergillus niger* y las plantas establecidas en estructuras de concreto.

Además, para acelerar los procesos de biodisolución de minerales se requiere la intervención de microorganismos productores de ácido. Entre estos se encuentran los hongos filamentosos heterótrofos que producen ácidos orgánicos como *Aspergillus niger* (Rosling et al., 2009; Verdier et al., 2014). Este hongo produce ácido cítrico y ha sido reportado en la literatura por su capacidad para disolver estructuras de concreto (Wei et al., 2014).

2.6 Mineralósfera

Las rocas y los minerales varían en su composición química, grado de cristalinidad, resistencia a la intemperie y distribución (Uroz et al., 2015). Ciertas clases de minerales se degradan fácilmente en condiciones ácidas, mientras que otras son recalcitrantes (Uroz et al., 2015). Los minerales de las superficies están expuestos a las condiciones de aire, y la presencia de biopelículas se observa en rocas y monumentos, afectadas por la temperatura, el pH, la luz, la radiación UV, el oxígeno, el agua, la disponibilidad de nutrientes, entre otros (Stephane Uroz et al., 2015).

Estas rocas y minerales sirven como soportes físicos para la unión de microorganismos (bacterias, hongos) y plantas, de hecho, la composición química y las tasas de disolución de los minerales pueden considerarse impulsores importantes de estas comunidades microbianas. En particular, muchos elementos, como, Fe, Mn, Mg, P, Ca y Na, atrapados en los minerales son requeridos fisiológicamente por las bacterias como donantes de electrones, aceptores de electrones, cofactores o nutrientes (Uroz et al., 2015). Como se muestra en la Figura 2, la mineralósfera comparte propiedades comunes con la rizósfera, pues los minerales por sus propiedades fisicoquímicas y los nutrientes liberados durante la disolución, modifican su entorno químico y físicamente. En la mineralósfera, los microorganismos no son seleccionados por los nutrientes orgánicos provenientes de las raíces, sino más bien por las propiedades fisicoquímicas de los minerales, explicando el efecto selectivo de los minerales sobre las comunidades bacterias y demás microorganismos del suelo (Uroz et al., 2015).

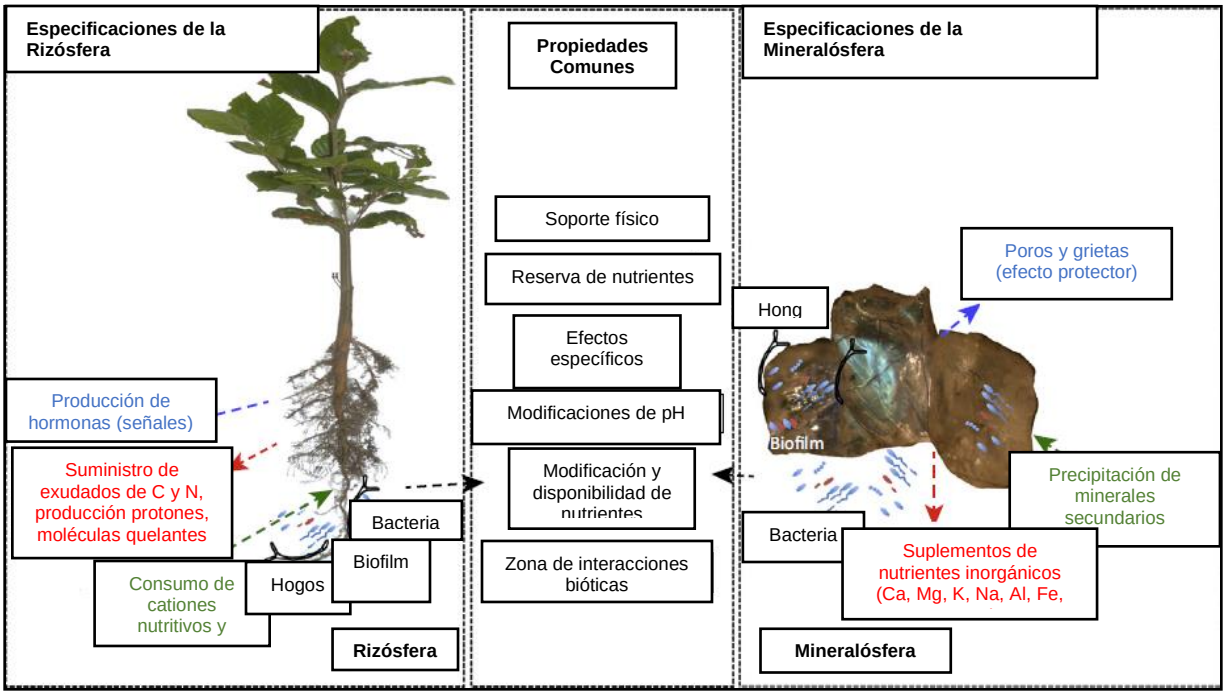


Figura 2. La mineralósfera: (Modificado de Stephane Uroz et al., 2015).

Dependiendo de los nutrientes disponibles, las bacterias pueden producir diferentes metabolitos con potencial de meteorización (Uroz et al., 2015; Uroz et al., 2009). Los mecanismos de meteorización conocidos y potenciales incluyen varias reacciones de óxido-reducción y la producción de agentes meteorológicos, como ácidos orgánicos y moléculas quelantes. Por ejemplo, ciertos aislados son más activos en la solubilización de minerales cuando se dispone de xilosa (un azúcar común en la madera) o glucosa, mientras que la actividad de intemperismo de otras bacterias aumenta en presencia de lactosa o manitol (un azúcar común en plantas, algas y hongos) (Uroz et al., 2009).

La fuente de nitrógeno también podría afectar la eficacia de las bacterias a la intemperie, algunas son más eficientes con nitrato o amonio y otras son más eficientes con una mezcla de amonio y nitrato. Se podría sospechar que en los suelos naturales, las actividades de intemperismo de las bacterias están influenciadas por exudados tanto de plantas como de hongos (Uroz et al., 2009).

Se sabe que los minerales son susceptibles a diversos subproductos biológicos del metabolismo bacteriano, incluidos protones, ácidos orgánicos y moléculas más complejas. Por ejemplo, el ácido glucónico es un metabolito que se informa con frecuencia por su capacidad para inducir la

solubilización del fosfato. La disolución del mineral también puede deberse al ácido carbónico formado a partir del CO_2 por la respiración bacteriana o al ácido nítrico y nitroso producido por las bacterias nitrificantes (Uroz et al., 2009).

Los ácidos orgánicos y las moléculas quelantes tienen una triple acción sobre la meteorización mineral: (i) se adhieren a las superficies minerales y extraen nutrientes de las partículas minerales por transferencia de electrones; (ii) rompen los enlaces de oxígeno; y (iii) quelan los iones presentes en solución a través de sus grupos carboxilo e hidroxilo, acelerando indirectamente la velocidad de disolución del mineral al crear un desequilibrio entre las concentraciones de cationes y aniones en la solución (Uroz et al., 2009).

En síntesis, la biomineralización, especialmente la precipitación biogénica, por ejemplo, del carbonato de calcio, han sido procesos catalizados por bacterias (Siegesmund & Snethlage, 2014). Se han estudiado los microorganismos en la superficie de las piedras, incluidas las asociadas a los materiales de construcción que pueden precipitar el $CaCO_3$ en forma de calcita, también los hongos pueden formar minerales, y estos procesos que involucran enzimas o productos metabólicos como los ácidos orgánicos, cuando están en contacto con precursores disponibles necesarios para esta formación de minerales y/o nuevo material mineral en las superficies rocosas y que incluyen los procesos mencionados de meteorización mineral mencionada.

CAPÍTULO 3. BIODETERIORO *In vitro* GENERADOS EN ESTRUCTURAS URBANAS POR *Aspergillus niger* COMO PRODUCTOR DE ÁCIDOS ORGÁNICOS.

3.1 Resumen

El biodeterioro causado por microorganismos pueden acelerar la disolución de minerales, causando cambios en la masa y disminución del contenido de Ca y Si en el cemento. El objetivo de esta investigación fue evaluar el biodeterioro del material cementante en presencia de *Aspergillus niger* y comparar estos resultados con el efecto de dos soluciones ácidas (ácido cítrico) y una solución de concreto residual, llamado CDW (Medio denominado "Concrete and demolition waste"), que es una solución nutritiva para que el hongo crezca. Después de curar los cilindros de concreto, se colocaron en las soluciones agresivas y se lixiviaron en las soluciones durante los días 0, 15, 40 y 55, posteriormente, se pesaron para evaluar su cambio de masa.

La profundidad del deterioro se determinó utilizando fenolftaleína y se llevaron a cabo ensayos de compresión, analizándose la composición química tras el ataque por diferentes medios y liberación de Ca y Si.

El mayor deterioro se encontró en la solución de ácido cítrico, con concentraciones de Ca y Si alrededor de 2500 g/L y 1500 g/L, respectivamente. Se puede concluir que el uso de ácido cítrico, que es producido por los hongos, es una fuente de deterioro en las estructuras urbanas. Este ácido acelera el biodeterioro del cemento, liberando Ca y Si, los elementos principales de materiales cementantes y también es una fuente de nutrientes para que las plantas crezcan.

3.2 Introducción

El concreto es el material más utilizado en la industria de la construcción debido a sus propiedades mecánicas y de acabado superficial, así como a su versatilidad, bajo precio y disponibilidad de las materias primas. Sin embargo, los edificios, estructuras y monumentos pueden sufrir degradaciones, por ejemplo, ligadas al ataque de ácidos orgánicos generados por microorganismos (Wiktor et al., 2009). Los materiales de estas estructuras son muy estables en condiciones ambientales. Esta biodegradación está asociada a la pérdida de estabilidad y cambios en las propiedades físicas, químicas y mecánicas (Giannantonio et al., 2009; LIAN et al., 2008) y procesos de meteorización (Verdier et al., 2014).

Por lo tanto, el biodeterioro del concreto causado por ácidos orgánicos generados por microorganismos requiere una mayor comprensión de la interacción entre estos ácidos y la matriz a base de cemento. Los ácidos orgánicos tienen características químicas variadas, que conducen a una agresividad significativamente diferente en materiales cementantes (Bertron et al. 2005). Además, los edificios, estructuras y monumentos están expuestos a ácidos orgánicos y microorganismos como hongos. El ataque resultante de la mezcla de efecto físico (hifas de hongos), químico (ácido orgánico) y biológico no es necesariamente la superposición de la alteración causada por cada factor tomado por separado (Bertron et al. 2007; Windt et al. 2010). El problema es, por tanto, complejo y, para comprender adecuadamente el fenómeno, cada factor (químico, biológico y físico) debe considerarse individualmente.

Desde un punto de vista general, los ácidos orgánicos, que son ácidos débiles, se disocian parcialmente en agua y reaccionan con C-S-H (silicato cálcico hidratado), CH ($Ca(OH)_2$ conocido como portlandita) y fases anhidras de la pasta de cemento para dar principalmente calcio, silicio, sales y complejos (Larreur et a. 2011; Mejía et al. 2016). Por lo tanto, elementos como Ca, Si y P quedan en solución a partir de la disolución de C-S-H, aluminosilicatos, óxidos, fosfatos, carbonatos y sulfuros, entre otros (Aprianti et al., 2015; De Windt et al., 2015; Rosling et al., 2009) .

La disociación de CH y C-S-H en presencia de ácido cítrico ha sido estudiada por De Windt et al. 2015, cuyo trabajo presenta estas reacciones de disolución mostradas en las ecuaciones 1-4

$$C-S-H\ 0.8 \quad 0.8\,Ca^{2+} + H_4SiO_4 + 0.34H_2 \rightarrow C_{a0.8}SiO_{32.8}(OH)_{0.6}: 1.24H_2O + 1.6H^+ \ (Eq.1)$$

$$C-S-H\ 1.2 \quad 1.2C^{a+} + H_4SiO_4 + 1.26H_2O \rightarrow C_{a1.2}\,SiO_{3.2}(OH)_{1.08}: 1.52H_2O + 2.4H^+ \ (Eq.2)$$

$$C-S-H\ 1.6 \quad 1.6Ca^{2+} + H_4SiO_4 + 2.18H_2O \rightarrow C_{a1.6}SiO_{3.6}(OH)_{1.54}: 1.81H_2O + 3.2H^+ (Eq.3)$$

$$C_a(OH)_2 \qquad Ca^{2+} + 2H_2O \ \rightarrow Ca(OH)_2 + 2H^+ \qquad (Eq.4)$$

Sin embargo, la degradación de las pastas de cemento no es bien conocida, así como estos ácidos orgánicos y los daños físicos de las hifas han sido poco investigados en la literatura hasta ahora. Por otro lado, estudios previos sugieren que los ácidos orgánicos generados por hongos y crecimiento de hifas también influyen en la agresividad del daño (A. Bertron et al., 2005; Erica Mejía et al., 2016), pero estas influencias no se comprenden bien.

Este trabajo analiza la degradación de la matriz cementante inducida por el ácido orgánico cítrico y *Aspergillus niger*. El propósito de este estudio fue evaluar la influencia de las características

químicas del ácido cítrico y *Aspergillus niger* en las pastas de cemento. Se comparó la degradación inducida sobre el cemento con ácido cítrico y el hongo *Aspergillus niger* con las obtenidas con otros dos medios: un medio de residuos de concreto, conocido como CDW, según Mejía et al. 2019, y un agua ácida. La degradación se evaluó mediante medidas de cambio de masa y profundidad de capa degradada. Los cambios químicos fueron explorados por Fluorescencia de rayos X (XRF) y las propiedades mecánicas fueron determinadas usando pruebas de resistencia a compresión.

3.3 Materiales y Métodos

Para el cumplimiento de objetivo específico 1, se propone evaluar los mecanismos de biodeterioro *in vitro* generados en estructuras urbanas por *Aspergillus niger* productor de ácidos orgánicos.

3.3.1 Morfología y microscopia del hongo

El hongo fue donado por la colección del laboratorio de suelos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

La conservación de la cepa se lleva a cabo haciendo crecer hasta esporulación el cultivo en medio sólido de Papa -Dextrosa – Agar (PDA), a una temperatura controlada de 30°C por 72 horas, en Incubadora marca Dynamic BIOexpert (BRE240PV). La esterilización del medio de cultivo en autoclave Marca Tuttnauer a 120°C MPa por 15 min.

3.3.2 Análisis de DNA para el hongo y amplificación por PCR

El proceso de identificación se realizó por la Corporación de investigaciones biológicas (CIB). Se hizo la amplificación de las regiones ITS1 e ITS4, por medio de PCR con primers universales y se procedió a secuenciar los fragmentos resultantes, las secuencias obtenidas *forward y reverse* fueron depuradas, editadas y alineadas usando el software Bioetid. Las secuencias consenso fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos del genebank usando nucleótidos BLAST.

3.3.3 Preparación de probetas

Las pastas para los cilindros de cemento se fabricaron de acuerdo con la ASTM C305, con un diámetro de 30 mm y altura de 60 mm. Se utilizó un cemento gris comercial y su composición química se presenta en la Tabla 2. La composición química se determinó mediante Fluorescencia de Rayos X (FRX). El espectro utilizado fue un tubo de irradiación de cromo PANalytical MiniPal

2,9 w (30KW, 1mA), detector Si-PIN, cambiador de muestras de 12 posiciones, 100-240 V, 45-64 HZ. Una vez fabricados los cilindros, se curaron en agua a temperatura ambiente durante 28 días.

Como se puede observar en la Tabla 2, se confirma que el cemento comercial tiene adición mineral de $CaCO_3$, ya que el valor de pérdida por ignición (LOI) es mayor al 5%. Pasado el tiempo de curado, los cilindros de pasta de cemento endurecidos se sumergieron en diferentes soluciones agresivas.

Tabla 2. Composición química del cemento obtenida por FRX

Elemento oxidado	**SiO_2**	**CaO**	**Al_2O_3**	**Fe_2O_3**	**P_2O_5**	**MgO**	**Na_2O**	**K_2O**	**MnO**	**SO_3**	**Pérdida por ignición**
	13,87	59,72	2,47	1,98	0,08	2,48	0,08	0,17	0,04	3,05	15,63

3.3.4 Soluciones agresivas: ácido cítrico

La solución de ácido cítrico fue preparada fijando una concentración de 8,2 g/L (0,04 M). Usando un pH constante de 3 durante el proceso. El ácido cítrico utilizado fue la marca RD reactivos con una pureza de 99%. Para mantener el valor de pH, se empleó ácido sulfúrico (H_2SO_4), marca Merck, a una concentración de 18,3 mol/L, adicionado todos los días, durante 15 días. El pH se regula cuando la solución lo requiere. Todos los elementos fueron esterilizados en autoclave Marca Tuttnauer a 120 °C, 15 MPa por 15 min.

Los cilindros se pusieron en contacto con solución de ácido cítrico hasta obtener un volumen de trabajo de 100 mL. Esto se vertió en un reactor de 250 mL. Esta mezcla fue sometida a agitación orbital (110 rpm) y analizadas a diferentes tiempos a una temperatura promedio de 28 °C, usando un shaker Thermoscientific (MaXQ4000).

3.3.5. Solución con *Aspergillus niger* como productor de ácidos orgánicos

La solución fue preparada con un volumen fijo de 50 mL/L y una concentración de $1x10^7$ unidades formadoras de colonias (UFC) en medio CDW (Medio denominado “Concrete and demolition waste”) por Mejía et al, 2017), el cual consta de 1 g/L de NaCl, 1 g/L de NH_4NO_3, 12,5 g/L de glucosa y 0,08 g/L de K_2PO_4 para permitir las condiciones de nutrición del hongo.

La reinoculación al sistema, se determinó con la cinética de crecimiento del hongo. Todos los días se sembró en medio PDA (Potato Dextrosa Agar) y se identificó el crecimiento de colonias.

Las muestras fueron incubadas a 25 ± 2 °C en una Incubadora marca Dynamic BIOexpert (BRE240PV). Los resultados mostraron que es necesario reinocular y reemplazar la solución cada 7 días durante el proceso.

Con el fin de cuantificar la profundidad de la alteración se cortaron las muestras perpendicularmente a su eje y se adicionó fenolftaleína así la profundidad del color corresponde a la alteración de la muestra. Las mediciones de pérdida de masa se realizaron monitoreando el peso antes y después del tratamiento.

3.3.6 Soluciones control

Para comparar los efectos producidos por el hongo y por el ácido generado por él, se utilizaron otros dos medios. Para el hongo se preparó medio CDW (Medio denominado “Concrete and demolition waste”) sin *Aspergillus niger* y para el medio con ácido cítrico se preparó agua ácida, con ácido sulfúrico con un pH de 3.

3.3.7 Monitoreo de parámetros de degradación en el tiempo

En los diferentes tiempos analizados se realizaron observaciones macroscópicas para determinar la degradación del material. Las observaciones ópticas se desarrollaron para analizar el oscurecimiento de los cilindros de cemento, que es el primer indicador que muestra la degradación biológica del material.

Las mediciones se realizaron en cada tiempo (0, 15, 40 y 55 días) para determinar los cambios de masa durante la prueba. Para medir la masa del cilindro, se sacaron de la solución y se limpiaron antes de colocarlos en la balanza.

La profundidad de degradación se evaluó utilizando fenoftaleína, según RILEM CPC-18.

3.3.8 Ca y Si en solución

Las soluciones fueron analizadas químicamente para determinar los contenidos de Ca, Si y P. Las recuperaciones de estos elementos fueron obtenidas por un balance en las soluciones acuosas. Se tomaron 10 mL de las muestras en los tiempos 0, 15, 40 y 55 días de experimentación y se desarrollaron pruebas de absorción atómica (AA) de éstos elementos en cada solución utilizando un espectrómetro Perkin Elmer 2380 para la lectura.

3.3.9 Análisis químico de las probetas

Para determinar el contenido del elemento final se utilizó la técnica de FRX. El espectrómetro utilizado fue PANalytical MiniPal 2, con tubo de irradiación de cromo 9 w (30KW, 1 mA), detector Si-PIN, y con cambiador de muestras de 12 posiciones, 100-240V, 45-65 HZ

3.3.10 Pruebas de resistencia a la compresión

La resistencia a la compresión se determinó al final de la prueba (55 días), de acuerdo con la norma ASTM C39. Se usó una muestra de referencia que no fue expuesta a ningún medio agresivo para comparar su resistencia a la compresión con la resistencia de los cilindros sumergidos en los diferentes medios. Para desarrollar la prueba se utilizó un equipo digital Humbolt de Pleobrey con una celda de carga de 50 kN.

3.4 Resultados y Discusión

3.4.1 Morfología y microscopía de *Aspergillus niger*

En la Figura 3 se observan agrupaciones de micelio (colonias), inicialmente de color blanco grisáceo, que adquiere una pigmentación amarilla en corto tiempo y posteriormente puntos de color oscuro de aspecto polvoriento y de rápido crecimiento, el reverso de las colonias con aspecto gamuzado de color gris-amarillento.

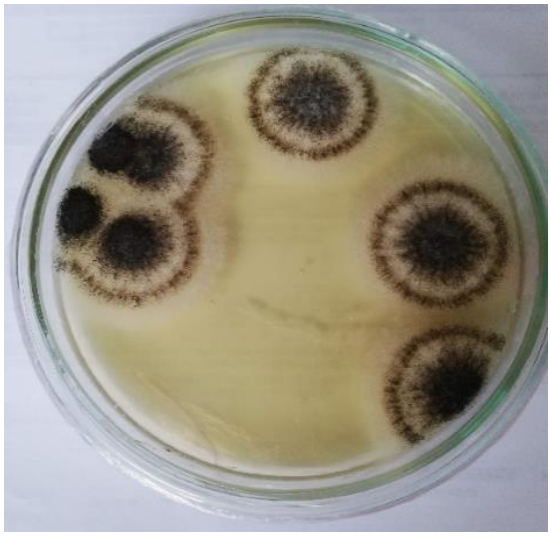


Figura 3. Características morfológicas después de 5 días de crecimiento: Micelio de aspecto pulverulento color amarillento y negro correspondiente a colonias *Aspergillus niger*, en medio de cultivo PDA

Para el análisis microscópico, se empleó la técnica de microcultivo, el cual consistió en inocular porciones del hongo sobre cuadros de agar PDA de aproximadamente 1 cm^2 en caja de Petri acondicionada como cámara de humedad. Se incubó por 5 días a una temperatura de 25 °C. Posterior a este tiempo, se realizó tinción con azul de lactofenol para evidenciar las estructuras propias del hongo al microscopio óptico. En la Figura 4, se observan conidióforos con vesículas globosas, que contienen fíalides y conidios unicelulares.

Figura 4. Microscopía de *Aspergillus niger.* 40x. Se evidencia el conidióforo, la vesícula, fiálides y conidios rugosos pigmentados.

3.4.2 Identificación por DNA de *Aspergillus niger*

La identidad de los asilamientos confirma *Aspergillus niger*, con un porcentaje de 99%, según la secuenciación de las regiones ITS1 e ITS4.

“TAAAAAACGAAGGCAAGGTCTTTGGGCCACCTCCCATCCGTGTCTATTGTCCCTGTTGCTTCGGCG
GGCCCGCCGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGCGCCTCTGCCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGA
CCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACTTTCA
ACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT
GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGG
GGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACAT
GCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCA
GGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAGCCGGAGGAAAAATATGACTTTATTAAAAAGG
GGAAAAAAAACGAAGGCAAGGTCTTTGGGCCACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCG
GCGGGCCCGCCGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGCGCCTCTGCCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGG
AGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACT
TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA

ACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTC
CGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGT
CCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTAT
GGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTCTTTCCAG
GTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAGCCGGAGGAAAAATATG
ACTTTATTAAAAAGGGGAAGTGCTT”

3.4.3 Observación macroscópica de probetas

La Figura 5, presenta los cilindros después de 55 días en los diferentes medios. La muestra de referencia corresponde a un cilindro que no se sumergió en ningún medio. Se puede ver que esta muestra tiene un color de material de cemento típico. El cilindro expuesto al agua ácida sufrió un cambio de color, convirtiéndose en un gris más claro, mientras que la muestra en ácido cítrico produjo una capa blanca que se deshizo y precipitó en la solución líquida. Se puedo observar que una vez esta capa precipitó, una nueva comenzó a aparecer en la superficie del cilindro. La muestra en medio CDW se parecía al cilindro de referencia; solo se pudo detectar un pequeño cambio de color. Esta muestra fue un poco más oscura que la referencia. El cilindro en medio CDW con *Aspergillus niger* se volvió más oscuro, convirtiéndose en un color verde. Este cambio de color está asociado con la degradación del material, además de mostrar superficie carcomida y con poros grandes.

Figura 5. Observación macroscópica de los cilindros después de 55 días inmersos en los diferentes medios: CDW con *Aspergillus niger*, ácido cítrico, medio CDW, agua ácida y referencia.

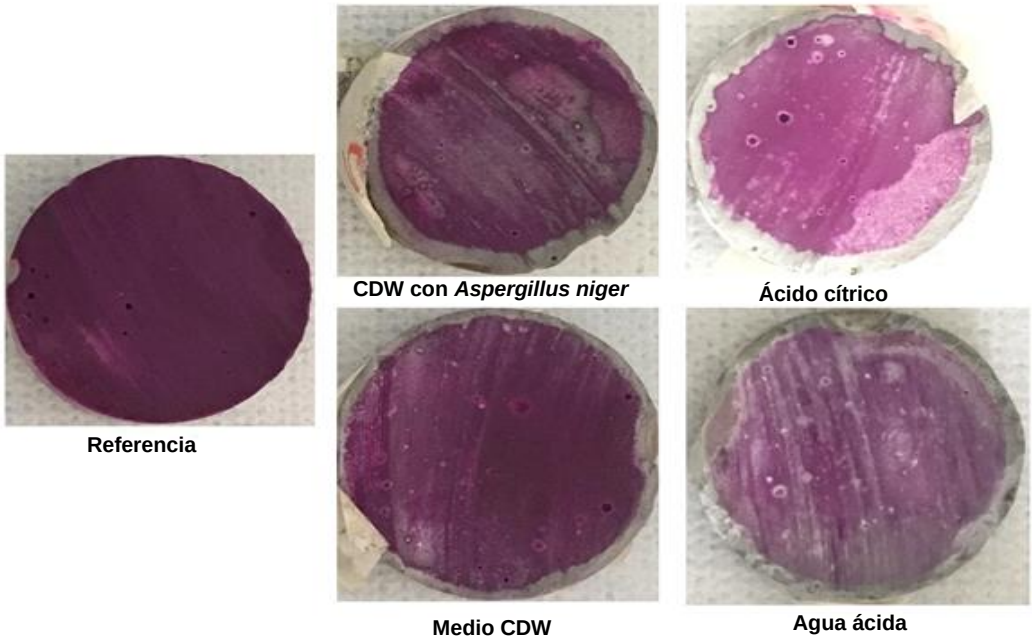


Figura 6. Cilindros de concreto alterados en cortes de sección transversal después de 55 días de inmersión en los diferentes medios: Referencia, CDW con *Aspergillus niger*, ácido cítrico, medio CDW, agua ácida.

La Figura 6 muestra las secciones transversales de referencia, CDW con *Aspergillus niger,* ácido cítrico, medio CDW, y agua ácida después de 55 días de inmersión en cada medio. La zona de color violeta, debido al contacto con la fenftaleína (indicador de alcalinidad), se considera una zona sin daños, mientras que la zona sin el color representa las áreas donde se produce el deterioro, son áreas carbonatadas, relacionadas con la pérdida de pH que ocurre cuando el dióxido de carbono atmosférico reacciona con la humedad dentro de los poros del concreto y convierte el hidróxido de calcio (con pH alto) a carbonato de calcio, el cual tiene un pH más neutro. La presencia de una zona no coloreada se asocia con reacciones de carbonatación, que pueden producir una reducción en las propiedades mecánicas del material, debido a la disolución de calcio que contiene hidratos como portlandita, $Ca(OH)_2$ y C-S-H.

Cuando la carbonatación ataca el C-S-H, disminuye la resistencia y en profundidad promueve la corrosión del acero refuerzo, debido a que la capa pasivadora deja de ser estable por la caída del pH, generando grietas y la caída de resistencia del concreto. También se disminuye el pH por la lixiviación de la portlandita que es la reserva alcalina del cemento hidratado.

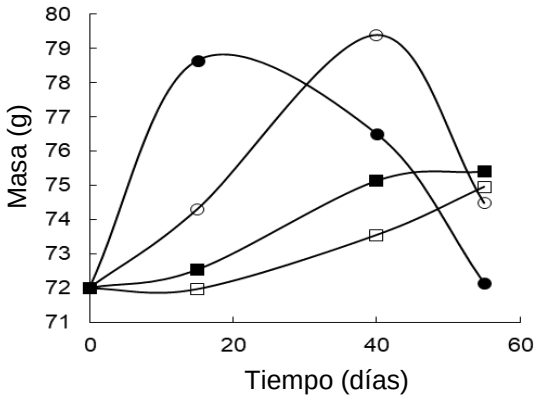
3.4.4 Mecanismos de degradación

La Figura 7, muestra la variación en el tiempo del cambio de masa (a) y las profundidades alteradas de los cilindros (b). Las muestras presentan una tendencia a aumentar la masa con el tiempo. La ganancia de masa fue mayor en el ácido cítrico y la solución que contenía ácido sulfúrico, que en el medio CDW con el *Aspergillus niger* y medio CDW.

En el medio con ácido cítrico y agua ácida mostró una pérdida de masa al final de la prueba.

Esta pérdida de masa, posiblemente se deba a una capa de citrato de calcio formada en la superficie de los cilindros que se deshizo y precipitó. *El Aspergillus niger* en medio CDW tuvo un comportamiento intermedio. Después de 40 días de inmersión, la ganancia de masa de ácido cítrico y agua ácida fue la misma pero el ácido cítrico fue 1,1 mayor que las del medio CDW con *Aspergillus niger*. El mayor daño se obtuvo para el ácido cítrico y los medios CDW con *Aspergillus niger* (0,31 mm y 0,33 mm respectivamente). La alteración en profundidad presentada por agua ácida y medios CDW fue de 0,22 mm y 0,16 mm respectivamente. En este caso, el medio más agresivo fue CDW con *Aspergillus niger.* También debe tenerse en cuenta que la tendencia del material al ácido cítrico y hongo es un crecimiento continuo.

a).



b).

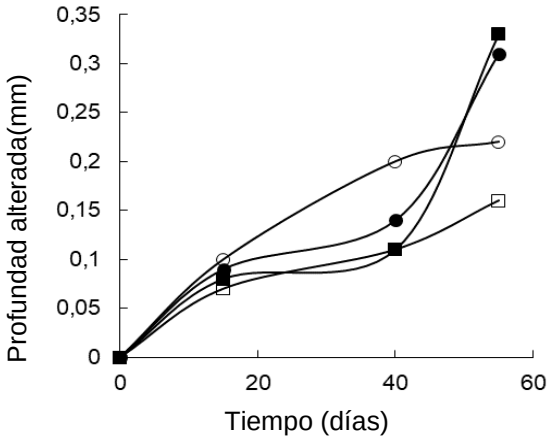


Figura 7. Variación de dureza en equipo digital Humbolt de Pleobrey con una celda de carga de 50 kN. a) masa y b): Profundidad alterada, de acuerdo con el tiempo de inmersión en los diferentes medios. Fue: ▪ medio CDW con *Aspergillus niger* □ medio CDW ● medio ácido cítrico ◦ medio en agua ácida.

3.4.5 Análisis de los elementos en las diferentes soluciones

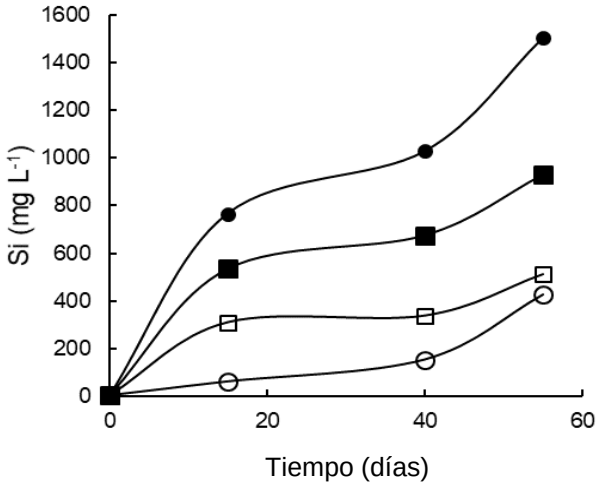


Figura 8. Concentración de Si en función del tiempo en los diferentes medios. Dónde: ▪ Es medio CDW con *Aspergillus niger* □ Medio CDW ● Medio con ácido cítrico ◦ Agua ácida.

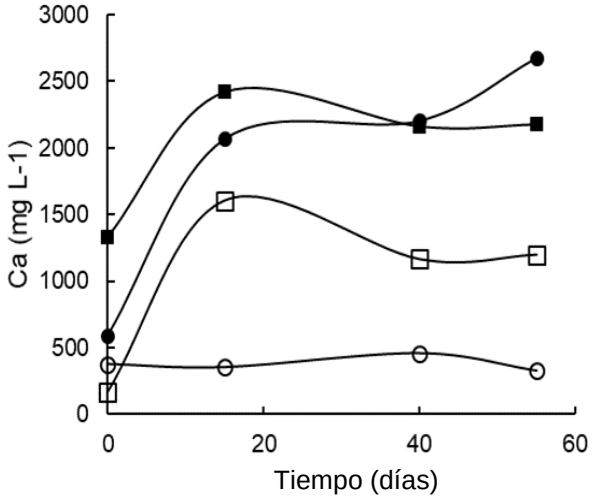


Figura 9. Concentración de Ca en función del tiempo en los diferentes medios. Dónde: ▪ Es medio CDW con *Aspergillus niger.* □ Medio CDW ● Medio con ácido cítrico ◦ Agua ácida

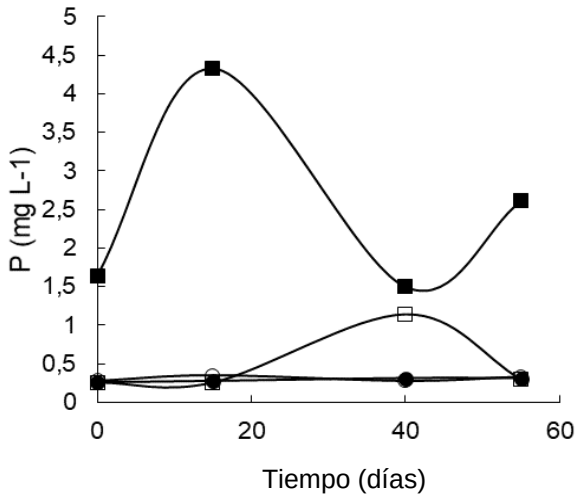


Figura 10. Concentración de P en función del tiempo en los diferentes medios. Dónde: ▪ Es medio CDW con *Aspergillus niger* □ Medio CDW ● Medio con ácido cítrico ◦ Agua ácida

Los resultados de la disolución del cilindro de concreto indicaron que la velocidad de lixiviación aumentó con el tiempo y el medio (Figuras 8, 9 y 10). La concentración de Si, Ca y P en medio con ácido cítrico aumentó hasta 1505, 2563 y 0,3 mg/L, respectivamente. En medio CDW con *Aspergillus niger* la concentración de Si, Ca y P alcanzaron valores de 929, 2177 y 2,6 mg/L, respectivamente. Es importante tener en cuenta que la disolución de Si, Ca y P en agua ácida y medio CDW fue menor que los otros medios.

En la Figura 10 se puede notar que la lixiviación de P solo fue representativa en CDW con *Aspergillus niger*. Los valores en los otros medios no fueron significativos. La razón de este comportamiento es que ese hongo requiere P para su proceso metabólico y este nutriente no se agregó a la solución. Esto es evidencia de que el metabolito del hongo genera una disolución de la pasta de cemento, permitiendo que *Aspergillus niger* crezca debido a la absorción del fósforo presente en el material cementante. Esto fue corroborado contando las unidades formadoras de colonias (UFC), que estaban alrededor de $1x10^7$ UFC.

Los resultados de la disolución de Ca y Si estuvieron de acuerdo con las medidas de profundidad en zonas alteradas. Las muestras con mayores áreas alteradas fueron las que estuvieron en ácido cítrico y en CDW con *Aspergillus niger* e igualmente presentaron mayor disolución de Ca y Si. Esto demuestra que el proceso de biodeterioro generado por hongos, y el ácido orgánico producido por él, son más agresivos que otro tipo de ataque utilizado en este trabajo.

Las fuentes de Ca y Si en el cemento hidratado son el C-S-H y la portlandita, que son las dos fases principales responsables de la resistencia mecánica y de la alcalinidad de los materiales cementantes base cemento pórtland. La pérdida de estas fases en los materiales cementantes puede producir una disminución de las propiedades mecánicas, de la alcalinidad y una degradación del material, cuando se somete a estos medios por largo tiempo.

Tabla 3. Análisis de FRX muestra la composición química inicial del cemento y en medio CDW con *Aspergillus niger*, en medio CDW sin hongo, ácido cítrico y agua ácida después de 55 días de experimentación (Obtenido por FRX).

Elementos oxidados	SiO_2	CaO	**Al_2O_3**	**Fe_2O_3**	**P_2O_5**	**MgO**	**Na_2O**	**K_2O**	**MnO**	**SO_3**	**Pérdida por ignición**
Cemento	**13,87**	**59,72**	**2,47**	**1,98**	0,08	2,48	0,08	0,17	0,04	3,05	**15,63**
CDW *Aspergillus niger*	**12,81**	**49,88**	**1,82**	**0,04**	0,08	2	0,08	0,03	0,04	2,49	**27,78**
CDW	**12,91**	**49,05**	2,59	1,84	0,08	2,02	ND	0,03	0,04	2,42	**28,5**
Ácido cítrico	**11,84**	**44,99**	2,41	1,64	0,06	1,81	ND	0,06	0,04	6,1	**30,69**
Agua ácida	**12,41**	**46,67**	2,47	1,77	0,08	1,94	0,04	0,04	0,04	5,33	**25,89**

Se realizaron análisis de FRX en cilindros de cemento para corroborar los resultados obtenidos en la solución líquida. Los análisis mostraron la composición química de cinco muestras (forma original del cemento, CDW con *Aspergillus niger*, medio CDW, ácido cítrico y medio con agua ácida). Los resultados indicaron que el contenido de Si y Ca disminuyó en todas las muestras después de 55 días de la prueba, en comparación con el cemento original (Tabla 2). Estos cambios en las concentraciones de elementos con los diferentes medios demuestran el proceso de disolución explicado anteriormente. También sugieren la descalsificación de estos materiales durante las pruebas. El proceso de lixiviación es una reacción ácido-base donde la solución de entrada con ácido (pH bajo) comienza a deshidratar el sistema y a reaccionar con las fases presentes en la pasta y, en consecuencia, el Ca y Si son liberados.

De la Tabla 3 se puede notar una reducción de Al y Fe cuando el material fue sometido al medio con hongo. Las fases aluminato tricálcico y ferroaluminato tetracalcico del cemento se componen

de estos elementos y su disminución genera una degradación del material. Sin embargo, se debe considerar que la presencia de estas dos fases puede producir una expansión retardada al reaccionar con sulfatos, fenómenos debidos a la formación de etringita. Esta fase puede producir un incremento en la masa del material, debido a la gran cantidad de agua que incorpora en su estructura.

Según la Figura 11, los cilindros expuestos al hongo tuvieron un pequeño aumento en masa, en comparación con las soluciones ácidas, puede deberse también a la formación de sales en su superficie e incorporación de agua en sus poros.

La reducción de masa puede explicarse a partir de la reducción de Al y Fe, en consecuencia, se inhibe la formación de ettringita retardada, también, la pérdida de masa puede explicarse con la lixiviación de Ca y Si en las soluciones.

En la Tabla 3 también se muestra un cambio de valores por pérdida de ignición (LOI). Este parámetro está asociado a la carbonatación del material. El mayor incremento en el valor de LOI se debe a la presencia de ácido cítrico, que está de acuerdo con los resultados de las pruebas anteriores. Indicando que éste es el medio más agresivo para el material cementante. Debe recordarse que el ácido cítrico es uno de los principales metabolitos producidos por hongos, cuando se establecen en estructuras urbanas.

La reacción de ácido orgánico y ácido sulfúrico con la pasta produce una sal altamente soluble en agua. Por lo tanto, no tiene un efecto específico sobre los mecanismos de degradación de las pastas de cemento.

Se desarrollaron pruebas de resistencia a la compresión para evaluar los cambios en esta propiedad, debido a los diferentes medios después de 55 días. Estos valores se compararon con la muestra de referencia. Los resultados mostraron que no hubo gran diferencia entre los diversos medios, en comparación con las muestras de referencia. Esto puede explicarse, porque 55 días no es tiempo suficiente para generar degradación significativa, visto en las pruebas de profundidad. Sin embargo, se puede notar una pequeña reducción en la resistencia de los cilindros en agua ácida y en medios con ácido cítrico.

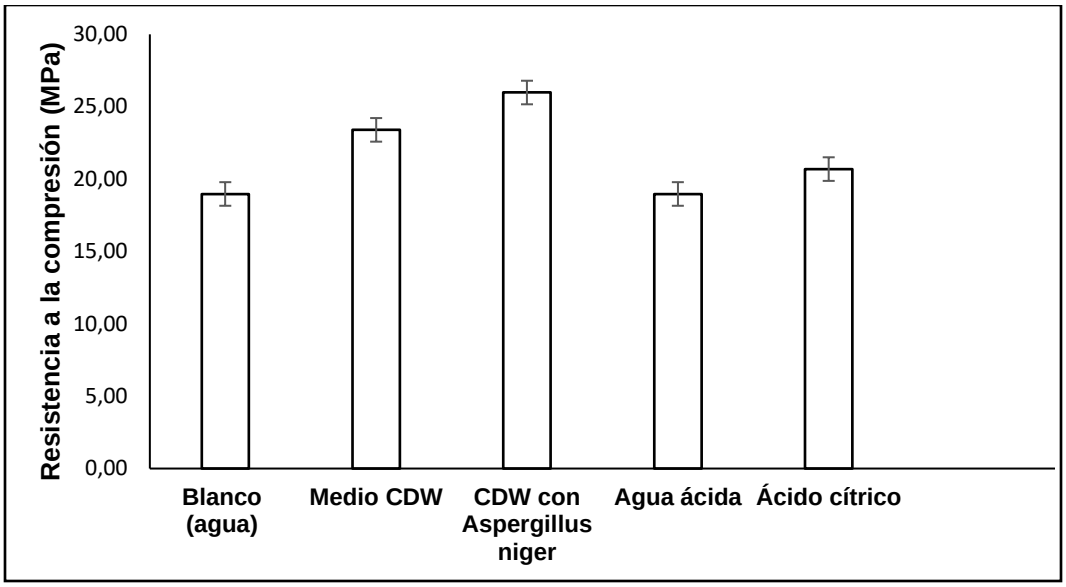


Figura 11. Resistencia a la compresión del material después de 55 días en los diferentes medios: Blanco, CDW con *Aspergillus niger*, Medio CDW sin hongo, ácido cítrico, agua ácida y referencia del material.

La degradación se debe a un proceso de lixiviación y a reacciones ácido-base. Los efectos del ataque por hongos y ácido cítrico pueden compararse con ácidos fuertes con el agua ácida (contiene ácido sulfúrico). Las pastas de cemento se sometieron a caracterización química que muestra que el ataque se produjo principalmente por una descalcificación progresiva y pérdida de silicio de la pasta y por la disolución de las fases cementantes (hidratadas y compuestos anhidros).

3.5 Conclusiones.

1. La lixiviación de los iones de Ca, Si y P se vieron influenciados por los medios que contenían ácido cítrico y CDW con *A. niger*; este hongo al producir metabolitos ácidos es capaz de atacar agresivamente la superficie mineral y disolver el carbonato presente en las muestras de concreto, esto se evidenció tras someterse los cilindros de cemento a estas soluciones.

2. La carbonatación presentada en las superficies fue más fuerte en las soluciones que contenían ácido y hongo, los ácidos en el medio bajan el pH que inicialmente es alcalino, lo que provoca un aumento en la porosidad y el cilindro de concreto pierde su

capacidad protectora. En la solución con ácido cítrico se evidenció caída de una capa blanca en la solución, la cual se relaciona con la conversión de hidróxido de calcio a carbonato de calcio el cual tiene un pH más neutro.

3. La degradación del material se puede explicar por un proceso de disolución por reacciones ácido – básicas, promoviendo la liberación de calcio y silicio, que son los elementos más importantes en un matriz cementante.

4. El $CaCO_3$ es rápidamente precipitado con los productos metabólicos de *A. niger* y de las soluciones ácidas, sobre todo en la del ácido cítrico y, la concentración de calcio tiende a estabilizarse después de 30 días de tratamiento, esto puede deberse a que son de las primeras reacciones en el deterioro del concreto, pues al haber humedad se acelera el proceso de precipitación del carbonato de calcio y luego entra en actividad el hongo y sus ácidos, para catalizar la reacción en el momento en que se aumentan los poros y posterior liberación de calcio al medio.

5. El micelio de *A. niger* puede responder a diferentes minerales que contengan silicatos y fosfatos para regular su crecimiento, colonización, asimilación de carbono y acidificación del sustrato (Geoffrey M. Gadd, 2007), es por esto se en las curvas de los elementos liberados, solo en el medio que contenía el hongo se lixivió el fósforo, los valores en los otros medios no fueron significativos, la razón de este comportamiento es que el hongo requiere el P para su proceso metabólico y lo obtiene a través de los metabolitos excretados por sus hifas. Esto es evidencia de que el hogo genera una disolución del concreto, permitiendo su crecimiento a partir de la absorción del fósforo presente en el material cementante.

CAPÍTULO 4. MECANISMOS DE ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA Y BIODETERIORO *In vitro* GENERADOS ENTRE *Aspergillus niger* Y *Leucaena leucocephala* ESTABLECIDAS EN EL CONCRETO.

4.1 Resumen

Las interacciones entre hongos y plantas en estructuras, generan inestabilidad al concreto cambiando sus propiedades químicas, físicas, mecánicas y mineralógicas, lo que conlleva a un biodeterioro, las cuáles son inducidas por procesos de actividad metabólica de estos organismos vivos, cuando producen ácidos orgánicos, entre ellos oxálico, cítrico y glucónico.

El objetivo de esta investigación conocer los mecanismos de degradación mediados por la producción de ácidos orgánicos como el cítrico, oxálico y glucónico proveniente del metabolismo el hongo *Aspergillus niger*, en simbiosis con la planta *Leucaena leucocephala* en diferentes medios suplementados con concreto residual. Después de germinar las semillas de *Leucaena leucocephala* se sometieron a diferentes tratamientos *In vitro*, los cuales tenían metabolitos previamente extraídos de *Aspergillus niger* y concreto residual caracterizado mineralógicamente por DRX. El montaje se realizó con 5 repeticiones, incluyendo los controles no inoculados, expuestos a un fotoperiodo de 12 horas luz con una intensidad lumínica de 1500 - 2000 luxes y una temperatura de 25 °C ± 2 °C por 15 días. La evaluación de los ácidos orgánicos liberados en la simbiosis, se realizó mediante HPLC, se midió pH antes y después de la experimentación y altura en (cm) de las plántulas. El ácido glucónico representa mayor concentración en los tratamientos como reserva de carbono y energía para el hongo, la mayor generación se encontró en el tratamiento que contenía concreto residual y metabolitos del hongo (Mt 37,5%+*Leu*+CR) a razón de 309,11 mg/L, entre tanto el ácido oxálico, siendo el primer ácido producido tanto por las raíces de la planta como por el hongo, presentó su mayor concentración (19,30 mg/L) en el tratamiento que no se le adicionó concreto residual y 25% de metabolito extraído (Met 25%+*Leu),* el cual es el iniciador de la caída del pH en el medio y por último, en un pH menor a 7, se produce el ácido cítrico, con propiedades amortiguadoras y fuertemente deteriorantes, su mayor concentración (5,52 mg/L) en el tratamiento con concreto residual y metabolitos del hongo (Mt 37,5%+*Leu*+CR). Se puede concluir que hay un efecto positivo en el crecimiento de las plántulas al combinar el concreto residual con extracto del hongo, debido a la liberación de nutrientes atrapados como el P y Ca, mediante la acción de los ácidos orgánicos generados.

4.2 Introducción

El proceso de alteración de una roca comienza inmediatamente después se extrae de la cantera y entra en contacto con los agentes atmosféricos (viento, lluvia, heladas, etc.). Esta alteración inicialmente física y química, facilita la colonización por microorganismos y plantas produciendo un biodeterioro; fenómeno que implica el proceso de destrucción de un material de interés para el hombre por organismos vivos o por productos de su metabolismo (Cwalina et al, 2008).

La meteorización de minerales microbiana es un proceso clave generalizado, no solo por su importancia ecológica, sino también porque afecta el patrimonio arquitectónico y artístico. Las plantas y los microorganismos participan activamente en la formación y destrucción de minerales (Uroz et al., 2015; Stéphane Uroz et al., 2009). Por ejemplo, los microoganismos contribuyen a la precipitación de nuevos minerales y a la producción de carbonato o biocalcificación, en el caso de la formación de calcita (Uroz et al., 2009). En especial, los hongos, pueden promover el crecimiento de las plantas liberando nutrientes minerales atrapados en la roca artificial, ya que afectan la estabilidad de las partículas minerales, lo que lleva a la liberación de nutrientes inorgánicos. Esta disolución modifica localmente las propiedades fisicoquímicas del suelo o el sustrato e influye en la nutrición y las actividades fisiológicas de las comunidades asociadas (Stéphane Uroz et al., 2009).

Entre los mecanismos involucrados en la meteorización mineral, es la acidificación (LIAN et al., 2008; E. Mejía et al., 2019; Stéphane Uroz et al., 2009). Se sabe que los minerales son susceptibles a diversos subproductos biológicos del metabolismo de los microorganismos, incluidos protones, ácidos orgánicos y moléculas más complejas (Gadd, 2007; Mejía et al., 2019; Uroz et al., 2009).

Según, Uroz, 2009, Los ácidos orgánicos y las moléculas quelantes tienen triple acción sobre la meteorización mineral (I) se adhieren a las superficies minerales y extraen nutrientes mienrales por transferencia de electrones; (II) rompen los enlaces de oxígeno; y (III) quelan los iones presentes en solución a través de sus grupos carboxilo e hidroxilo, acelerando indirectamente la velocidad de disolución del mineral al crear un desequilibrio entre las concentraciones de catones y aniones en la solución.

Por ejemplo, el ácido glucónico es un metabolito que se ha informado por su capacidad para inducir la solubilización del fosfato (Uroz et al., 2009), este se produce por oxidación directa la glucosa, sin embargo, hasta ahora no se ha demostrado el impacto real de este en la meteorización de minerales complejos como los silicatos (Stéphane Uroz et al., 2009). Entre tanto el ácido oxálico, producido por gran cantidad de hongos, entre otras muchas funciones en

geomicología, incluye la meteorización biológica del P y S, disolución y formación de minerales (Gadd et al., 2014). Se encuentra comúnmente en sales de oxalato, especialmente el oxalato de calcio, involucrado en el biodeterioro de rocas, materiales lignocelulósicos y alteración del patrimonio cultural (Gadd, 2007; Gadd et al., 2014).

El ácido cítrico, puede reaccionar con los carbonatos, producir sales altamente solubles generar un biodeterioro al reaccionar con la portlandita presente en el concreto (Mejía et al. 2017; Mejía et al., 2019). El ácido oxálico, cítrico y glucónico son conocidos por ser generados por la especie *Aspergillus niger*. Este hongo puede realizar simbiosis con plantas, de las cuales recibe el carbono fotosintético, mientras que este protege la simbiosis de condiciones ambientales extremas y aumenta el área de absorción de la asociación y proporciona un mayor acceso a los nutrientes minerales, pues a bioacidulación que realiza el hongo promueve la disolución de minerales y la consecuente liberación de nutrientes como calcio y silicio; de esta forma, favorece la nutrición de las plantas establecidas en estas estructuras, en cambio las plantas aportan al hongo compuestos de carbono por medio de sus exudados radiculares, entre los que se puede encontrar el ácido glucónico de los que se alimenta el hongo, estableciendo así una relación mutualista entre ellos (planta-hongo) (Geoffrey M. Gadd, 2007; Geoffrey Michael Gadd et al., 2014; Jones et al., 2020; Mej & Sc, 2017; E. Mejía et al., 2019; Stéphane Uroz et al., 2009).

A pesar de que los mecanismos promovidos por ácidos orgánicos, como el cítrico y oxálico a partir del hongo, proporcionan un ataque más eficiente en la disolución de los minerales, se cree que una de las principales razones para el éxito, en estos procesos, es la capacidad de formar asociaciones simbióticas con plantas fotosintéticas, las cuales son responsables de importantes transformaciones de nutrientes inorgánicos, como el fosfato, a partir de los materiales de construcción, la piedra, la madera y el cemento (Geoffrey M. Gadd, 2007).

Este trabajo analizó los ácidos orgánicos generados en la simbiosis entre la planta *Leucaena leucocephala* y el hongo *Aspergillus niger* en una fuente de nutrientes con concreto residual *In vitro*. Se comparó el crecimiento de las plantas y la generación de los ácidos orgánicos (Cítrico, oxálico y glucónico), con los obtenidos de otros medios que no tenían concreto residual: dos medios controles, uno con adición de concreto residual y el otro sin adición; medios con adición de metabolito extraído a partir de *Aspergillus niger* a diferentes concentraciones, todos con el indicador biológico L*. leucocephala* previamente germinada. La generación y cuantificación de ácidos orgánicos se evaluó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y midió el pH antes y después de la incubación y se midió el crecimiento de la plántula.

4.3 Materiales Y Métodos

Para el cumplimiento del objetivo específico 2, se propone establecer los Mecanismos de asociación simbiótica y biodeterioro *In vitro* generados entre *Aspergillus niger* y *Leucaena leucocephala* establecidas en el concreto

4.3.1 Caracterización mineralógica del material por Difracción de rayos X

El concreto residual (CR) fue cedido por el laboratorio LEACCEM, del Centro para el Desarrollo del Hábitat y la Construcción, del Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Regional Antioquia.

Para el análisis mineralógico de Difracción de rayos X (DRX), las muestras fueron sometidas a proceso trituración y molienda con el fin de obtener una distribución de tamaño de partícula que pasara a través de la malla 200 de la serie de tamices Tyler, quedando con un tamaño menor a 4 mm, los cuales representan el 40% de este residuo, y que no se pueden utilizar en los procesos de reciclaje actuales, porque no presentan propiedades mecánicas requeridas para un desempeño adecuado (Angulo et al., 2009).

El análisis de DRX, para determinar las fases minerales del material; se realizó en el laboratorio de Difracción de rayos X de la Institución Universitaria Pascual Bravo, en un Difractómetro de rayos X, Marca Bruker D8 advance eco, con radiación de Cu de la longitud de onda 1,54060 Â Potencia 40 kV por 25 mA Barrido desde 5° hasta 80°, el tiempo de acumulación por paso es de 0,020° a una temperatura de 28° C.

4.3.2 Extracción de metabolitos en cultivo líquido de *Aspergillus niger*

Consistió en inocular la cepa en 200 mL de medio de cultivo líquido Sabouraud, los cuales se expusieron a condiciones de agitación a 120 rpm por 10 días, Pasados estos días, se procedió a filtrar el medio con el hongo en equipos de filtración y bomba para hacer vacío con filtro Whatman # 1 y filtro de 0,2 µm para eliminar todo el cuerpo vegetativo del hongo, incluyendo las esporas y evitar una posible contaminación en el tratamiento posterior. Las concentraciones de metabolito extraído empleadas para los tratamientos fueron 12,5%, 25%, 37,5% y 50%.

4.3.3 Indicador biológico: *Leucaena leucocephala*

Las semillas de la planta *Leucaena leucocephala* se les hizo una pequeña incisión donde se supone está el cotiledon, ya que esta semilla tiene una cubierta dura. Posterior a esto se realizó una desinfección, la cual consta de exponer el material en alcohol al 70% por 10 minutos,

enjuagar con agua desionizada, hipoclorito al 2% por 10 minutos, enjuague y se colocaron en cámara de humedad para su germinación.

Las semillas que mostraron viabilidad después de la prueba de germinación fueron inoculadas en el medio de cultivo.

4.3.4 Medios de cultivo

El medio de cultivo para los tratamientos se preparó con concreto residual con tamaño de partícula que pasara a través de la malla 200 de la serie de tamices Tyler, como fuente de nutrientes a una concentración de 5 g/L, agar – agar a una concentración de 6,5 g/L y filtrado extraído del hongo *Aspergillus niger* como metabolito a razones de 12,5%, 25%, 37,5% y 50%. El CR con el agar – agar fueron esterilizados a 121°C, 15 Psi por 15 minutos.

4.3.5 Tratamientos para la Simbiosis

Se emplea como fuente de nutrientes el concreto residual, se mezclan con metabolito extraído a partir de *Aspergillus niger* a concentraciones 12,5%, 25%, 37,5% y 50% y se inocula la semilla *Leucaena leucocephala* germinada. Se incluyen controles con y sin adición de concreto residual.

4.3.6 Montaje y Monitoreo de parámetros en el tiempo

El montaje se trabajó con 5 repeticiones, incluyendo los controles no inoculados, expuestos a un fotoperiodo de 12 horas luz con una intensidad lumínica de 1500 - 2000 luxes y una temperatura de 25 °C ± 2 °C por 15 días. Luego de este tiempo, se evalúa por cromatografía líquida la producción de metabolitos cómo el ácido cítrico y oxálico por *A. niger* y ácido glucónico por las raíces de *L. leucocephala* y del hongo. Para evaluar el crecimiento de *Leucaena leucocephala,* se hizo la medición de la altura, hipocotilos y epicotilos, así como el peso fresco y seco (sometidas a T° de 70 °C por 48 horas en horno) de cada plántula obtenida en los tratamientos.

Cada medición indica la cantidad de agua y nutrición de la planta, bajo las condiciones anteriormente mencionadas, en el tiempo de germinación (15 días).

Estas variables dieron nociones sobre los mecanismos de simbiosis entre la planta y el hongo. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) de una vía tomando como factor los tratamientos y como variable independiente la altura (cm) de cada plántula y se empleó la prueba de Games-Howell, con una media ($p \geq 0,05$). El paquete estadístico utilizado fue el software RStudio.

4.3.7 Determinación de ácidos orgánicos: ácido cítrico, ácido oxálico y ácido glucónico por cromatografía líquida (HPLC).

4.3.7.1 Método analítico:

La determinación de los ácidos orgánicos se realizó mediante Cromatografía líquida (HPLC), del laboratorio de análisis instrumental de la universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Previa extracción, los tratamientos que mostraron mejores valores de crecimiento (en altura): Mtt 25%+Leu, Mtt 37,5%+Leu+CR y Mtt 12,5% + CR, al igual que los controles con y sin adición de CR (Concreto Residual), se homogenizaron con agua desionizada estéril, a temperatura ambiente, con una disolución del 50%. Para ello, se pesaron en Erlenmeyer de 250 mL, aproximadamente 50 g de muestra (medio de cultivo después de incubación) y se añadió 50 mL de agua estéril. Posteriormente se homogenizaron las muestras y se filtraron a través de un filtro de 150 mm y 0,45 µm de tamaño de poro, para eliminar impurezas y su posterior análisis; el extracto del hongo también fue filtrado en las mismas condiciones. Las muestras se inyectaron directamente a un volumen de 20 µL de muestra en un cromatógrafo Agilent 1100 series, con detector UV/VIS y una columna SUPELCOGEL H, un flujo 0,5mL/min, como eluyente se empleó solución al 0,1% de H_3PO_4.

4.4 Resultados y Discusión

4.4.1 Difracción de rayos X – DRX

Las muestras de concreto residual presentan las siguientes fases: Cuarzo, calcita, wollasnotina, actinolita, albita. Las fases de la matriz cementante son ricas en silicatos de calcio, aluminosilicatos, ferroaluminatos de calcio, hidróxido de calcio y sulfoaluminato de calcio producto de la hidratación del cemento, los que contienen comúnmente elementos químicos como el Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Si, Al, K y Na, incluidos en diversos compuestos oxidados

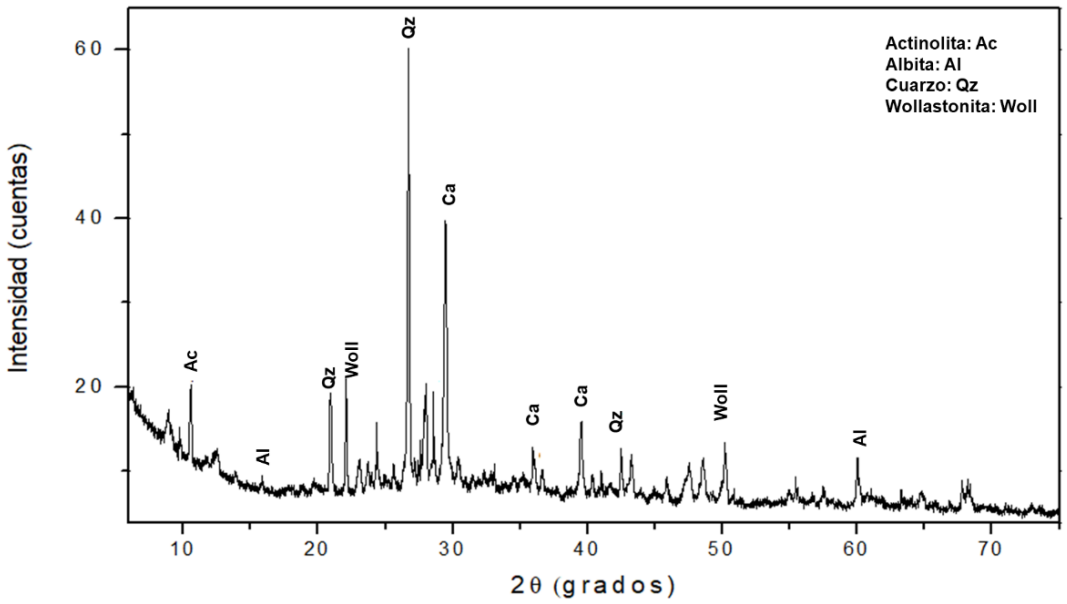


Figura 12. Difractograma de rayos X de la muestra de concreto residual

En el DRX la fase de la matriz cementante suele estar enmascaradas por los minerales presentes en los agregados dada su mayor cantidad y grado de cristalinidad.

4.4.2 Crecimiento de plántulas

Un efecto positivo de interacción sobre el crecimiento de la plántula *L. leucocephala* fue generado por la adición de concreto residual (CR), y metabolitos que fueron extraídos de *A. niger* como se observa en la Figura 13. Las plántulas que crecieron solo con adición de metabolitos (Mt) a razón de Mt 12,5%, Mt 25%, Mt 37,5% y Mt 50% presentan un crecimiento escaso y lento con valores de crecimiento entre 21,1 cm y 25,9 cm, mientras que los tratamientos que contenían adición de CR, alcanzaron valores de crecimiento entre 23,2 cm hasta 45,5 cm respectivamente. Así mismo, se identificaron efectos de interacción entre las dosis de metabolitos adicionada en los tratamientos con CR, teniendo que con una adición del Mt50%+CR, presenta una inhibición de crecimiento en la plántula, siendo la concentración del Mt12,5%+CR la óptima para esta prueba. Con respecto a los controles, se puede evidenciar que la plántula tiene un efecto positivo en su crecimiento al adicionarle concreto residual, pues las raíces de las plantas también pueden liberar humus y/o ácidos orgánicos que permitan la liberación de partículas minerales al variar el pH activando directamente la cinética de disolución.

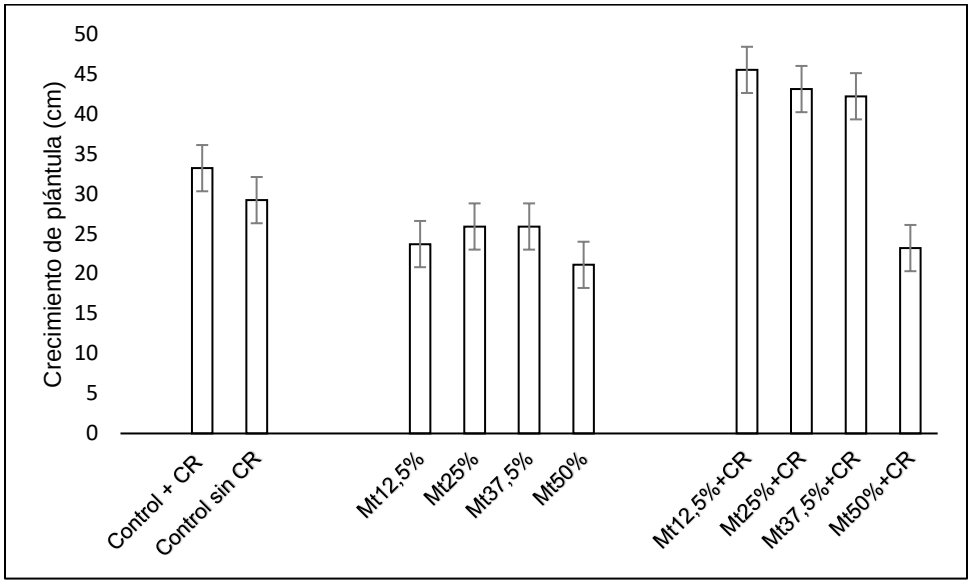


Figura 13. Crecimiento de plántula *Leucaena leucocephalfa In vitro* luego de 15 días de inoculación con metabolitos (Mt) extraídos de *A. niger* (12,5%, 25%, 37,5% y 50%) y concreto residual (CR) 0 y 5 g/L. P=0,2675 (P≥0,05).

En cuanto a la varianza con respecto al promedio, se evidencia que no hay diferencias significativas entre los grupos, sin embargo, si se analizan por separado, se observa que el CR tiene una incidencia en el crecimiento de la planta, con respecto al tratamiento que no se le adicionó CR. También se infiere que los elementos liberados del concreto si son asimilados por las plántulas para su crecimiento y desarrollo, solo el tratamiento Mt50%+CR fue diferente a las de su grupo, puede deberse a la acidez en el medio pues la cantidad de metabolito adicionada es la más alta, teniendo a un pH ligeramente ácido.

La interacción de la planta, con el concreto residual y los metabolitos del hongo, demuestran que los elementos liberados del concreto si son asimilados por las plantas para su crecimiento y desarrollo.

La sola adición de metabolito extraído hace que la plántula no desarrolle su crecimiento de manera eficaz, esto puede deberse a la ausencia de una fuente nutritiva, como lo es el concreto, pues el hongo no tiene como proveerle a la plántula minerales y nutrientes esenciales como el P y Ca, para su crecimiento, y por ende formar un “suelo” a partir de la meteorización que es la base de la simbiosis y del ecosistema biológico. Un modelo básico de interacción entre la planta y el hongo, consistente mínimo en la liberación de recursos orgánico e inorgánicos, a partir de una fuente mineral, para mejorar el ciclo de nutrientes y por ende el desarrollo vegetal.

También es importante resaltar que solo la adición de concreto no logra un incremento significativo en el crecimiento de las plántulas.

Otro factor importante es el pH, y como lo evidencia la Figura 14, este tiende a la acidez en los tratamientos donde solo se adicionó metabolito en concentraciones de Mt12,5%, Mt25%, Mt37,5% y Mt50%, los cuales solo alcanzaron un pH máximo de 5.

Como lo demostró Mejía, 2017, el pH puede ser regulado y neutralizado con la adición de residuos de concreto y actuar como fuente de nutrientes, tales como calcio y silicio, los cuales permiten un establecimiento vegetal.

La Figura 14. Presenta el pH del medio, dónde inicialmente es de 6,5, se torna ácido con la adición de los metabolitos extraídos a partir de *A. niger*; pero al adicionarle el concreto residual (CR), aún en presencia de estos ácidos orgánicos, este aumenta y tiende a la neutralidad, alcanzando valores de 7 (neutro), cuando se adiciona metabolito a una concentración de Mt12,5%; también se evidencia esta corrección de pH en el medio control con adición del concreto residual, pues se inicia con un pH de 6,5 y finaliza con un pH de 8.

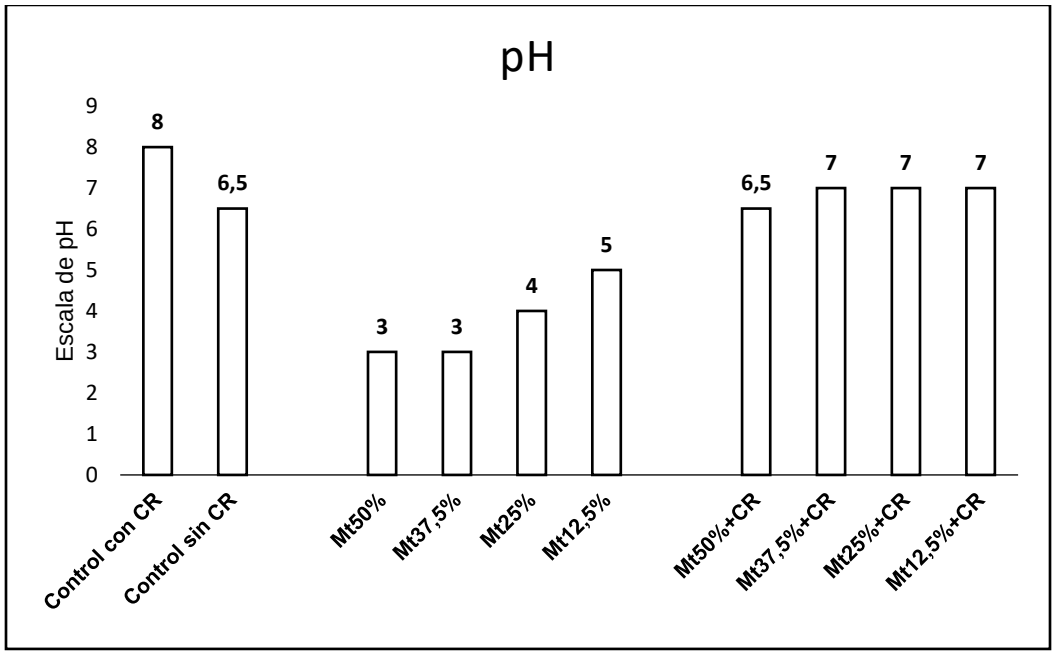


Figura 14. Escala de pH en los diferentes tratamientos luego de 15 días de inoculación con metabolitos (Mt) extraídos de *A. niger* (12,5%, 25%, 37,5% y 50%) y concreto residual (CR) 0 y 5 g/L.

La acidez en los suelos dificulta el crecimiento óptimo de las plantas, pues puede deberse a deficiencia de varios nutrientes (Ca, Mg, H_2PO_4) y al exceso de otros con propiedades tóxicas

(Mejía et al., 2016), es por ello que las plántulas donde solo tenían metabolito y no concreto residual, el crecimiento estuvo limitado, con respecto a las que sí tuvieron adición del CR, pues el pH del medio es fundamental para la absorción de nutrientes por las plantas.
Está claro que el concreto residual (CR) puede neutralizar el pH del medio; sin embargo, la interacción del CR con los ácidos orgánicos del hongo, pueden mejorar aún más la disolución de los minerales atrapados en el concreto y hacerlos disponibles para la nutrición de las plantas y permitir un establecimiento vegetal (Mej et al. 2017).

En las figuras 15, 16 y 17 se puede diferenciar los efectos que la interacción de los metabolitos generados, tales como los ácidos cítricos, oxálico y glucónico tienen efecto sobre el crecimiento de las plantas de *L.leucocephala;* teniendo efecto significativo cuando se llevó la homogenización entre estos metabolitos a partir del hongo y el concreto residual para formar una relación simbiótica con las raíces, las cuales ayudan a absorber nutrientes minerales a cambio de fuentes de carbono para el desarrollo del hongo.
El concreto residual al ser una roca artificial compuesta por minerales como silicato de calcio hidratado (C-S-H), hidróxido de calcio (portlandita), carbonatos, entre otros, pueden ser disueltos por ácidos orgánicos, tales como el ácido cítrico, producidos por *Aspergillus niger*. Este ácido, juega un papel importante en los procesos de meteorización y disolución de minerales secundarios como los aluminosilicatos tanto en suelos como en las estructuras urbanas (Gadd et al. 2007; Gadd et al., 2014; Mejía et al., 2019).
Mejía, 2017; encontró que el concreto residual al entrar en contacto con microorganismos, como el *Aspergillus carbonarius* libera elementos como Ca y Si al suelo, que luego son absorbidos por la planta en incorporados en sus tejidos, esto debido a la generación de ácidos orgánicos por parte del hongo. De esta forma, los protones (H^+) generados permitieron la disolución de estos minerales.

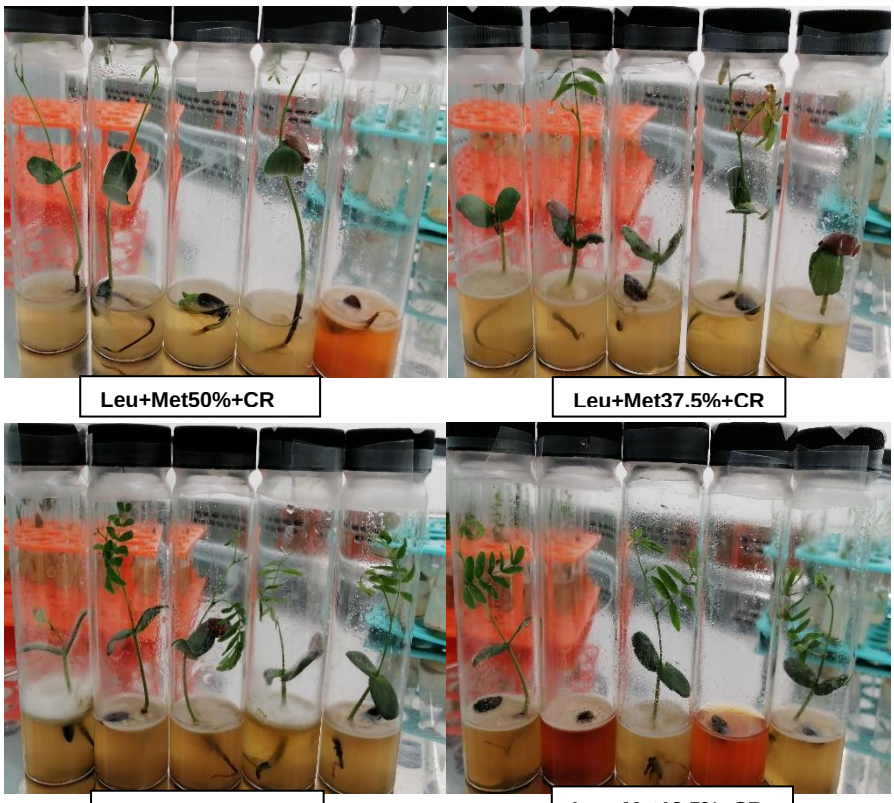
4.4.3 Observación macroscópica de plántulas

Se observó mejor interacción de la plántula *L.leucocephala* con adición de concreto residual (Mt12,5%+CR , Mt25%+CR, Mt37,5%+CR, Mt50%+CR) que las plántulas que no la tuvieron (Mt12,5%, Mt25%, Mt37,5%, Mt50%). De esta manera se interpreta que los metabolitos del hongo solubilizan los minerales presentes en el concreto residual adicionado, como se demostró en el capítulo anterior, como ocurrió con el Calcio, silicio y fósforo. También se ve una mejor nutrición de la plántula y sistema radicular en esta interacción, corroborando el hecho de que el concreto, al ser un sustrato rico en minerales como silicatos de calcio, hidróxido de calcio y

carbonatos, entre otras y al entrar en contacto con ácidos orgánicos biogénicos producidos por el hongo, pueden ser disueltos en el medio y luego absorbidos por las plántulas permitiendo su nutrición y establecimiento.

Leucaena leucocephala*+CR** ***Leucaena leucocephala

Figura 15 . Controles. Izquierda: . Indicador biológico *Leucaena leucocephala* con adición de CR. Derecha: *L.leucocephala* sin adición de CR



Leu+Met50%+CR **Leu+Met37.5%+CR**

Leu+Met25%+CR **Leu+Met12,5%+CR**

Figura 16. Tratamientos con adición de concreto residual (5g/L) y metabolito extraído a partir de *Aspergillus niger* a razón de 50%, 37,5%, 25% y 12,5% respectivamente. Indicador biológico *Leucaena leucocephala*

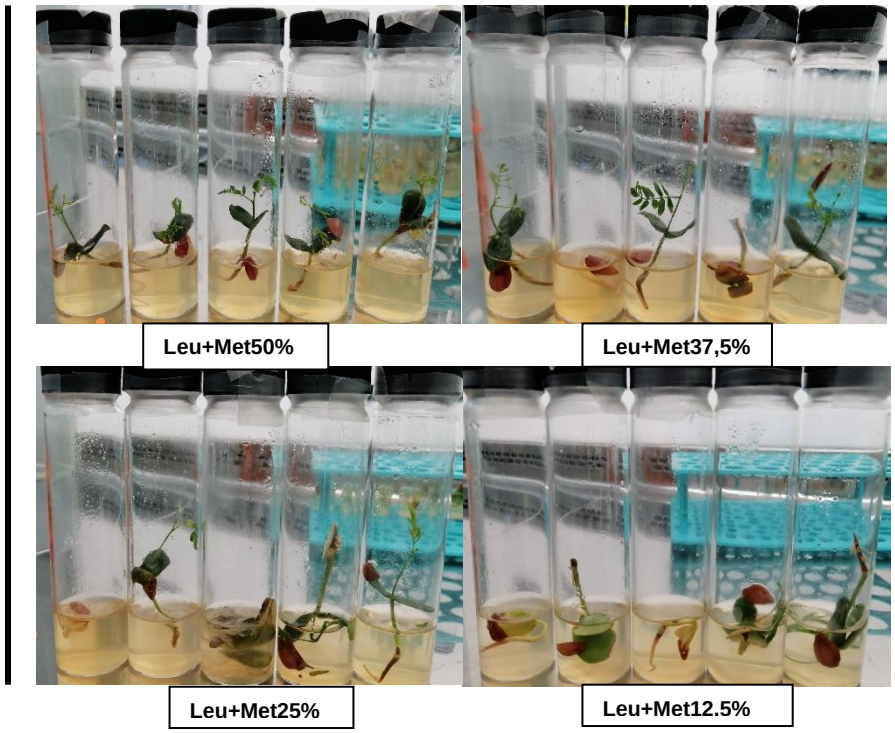


Figura 17 . Tratamientos con metabolito extraído a partir de *Aspergillus niger* a razón de 50%, 37,5%, 25% y 12,5% respectivamente sin adición de concreto residual. Indicador biológico *Leucaena leucocephala*

Entre los ácidos producidos, se encuentra primero el ácido oxálico. *Aspergillus niger* lo sintetiza a partir de la ruta de la glucólisis por la conversión del oxaloacetato formado directamente a partir del piruvato en oxalato y acetato, la ruta metabólica de la glucólisis es iniciada por la degradación de la glucosa proveniente de la fotosíntesis de la planta; el ácido oxálico se produce cuando el pH del medio es casi neutro y su papel fundamental, es reducir el pH del medio para evitar crecimiento de organismos competidores, como las bacterias (Walaszczyk et al., 2018). También, puede generarse sales de oxalato u oxalato de calcio, las cuales surgen por efectos de complejación y disolución de minerales y metales mencionados, causando daño físico por el

agrietamiento por expansión de los biominerales de oxalato secundarios, descamación, eflorescencias y manchas en el concreto (Geoffrey Michael Gadd et al., 2014).

Cuando el pH se encuentra ligeramente ácido, se genera el ácido cítrico el cual, se hidroliza liberando protones, estos protones reaccionan con los carbonatos, portlandita y C-S-H dejando el Ca en solución. Mejía (2017) concluye, como se muestra en la cinética, que en general se podría decir que el ácido cítrico reacciona con el calcio, carbonatos y silicatos (compuestos altamente insolubles) para producir sales (altamente solubles) y sus respectivas especies libres (en solución). Cinética de disolución. Tomada y modificada de Mejía et al. 2017.

$$\text{Ácido orgánico} + (\boldsymbol{Carbonatos, CH, CSH})_{\boldsymbol{muy\ insoluble}} \rightarrow \boldsymbol{Sales\ de\ calcio}_{\boldsymbol{muy\ solubles}} \rightarrow \boldsymbol{Ca^{2+}} + \boldsymbol{H_4SiO_4}_{\ (\boldsymbol{en\ solución})}$$

Para que la simbiosis pueda ser completa, entre raíces y el hongo; se tiene que los exudados radicales provenientes de las plantas, como el ácido glucónico, son fuente de carbono y energía para diversos microorganismos, necesario para la síntesis de moléculas y metabolitos. El mecanismo de aprovechamiento del gluconato o ácido glucónico es muy parecido al de la glucosa, debido a que esta deriva directamente de este azúcar y están implicadas muchas enzimas comunes. Además, debido a que el gluconato es fuente de carbono como de energía su metabolismo dependerá de los requerimientos del microorganismos en un momento dado (Leyva et al. 2006).

Como lo reporta Mejía et al. 2019, el efecto sinérgico generado por el concreto, las plantas y los microorganismos es complejo y los sistemas implicados en él son muy diversos. Por tanto, la superficie del concreto (roca artificial) está colonizada por el hongo, lo que reduce el pH en la superficie y facilita la disponibilidad de nutrientes como Ca y Si. Las raíces de las plantas crecen y liberan compuestos carbonáceos al sustrato circundante, y estos compuestos son utilizados por los microorganismos que habitan estas matrices minerales. De esta manera, esta interacción afecta la estabilidad de la estructura del concreto, porque estos microorganismos (por ejemplo, *A. niger*) producen acidez que conduce a la disolución de algunos minerales contenidos en el concreto. Los nutrientes que quedan en la solución permiten la deposición de material orgánico (desechos vegetales) y permiten el establecimiento de la planta.

Esto sucede mediante la producción de ácidos orgánicos, tanto del hongo como del sistema de raíces de las plantas, permitiendo la formación de la fase denominada “mineralósfera” por (Uroz et al. 2015), siendo esta una fuente de nutrientes tanto para microorganismos como para las plantas. Es importante señalar que el establecimiento y desarrollo de plantas en estructuras

urbanas induce la propagación de microgrietas en el concreto, facilitando así la entrada de agua y generando condiciones favorables para el biodeterioro (Mejía et al. 2019).

Durante la formación del suelo, a partir de rocas y minerales, la meteorización continua que se produce en la mineralosfera, provocada por la interacción planta-microorganismo, permite la formación de nuevo “suelo” y por tanto la rizosfera del suelo. En el modelo propuesto mostrado en la Figura 18, el papel del hongo *A. carbonarius* fue proporcionar nutrientes solubles (Ca, P, Si, etc.), y de esta manera favorece el desarrollo y establecimiento de las plantas en estructuras urbanas (Mejía et al., 2019). El resultado mostró que las plantas que se establecen en estructuras urbanas se encuentran comúnmente donde está presente la familia *Asteraceae*. Este tipo de plantas parece adaptarse fácilmente a condiciones adversas debido a la asociación sinérgica con microorganismos (Figura 18).

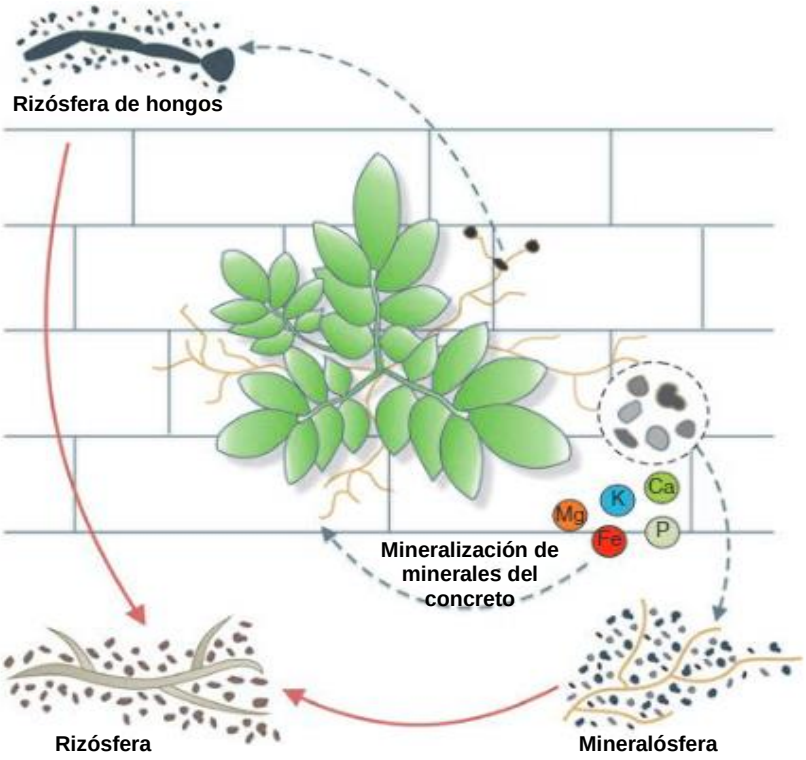


Figura 18. Dibujo de una planta superior creciendo sobre una estructura de concreto. Tomado y modificado de (Mejía et al. 2019), dónde las raíces de las plantas exudan compuestos carbonosos que promueven el crecimiento de la población microbiana en la matriz mineral.

4.4.3 Cromatograma ácidos orgánicos: glucónico, oxálico y cítrico.

El cromatograma para los espectros de los ácidos orgánicos se pueden observar en la figura 19 resultante de cada tratamiento evaluado.

De manera experimental, se pudo identificar que *Aspergillus niger* y las raíces de *Leucaena leucocephala* son capaces de producir ácidos orgánicos tales como el glucónico, cítrico y oxálico principalmente, los cuales producen daños químicos en las estructuras.

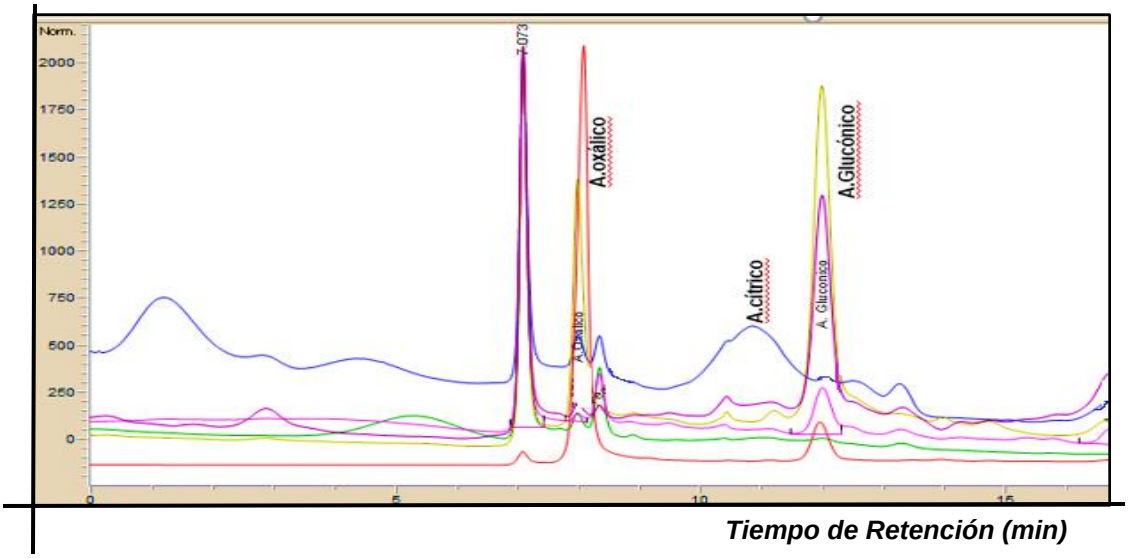


Figura 19. Superposición de cromatogramas obtenidos de los ácidos orgánicos (mg/L) según tratamiento.

Aspergillus niger, produce principalmente los tres ácidos orgánicos (cítrico, oxálico y glucónico), en concentraciones de 39,82 mg/L (cítrico), 1206,68 mg/L (oxálico) y 613,61mg/L (glucónico), y el pH es uno de los factores más importantes que influyen en este proceso.

En cuanto al control 1, dónde se inoculó la planta *Leucaena Leucocephala* en un medio de cultivo de soporte (agar base), se presenta que las producciones de los ácidos orgánicos se dan en el orden: cítrico 9,33 mg/L, glucónico: 5,01 mg/L y oxálico: 2,03 mg/L.; las raíces de las plantas también generan ácidos orgánicos, entre ellos en mayor proporción el glucónico; el ácido glucónico es derivado de la glucosa, resultado de la fotosíntesis; este a su vez es impulsado por la energía de la luz del sol, se crean moléculas de glucosa a partir del agua y el dióxido de carbono; el carbono, proporciona a los microorganismos una fuente de carbono orgánico y energía (Michel et al.1998). Lo mismos sucede con el tratamiento dónde se adicionó metabolito al 25% (Mt25%), se presenta la concentración de ácidos orgánicos en el siguiente orden: cítrico 8,65 mg/L, glucónico: 147,10 mg/L y oxálico: 19,30 mg/L, siendo mayor en concentración, el

ácido glucónico, todos los ácidos generados se acumulan en el medio al estar ausente la fuente de minerales.

En cuanto al control 2, dónde se expuso la planta *Leucaena Leucocephala* en un medio de cultivo de soporte (agar base) con suplementación de concreto residual (CR), se presenta que las producciones de los ácidos orgánicos se dan en el orden: cítrico 2,30 mg/L, glucónico: 3,25 mg/L y oxálico: 1,11 mg/L, concentraciones menores que en el control 1, esto puede deberse al uso estos ácidos para ir liberando los nutrientes presentes en el concreto residual.
En cuanto a los tratamientos donde se adiciona metabolito a razón del Mt37,5% y Mt12,5%, con la semilla germinada de *L. leucocephala,* se presenta la concentración de ácidos orgánicos en el siguiente orden, el tratamiento que tiene mayor concentración de metabolito Mt37,5% presentó concentraciones de los ácidos orgánicos así; oxálico (0,72mg/L), cítrico (5,52mg/L) y glucónico (309,11mg/L) relacionada en la figura 12 y el que se le adicionó Mt12,5% de metabolito extraído de *A. niger,* da como resultado oxálico (0,53mg/L), cítrico (no se detectó) y glucónico (22,001mg/L), en el cual no se evidencia producción ni mantenimiento del ácido cítrico.
El cambio de concentración de ácidos orgánicos de cada medio puede deberse a la cantidad de nutrientes disponibles para solubilizar en el medio, es decir, mientras el hongo no tenga una fuente nutritiva inorgánica para alimentarse, se van a cumular los ácidos en el medio de cultivo. Esto se evidencia en el medio que contiene el metabolito al Mt25%, ya que presenta las mayores concentraciones con respecto a los otros tratamientos, en el orden de cítrico:8,65mg/L – oxálico:19,30 mg/L y glucónico:147,10 mg/L; mientras que en los tratamientos dónde se encuentra el concreto residual en solución, las cantidades de ácidos orgánicos disminuyen pero el crecimiento de la planta se ve favorecido en la interacción, como se puede ver figura en la figura 9, las concentraciones se muestran así: en el medio con adición Mt37,5% y CR: presenta en el orden cítrico: 5,52 mg/L – 0,72 mg/L oxálico y 309,11 mg/L de glucónico, hay que recordar que el ácido glucónico, es considerado una fuente de carbono y energía, que el hongo almacena como reserva para su metabolismo; por ellos, los valores son más altos.

4.4.4 Mecanismo ácido oxálico, cítrico y glucónico.

La medición de los ácidos se realizó 15 días después de incubación y se encontró que el ácido oxálico, es un ácido fuerte, este se sintetizó en un pH neutro o ligeramente ácido para bajar el pH en el menor tiempo posible, este se agota y prepara el medio para que el ácido cítrico sea secretado, con propiedades amortiguadoras para mantener el pH ácido; es por ello, que al realizar la cuantificación se encontró mayores concentraciones de ácido cítrico. La producción

de ácido glucónico, es óptima a un pH de 5,5 y no tiene como objetivo acidificar el medio sino almacenar glucosa, como gluconato, creado por el mismo *A. niger* como fuente de carbono y energía para producir los otros ácidos orgánicos.

El ácido oxálico $(COOH)_2$, o más comúnmente sus sales de oxalato, es el compuesto más oxidado después del CO_2 es un diácido orgánico. Este ácido puede tener un papel importante en la meteorización biológica, debido a los efectos de complejación y disolución de los metales sobre los minerales (Gadd et al., 2014). También puede ocasionar daño físico causado por la formación expansiva de los minerales de oxalato secundarios (Gadd et al., 2014). La formación de oxalatos de calcio mediada por hongos, es un fenómeno bien conocido, que resulta principalmente de la acción del ácido oxálico ($C_2H_2O_4$) durante la diagénesis (procesos de formación de una roca a partir de sedimentos, tales como compactación, recristalización y cementación) de los cálculos de carbonato fúngicos contribuyen al biodeterioro, como resultado de la precipitación del carbonato de calcio, sustrato presente en las superficies de monumentos y estructuras urbanas (Tiago & Gil, 2020).

La disolución del carbonato de calcio mediada por el ácido oxálico y la formación siguiente de oxalatos de calcio puede aumentar la cantidad de CO_2 en el sitio, lo que promueve la recristalización de la calcita en las superficies de la caliza. En su estudio Tiago y Gil (2020), describen los procesos de biomineralización fúngica, en un conjunto de reacciones que llevan a la formación de oxalatos de calcio en la reacción (1) y carbonatos por la reacción (2). Además, la precipitación simultánea de oxalatos de calcio derivada en la reacción (3); en las ecuaciones a continuación, se evidencia el proceso:

$$Ca^{2+} + 2CH_3COO^- + 2H^+ + C_2O4^{2-} + nH_2O \rightarrow CaC_2O_4\,.nH_2O_{(s)} + \ 2CH_{4(g)} + 2^{CO_2\,(g)} \quad (1)$$

$$Ca^{2+} + H_2\,O + CO_2 \rightarrow CaCO_{3(s)} + H_{2(g)} \quad (2)$$

$$2Ca^{2+} + 4CH_3COO^- + 2H^+ + C_2O4^{2-} + 3H_2O + CO_2 \rightarrow CaC_2C_4\,.2H_2O_{(s)} + CaCO_{3(s)} + 4CH_3COOH_{(aq)} \quad (3)$$

Los oxalatos de calcio se han implicado en la movilización de Fe, Si, Mg, Ca, K y Al, así como de otros elementos, por ejemplo, rocas como: arenisca, basalto, granito, rocas calcáreas y silicatos,

lo que provoca alteraciones en el sustrato y otras formaciones minerales secundarias (Tiago & Gil, 2020). Además, el oxalato de calcio tiene influencia en los procesos biogeoquímicos del suelo, actuando como reservorio de calcio e influenciando la disponibilidad de fosfato, donde se elimina el Ca de los minerales que contienen P (Tiago et al. 2020).

En este sentido se sugiere que los hongos, como *A. niger* pueden excretar ácido oxálico y oxalatos, este ayuda a la adquisición de P por el hongo y la planta a través de la meteorización biológica como resultado de la solubilización de Fe y Al (Tiago et al. 2020). Esto se pudo evidenciar en las soluciones ácidas con *Aspergillus niger* y cilindros de concreto

Por otro lado, otro efecto en el biodeterioro causado por hongos tiene que ver con las sales orgánicas de calcio resultantes de la reacción entre el carbonato de calcio con ácido oxálico liberado por los mismos como son: la whewellita (oxalato de calcio monohidratado) y la wheddelita (oxalato de calcio dihidratado), las cuales producen eflorescencias en las superficies de los monumentos pétreos causando una costra poco atractiva estéticamente (Quintero et al. 2012).

En síntesis, el ácido oxálico puede mediar la acidólisis, que surge del H^+, la disolución y movilización reductora de metales minerales (Tiago et al. 2020).

El otro producto resultante de la actividad metabólica, es el ácido cítrico, quién también se ha estudiado por su capacidad de inducir el biodeterioro vía bioacidulación. En su investigación Mejía et al. 2019, describe los pasos de reducción mediada por el hongo *Aspergillus carbonarius*, los cuales constan: (I) el ácido orgánico producido por *A. carbonarius* se hidroliza liberando protones, (II) estos protones reaccionan con la portlandita y carbonatos, porque tienen mayor solubilidad y deja el calcio en solución; (III) Los protones reaccionan con el C-S-H dejando Ca y Si en solución. Todas estas reacciones suceden en medio ácido, donde el hongo reduce el pH por los ácidos orgánicos generados y favorece la disolución del cemento. Las reacciones se presentan a continuación:

$$\mathrm{CaCO_3 + 2H^+ \rightarrow Ca^{2+} + CO_2 + H_2O \ = Calcita}$$
$$\mathrm{Ca(OH)_2 + 2H^+ \rightarrow Ca^{2+} + 2H_2O = Portlandita}$$
$$\mathrm{C-S-H + H^+ \rightarrow Ca^{2+} + SiO_2 + H_2O \ = C-S-H}$$

Se puede decir que, en el cemento portland, el ácido orgánico reacciona con la portlandita, carbonatos y silicatos de calcio, estos contienen compuestos altamente insolubles para producir sales altamente solubles y sus respectivas especies libres en solución (Mejía et al. 2019). Y concluye Mejía (2019) que, *A. cabonarious* desarrolla acción simbiótica con la biosfera y el

concreto, y permite: 1. Disminución del pH y 2. Aumento del Ca y Si en soluciones, alimento para la planta. A cambio el hongo obtiene energía a través de la fotosíntesis de planta.
En la fotosíntesis se genera glucosa, y el ácido glucónico es derivado del metabolismo de la glucosa, siendo este otro ácido capaz de reaccionar con el carbonato de calcio que conforma la roca artificial, para producir una sal cálcica soluble junto con el ácido carbónico correspondiente. De los ácidos mencionados el glucónico es el más comúnmente excretado por hongos, además de otros que se liberan en menor medida tales como el ácido málico, succínico e itacónico (Quintero et al. 2012)

4.5 Conclusiones

1. Se encontró que la cantidad de ácidos orgánicos en el medio se diferencian en el momento en que la fuente de nutrientes (concreto residual) está disponible en el medio, pues cuando se adiciona el concreto residual, la concentración de ácidos orgánicos disminuye, lo que sugiere que se emplean para la solubilización de minerales del concreto y posterior disponibilidad en el medio y la planta lo tenga disponible para su crecimiento; entre tanto, no se encuentre en el medio el concreto residual, los ácidos orgánicos se generan y se acumulan en el medio de cultivo, producto del metabolismos del hongo

2. El hongo *Aspergillus niger* produce ácidos orgánicos como el cítrico y oxálico que le confiere una competitiva y de supervivencia, ya que al secretar estas sustancias se facilita la adhesión en los sustratos ricos en Ca y Si como es el concreto residual.

3. La interacción entre las plántulas y *A. niger* (simbiosis) presentó un mayor éxito en los tratamientos, debido a las necesidades de adquirir nutrientes provenientes del concreto, evidenciado un intercambio de la glucosa como fuente de carbono y energía y disolución de nutrientes a partir de los ácidos cítrico y oxálico.

4. En esta investigación, el éxito de meteorización del concreto por parte de *Aspergillus niger*, fue su capacidad de asociarse simbióticamente con plantas fotosintéticas, los cuales, en interacción, fueron responsables de las transformaciones y distribución de nutrientes inorgánicos como el fósforo.

CAPÍTULO 5. MECANISMOS DE ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA EN INVERNADERO GENERADOS ENTRE *Aspergillus niger* Y *Leucaena leucocephala* CON FUENTE DE NUTRIENTES DE CONCRETO RESIDUAL.

5.1 Resumen

Los problemas críticos de la degradación del suelo y la desertificación, amerita que se apliquen más procesos de meteorización con enfoque para la recuperación de suelos y la gestión de recursos roca y minerales (Lopez et al. 2020). Los hongos son organismos que están presentes en ambientes del suelo y el subsuelo, y a menudo se convierten en un grupo dominante en hábitats ricos en metales. Su capacidad de crecer en ambientes bajos en nutrientes, con crecimiento filamentoso exploratorio y sus estrategias de crecimiento flexibles y su resistencia a factores extremos, los convierten en colonizadores exitosos de superficies rocosas ricas en minerales (Gadd et al. 2007). También, son agentes importantes del biodeterioro de la piedra, cemento, concreto y otros materiales de construcción (Geoffrey M. Gadd, 2007; Wei et al., 2013). La meteorización de rocas y minerales por hongos se produce a través de ataques biomecánicos y bioquímicos por la producción de ácidos orgánicos (Gadd et al. 2007).

El objetivo de esta investigación, es conocer la meteorización de y nutrientes a partir de una fuente de concreto residual mediada por la simbiosis entre *Aspergillus niger* y *Leucaena leucocephala* en un suelo degradado. El suelo y el concreto residual se tamizaron a un tamaño de partícula de 4 mm para el suelo y el concreto residual se pasó por una malla 30 de tamices de la serie de Tyler. Las semillas de *Leucaena leucocephala* previamente germinadas, se sometieron a diferentes tratamientos de suelo con adiciones de concreto residual (50 g/kg) y una solución preparada de esporas y micelio de *Aspergillus niger* (5 mL/L) por cada 500 g de suelo. El montaje se realizó con tres repeticiones de cada tratamiento por 90 días; una vez cumplido este tiempo, se cuantificó el contenido nutricional del suelo y el crecimiento de las plántulas en altura. Se puede concluir que la sola adición de concreto residual mejora las propiedades físicas del suelo, pero al adicionarle *A. niger* junto con el concreto residual, se promueve mucho mejor el crecimiento, alcanzando alturas hasta 26,9 cm mostrando el efecto sinérgico entre *L. leucocephal y A. niger* con respecto al suelo sin ninguna adición que mostró alturas hasta 13,5 cm y desnutrición de la planta evidenciada por su coloración amarillenta al final de la experimentación. En cuanto a la composición química, se cuantificó el P, Ca, Mg, Mn y Cu

mostrando una mejor relación en las muestras con suelo, adición de concreto residual y micelio de *Aspergillus niger.*

5.2 Introducción

La mayoría de las plantas dependen del suelo, pero las plantas y sus microorganismos asociados juegan un papel crucial en la formación o modificación del suelo (Lambers et al., 2009). Un suelo es el resultado de la meteorización de rocas y minerales, y puede tener varias propiedades, según el origen del material parental, el clima y la vegetación (Lambers et al., 2009).

Por otro lado, el concreto es el material más usado en la industria de la construcción, debido a sus propiedades mecánicas y acabados. Está conformado básicamente por cemento (caliza y arcilla calcinadas más yeso), agregados (árido fino y grueso) y agua. Siendo importante anotar que la composición química y mineralógica del concreto son similares a las de los suelos y, por tanto, pueden ser usados como fuentes nutritivas en procesos de restauración de suelos urbanos degradados, mejorando las propiedades físicas, químicas y biológicas (Mejía et al. 2017; Mejía et al., 2016). Este contenido nutritivo y las velocidades de disolución son variables en las superficies minerales como las del concreto, pueden considerarse como interfaces reactivas donde los cationes nutritivos son potencialmente accesibles a la biósfera (Stephane Uroz et al., 2015).

La presencia de organismos y microorganismos de origen vegetal o animal sobre las estructuras de concreto, no solamente pueden afectar el confort ambiental y la estética de las construcciones, sino que también puede producir una gran variedad de daños y defectos de carácter físico, mecánico, químico o biológico (Cwalina, 2008; Rendon Diaz Miron & Koleva, 2017). Entre los organismos biológicos responsables del biodeterioro del concreto, los hongos juegan un papel clave dadas sus complejas actividades metabólicas, que incluyen la producción de ácidos orgánicos que ataca el concreto generando disolución, en un medio ácido y liberando Ca^{2+} y $Si^{4+,}$ dejándolo en solución, disponible para que otros organismos como las plantas superiores, puedan tomarlos y establecerse en las estructuras de concreto (Kakakhel et al., 2019; Mejía et al. 2017; Mejía et al., 2019). Siendo, estas rocas artificiales y sus minerales soportes físicos para la unión de los microorganismos y plantas, con reservas nutritivas que participan en el ciclo de nutrientes y fertilidad del suelo (Stephane Uroz et al., 2015). Estas interacciones en los sustratos rocosos, es promovida por los compuestos de carbono producidos por las plantas que sirven como fuente de carbono y energía para los microorganismos, los cuales a cambio le proporcionan

a la planta nutrientes disueltos (Lopez et al. 2020), como Ca, P y Si a partir de minerales primarios, como los que tienen el concreto, y por tanto, promueven el crecimiento de las plantas. Este trabajo analizó el cambio de las propiedades fisicoquímicas de un suelo degradado antrópicamente, mediante la adición de concreto residual (50 g/kg) y esporas de *Aspergillus niger* (5 ml/L). Se evaluó el crecimiento de la planta *Leucaena leucocephala* en los diferentes tratamientos y se analizó la composición química del suelo con adición de concreto residual y sin adición de este.

5.3 Materiales Y Métodos.

Para el cumplimiento del objetivo específico 3, se determinaron los mecanismos de asociación simbiótica en invernadero generados entre *Aspergillus niger* y *Leucaena leucocephala* con fuente de nutrientes de concreto residual.

5.3.1 Suelo y concreto residual

El suelo tomado de un proceso de vías que estaban construyendo en el municipio de La Pintada, la muestra corresponde a un suelo degradado por el movimiento de tierra para la generación de las vías, lo cual degrada el suelo por compactación o erosión. Este suelo cuenta con un pH de 6,41. El suelo fue tamizado a 4 mm.

Así mismo, las muestras de concreto residual (CR) cedidas por el laboratorio LEACCEM, del Centro para el Desarrollo del Hábitat y la Construcción, del Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Regional Antioquia; fueron sometidas a procesos de trituración y molienda con el fin de obtener una distribución de tamaño de partícula, pasante malla 30 retenido 200 de la serie de tamices Tyler.

5.3.2 Agente mineralizador: *Aspergillus niger*

La solución fue preparada con un volumen fijo de 50 mL/L y una concentración de $1x10^7$ unidades formadoras de colonias (UFC), fueron adicionadas en los tratamientos de suelo a razón de 5 mL/L.

5.3.3. Análisis de suelo

Se realizó análisis físico y químico del suelo en laboratorio de Tecnoacademia –SENA Medellín, donde se midieron los siguientes parámetros: pH y máxima capacidad de retención de agua (MCRH).

5.3.4 Medición de pH

Se trasfirieron 10 g de suelo seco a vasos plásticos y se adicionaron 20 cm^3 de agua destilada o desionizada, se agitó por un minuto y se dejó reposar por 30 minutos antes de la lectura. pH: 6,4

5.3.5 Máxima capacidad de Retención de Agua (MCRH).

Se realizó en cápsulas de porcela gooch y en cámara húmeda; se pesó el suelo inicial, las muestras fueron secadas en un horno a 105 °C/24h horas. Luego, las muestras fueron colocadas en los crisoles gooch y en cámara húmeda para que el agua subiera por capilaridad durante una noche. Pasado este tiempo se extraen las muestras y nuevamente se llevan a horno a 105°C / 24h y se aplicó la siguiente fórmula:

H_2O (%): $\left(\frac{M_{s+w} - M_s}{M_{s-} M_c}\right) * 100,$

Dónde su resultado proporciona la información acerca de la MCRH del suelo a emplear y el residuo de construcción y demolición (RCD).

Porcentaje de Agua: H_2O (%): $\left(\frac{M_{s+w} - M_s}{M_{s-} M_c}\right) * 100$

$M_{s+w}: peso\ final\ después\ de\ cámara\ húmeda\ (Recipiente + agua + cápsula\ con\ sueloy\ filtro)$

$M_s: peso\ del\ suelo + cápsula + filtro$

$M_c: peso\ cápsula\ vacía$

H_2O (%): $\left(\frac{60{,}4753g - 53{,}8713g}{53{,}8713g - 39{,}8252g}\right) * 100$

H_2O (%): 47%

5.3.6 Especie vegetal: Leucaena leucocephala

Las semillas de la planta *Leucaena leucocephala* se les hizo una pequeña incisión donde se supone está el cotiledon, ya que esta semilla tiene una cubierta dura. Posterior a esto se realizó una desinfección, la cual consta de exponer el material en alcohol al 70% por 10 minutos, enjuagar con agua desionizada, hipoclorito al 2% por 10 minutos, enjuague y se colocaron en cámara de humedad para su germinación.

Las semillas que mostraron viabilidad después de la prueba de germinación fueron inoculadas en el medio de cultivo.

5.3.7 Montaje y monitoreo de parámetros en el tiempo

Se realizaron 3 tipos de tratamientos cada uno con 3 repeticiones, cada componente de las muestras fue pesado, se homogenizo y se llevó a los recipientes plásticos, con un peso final, después de cada adición de sustrato o compuesto de 500 g.

Se humedeció el suelo, con agua desioniazada, teniendo en cuenta la máxima capacidad de retención de agua (MCRH) y posteriormente se sembró las semillas de *Leucaena leucocephala,* a una profundidad aproximada de 1 cm en cada tratamiento.

La cantidad de suelo utilizada para cada tratamiento fue 500 g, variando la proporción (niveles) de los factores. Así mismo, se le agrego a cada tratamiento, concreto residual (CR) a razón de 50 g/kg y una cantidad de *Aspergillus niger* (0 y 5 mL/L), con el propósito de ayudar a la planta a tomar los nutrientes necesarios para su crecimiento, como se demostró en el capítulo de análisis *In vitro* ya que se presenta una interacción simbiótica entre el hongo y la raíz de las plantas.

Para evaluar el crecimiento de *Leucaena leucocephala,* se hizo la medición de la altura, el peso fresco y seco (sometidas a 70 °C por 48 horas en horno) de cada plántula obtenida en los tratamientos. Cada medición indicará la cantidad de agua y nutrición de la planta, bajo las condiciones anteriormente mencionadas, en el tiempo de incubación (90 días).

Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) de una vía tomando como factor los tratamientos y como variable independiente la altura (cm) de cada plántula y se empleó la prueba de Tukey, con una media ($p \leq 0,05$). El paquete estadístico utilizado fue el software RStudio.

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Observación de plantas en invernadero

Las plantas que crecieron en el suelo sin adición de concreto residual, tuvieron un desarrollo pobre a lo largo del tratamiento, con una altura promedio de 13,5 cm y un sistema radicular escaso, evidenciado cualitativamente al cabo de 30 días ya presentaban hojas amarillas, lo que indica falta de nutrientes en el suelo y poco drenaje. Por otro lado, cuando se añade concreto residual (50 g/kg) las plantas de *L.leucocephala* crecieron mucho mejor, mostrando efectos positivos de interacción alcanzando valores en altura hasta 26 cm, puede deberse a que las raíces de las plantas, generan humus y/o ácidos orgánicos que liberan algunos nutrientes que están atrapados en la porción mineral proporcionada por el concreto residual. De esta manera la planta se nutre y se establece en el suelo.

En general, los resultados muestran que la adición de concreto residual (CR) tiene un efecto positivo en las plantas en comparación con los tratamientos sin adiciones del material y también un efecto de simbiosis con el hongo *A. niger* a razón de 5 ml/L. (Figura 12). El desarrollo vegetal de las plantas de *Leucaena leucocephala* presenta un efecto muy positivo en su crecimiento al inocular concreto residual (50 g/kg) y esporas de *Aspergillus niger* (5 mL/L), figura 9**,** las plantas alcanzan alturas promedio hasta 26,9 cm.

Suelo control | **Suelo + CR** | **Suelo + CR + 5ml/L *A. niger***

Figura 19. Tratamientos en invernadero. De izquierda a derecha: Izquierda: Suelo control (antrópicamente degradado). Centro: Suelo con adición de concreto residual (50g /Kg). Derecha: Suelo con adición de concreto residual (50 g/kg) y 5mL/L de *Aspergillus niger*

Aunque no se presenta una diferencia significativa entre los tratamientos con adición de concreto residual y la combinación de CR con *A. niger*, si se muestra que la sinergia puede mejorar el desarrollo vegetal y la disponibilidad de nutrientes en el suelo; estos resultados se corroboran con el análisis químico del suelo, pues en simbiosis se equilibraron como se muestra en la figura 19. También el tiempo en que se tuvo las plantas en invernadero no haya sido suficiente para evidenciar los cambios en la altura de los tratamientos Suelo +Cr y Suelo+CR+*A. niger*.

La acidez de la muestra control inicial fue de pH 6,4 ligeramente ácido, este valor también afecta la calidad y el crecimiento de las plantas, y también las absorciones de P por las planas al adicionar concreto residual el pH aumentó hasta 8, lo que permite mayores posibilidades de nutrición del suelo y la planta.

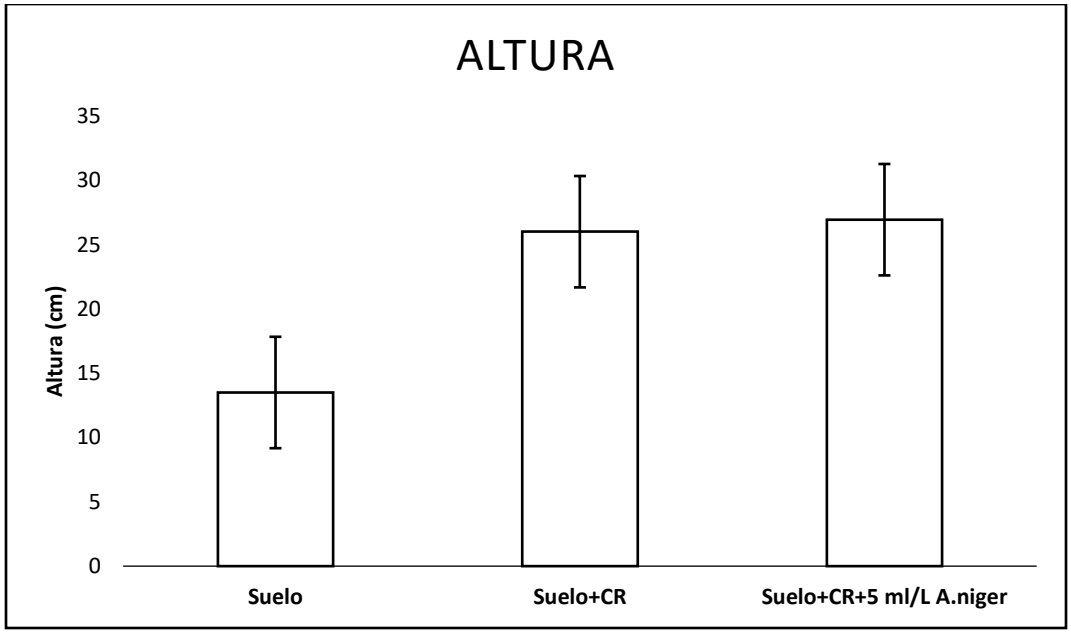


Figura 20. Crecimiento de plantas de *Leucaena leucocephala* luego de 90 días de tratamiento en suelo con adición de CR (50 g/kg) e inoculado con *Aspergillus niger* (5 ml/L). P= 0,0025 (P≤0,05)

5.4.2 Composición nutricional de los tratamientos.

El análisis fisicoquímico del suelo se realizó en ““Agrosoil lab con ciencia para el agro”, y reportan las siguientes especificaciones para la composición química en suelos.

Tabla 4. Especificaciones composición química en suelos.

COMPOSICIÓN QUÍMICA		
	Rango óptimo (mg/kg)	
	Mínimo	**Máximo**
Fósforo (P)	14,30	76,79
Calcio (Ca)	0,36	1,92
Magnesio (Mg)	0,11	0,57
Manganeso (Mn)	0,56	3,00
Cobre (Cu)	0,17	1,64

Con respecto al control (Suelo degradado), el P tiende a aumentar en cada uno de los tratamientos, en el suelo degradado el P: 15,13 mg/Kg; En el Suelo +CR el P: 18,78 mg/Kg y en el Suelo+CR+*A.niger*: 18,98 mg/kg (Figura 21), aunque no se encontraba en deficiencia (ver especificaciones en tabla 4), si se cuantificó un aumento de este elemento con la suplementación de CR y *A. niger.* El fósforo (P) es un nutriente primario, en el suelo y para la nutrición de la planta, al igual que el Nitrógeno (N) y el potasio (K), y se necesita en grandes cantidades. El hongo *Aspergillus niger* se ha informado con capacidades de solubilización de fosfatos a partir de rocas y también de promover el crecimiento de las plantas (Nascimento et al., 2021). Como ya se ha informado en la literatura, uno de los principales mecanismos que emplea *A. niger* para la meteorización de minerales, es la acidificación por medio de la producción de ácidos orgánicos, ya que promueven ataque ácido sobre el mineral. En este sentido, la producción fúngica del ácido oxálico y cítrico, como se demostró en el capítulo 4, son los responsables de la liberación del P en el medio, especialmente el ácido oxálico ($C_2H_2O_4$), seguido del ácido cítrico; ya que tiene una estructura más simple compuestas por dos grupos carboxilos, lo que aumenta el valor de la constante de disociación, haciendo de este ácido un ácido más fuerte, lo que da como resultado la alta capacidad de acidificación y mayor capacidad de solubilización del P, además de necesitarse en menor cantidad (Mendes et al., 2020).

Los nutrientes como el Ca y Mg, son requeridos en concentraciones más bajas; en los datos encontrados, se nota que inicialmente el Ca presente en este suelo está en grandes cantidades

(Control: 16,8 mg/Kg), y tiende a disminuir su concentración con las adiciones de CR y *A. niger (*Suelo+CR: 22,76mg/Kg – Suelo+CR+*A.niger*: 19,7 mg/Kg) ver figura 21. Estos mecanismos de acidificación, también pueden resultar en complejos, en el caso del Ca, generalmente resultan complejos de P/Ca son más solubles en soluciones ácidas (Nascimento et al., 2021), y por ende más disponibles para las plantas. Como ya se informó el ácido oxálico es un ácido más fuerte, y es producido por *A. niger* , este ácido también puede formar complejos muy estables con muchos metales que pueden precipitar como cristales sólidos o amorfos; el oxalato de calcio es uno de los complejos más solubles formados por el ácido oxálico y contribuye a la solubilización de apatitas al eliminar el ion Ca^{2+} de la solución mediante reacciones de intercambio de ligandos en la superficie mineral (Mendes et al., 2020). El concreto residual al ser un material con alto contenido de carbonatos, presenta un aporte importante de Calcio, siendo muy efectivo para contrarrestar la acidificación en los suelos. Adicionalmente, el Ca es necesario para mejorar la absorción de otros nutrientes, la capacidad de retención de agua y para transformar la materia orgánica.

Con el Mg se estabilizó aún más las proporciones con los suplementos de concreto residual y *A. niger* (Suelo control:12,76 mg/Kg - Suelo+CR: 6,4 mg/Kg – Suelo+CR+*A niger*: 6,55 mg/Kg), pues sus valores no deben exceder 0,57 mg/Kg, las reacciones mencionadas por los ácidos orgánicos, pudieron tener un efecto muy positivo en esta interacción. El exceso de este elemento puede ocasionar en las plantas deficiencia en el crecimiento y de otros minerales tales como Calcio (Ca) y Potasio (K). El Mg, es un nutriente esencial para realizar la fotosíntesis y síntesis de proteínas. Al igual que ocurre con el magnesio (Mg), el suelo control, presentaba un exceso de Manganeso (Mn), y al realizar las adiciones de CR y *A. niger,* mejora notoriamente el nivel de Mn en el suelo, esto puede deberse a la quelatación de los ligandos como el ácido cítrico, por *Aspergillus niger* y el glucónico por las raíces de la planta y también por el hongo, pueden secuestrar los iones Mn bajando su concentración y disminuyendo su toxicidad; el Mn, es un nutriente esencial para realizar la fotosíntesis, metabolismo, y activa el crecimiento celular y de raíces. El exceso de este elemento químico mineral puede presentar toxicidad y conduce a deficiencia de hierro, magnesio y/o calcio.

Lo mismo sucede con el cobre (Cu) que se hallaba en el suelo inicial es de 12,76 mg/kg, este valor es muy tóxico y probablemente por esto el suelo es infértil, y con las adiciones mejoró sus concentraciones a Suelo+CR: 6,4 mg/Kg y Suelo+CR+*A.niger*: 6,55 mg/Kg. Estos son requeridos en concentraciones mucho más bajas, hasta 3,00 mg/Kg el Mn y 1,64 mg/Kg el Cu. Este elemento, es esencial para la fotosíntesis, para procesos de respiración y activación de enzimas. Su fijación depende del pH del suelo y el exceso del mineral puede provocar inhibición de

crecimiento en las plantas e interferir con el proceso de fotosíntesis. El cobre también puede adsorberse a los óxidos de hierro y manganeso y precipitarse con minerales de carbonato y fosfato. Estas reacciones reducen la disponibilidad de cobre para las plantas.

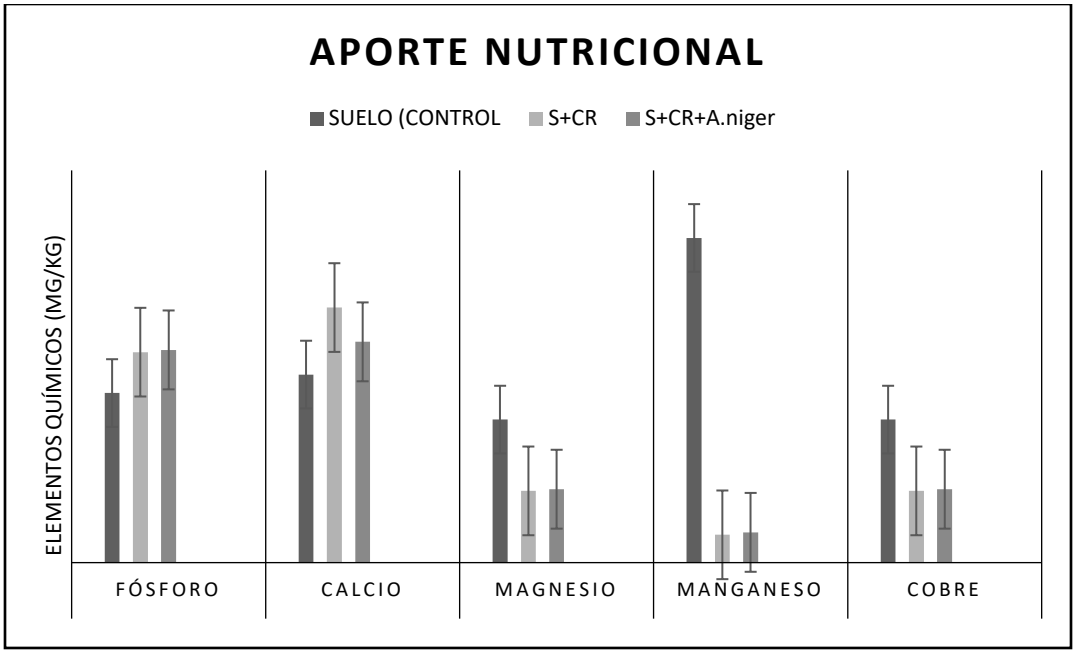


Figura 21. Aporte nutricional del suelo luego de 90 días de tratamiento en suelo con adición de CR (50 g/kg) e inoculado con *Aspergillus niger* (5 ml/L).

Cuanto mayor sea el grado de saturación de bases más posibilidades tiene el suelo para retener cationes como Ca^{2+}, K^{+}, Mg^{2+}, Na^{+}. La saturación de bases proporciona información sobre la acidez, disponibilidad de nutrientes y fertilidad del suelo en general.

POTASIO	CALCIO	MAGNESIO	SODIO
4,01 – 5,00	60,71 - 70,00	15,01 – 20,00	5,00

Tabla 5. Especificaciones saturación de bases en suelos. Tomado de informe de análisis de suelos. Laboratorio “Agrosoil lab con ciencia para el agro”.

En síntesis, los aportes de Ca y Mg, mejoraron significativamente, cuando se adicionan enmiendas como CR, las fases cementantes son ricas en Silicatos de Calcio hidratados y

Aluminosilicatos, dando aportes significativos de Si, Ca, Mg Mn, Fe, entre otros y su interacción con los ácidos orgánicos oxálico, cítrico y glucónico, ya que actúan como quelantes y también en la formación de complejos que estabilizan y mejoran las relaciones nutricionales de los elementos químicos. Es por ello que al visualizar la Figura 22, se nota que, con respecto al control el Calcio aumenta y el magnesio disminuye, mejorando su relación nutricional para el suelo. Con respecto al potasio y sodio no se evidencian cambios significativos en ninguno de los tratamientos con respecto al control.

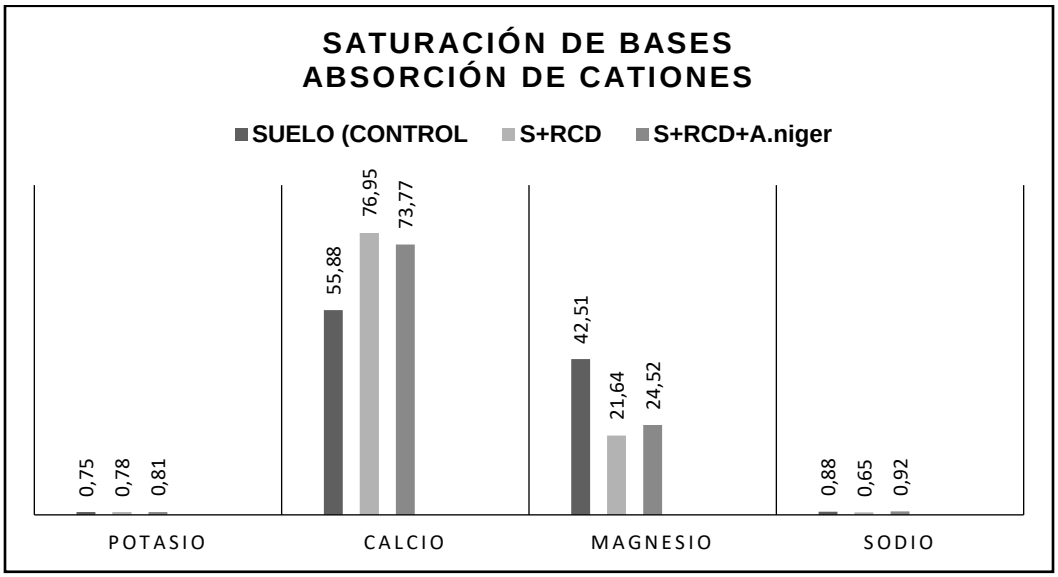


Figura 22. Saturación de bases luego de 90 días de tratamiento en suelo con adición de CR (50 g/kg) e inoculado con *Aspergillus niger* (5 ml/L).

5.5 Conclusiones

1. Se encontró que los ácidos orgánicos oxálico y glucónico están relacionados con la capacidad del hongo de solubilizar el fosforo presente en las fases cementantes y se hace más disponible el suelo y la nutrición de las plantas.

2. Al adicionar enmiendas de concreto residual el pH del suelo aumentó, de 6,4 a 8. Cuando los valores de pH son ligeramente ácidos como el inicial, el P y los otros micronutrientes se hacen menos disponibles y al adicionar CR+*A.niger* no solo se mejoró el pH si no también la disponibilidad de nutrientes.

3. Se encuentra gran potencial en la disolución de elementos como Ca^{2+} y Si que se encuentran asociados a las fases minerales cementantes gracias a las generaciones de los ácidos oxálico y cítrico principalmente por el hongo *Aspergillus niger*

4. La efectividad de la meteorización mineral y absorción de nutrientes por las plantas, depende en gran medida de la interacción de componentes como: mineral-planta-microorganismo. Es por esto que se pueden implementar agentes mineralizadores presentes y/o habitantes de suelo como el *Aspergillus niger,* en concreto residual, ya que este último está compuesto de muchos minerales esenciales que sirven para fertilizar o recuperar suelos degradados.

5. Se encontró que las relaciones de ácido – base mejoran significativamente al adicionar enmiendas de concreto residual en simbiosis con *Aspergillus niger*, lo que conlleva a una menor relación nutricional para el suelo y las plantas asociadas.

6. ESQUEMA: MECANISMOS SIMBIÓTICOS

Desde el punto de vista biológico, el concreto, como roca artificial es un ambiente extremo; ya que se considera escaso en nutrientes disponibles y sufre grandes cambios en el contenido de humedad, con el viento y la lluvia, pues se va desgastando su superficie. Sin embargo, el concreto por el cual están formadas las estructuras urbanas está habitado por muchos microorganismos y sus interacciones metabólicas, también por plantas.

Como se observa en la figura 23, y partiendo de la fotosíntesis que realizan las plantas, en la cual convierten moléculas de agua, CO_2 atmosférico y la energía lumínica, en glucosa y oxígeno (expulsado a la atmósfera), podría considerarse exitosa la relación simbiótica entre *Aspergillus niger* y las plantas, pues el hongo emplea la glucosa como fuente de carbono y energía. En ese mismo orden *A. niger* sintetiza diferentes ácidos orgánicos, tales como, el glucónico inicialmente, el cual es el directamente derivado de la fermentación aeróbica oxidativa producto de las enzimas del hongo, luego produce los ácidos oxálico y cítrico los cuales también derivan de las reacciones redox en el matriz cementante. Las plantas también pueden producir ácido glucónico como exudado radical, el cual es fuente de carbono y energía para diversos microorganismos.

El *Aspergillus niger*, cuando está en presencia de carbohidratos (como la glucosa) produce principalmente tres ácidos orgánicos, que son el cítrico, oxálico y glucónico y el pH del medio donde se encuentre va ser uno de los factores más importantes que influyen en el proceso. El ácido oxálico fuerte se sinteriza cuando el pH ambiental es ligeramente ácido o neutro para bajar el pH en el menor tiempo posible y prevenir el crecimiento de microorganismos competidores, especialmente bacterias. El ácido cítrico es un ácido más débil con propiedades amortiguadoras y se secreta cuando el pH es bajo, para mantenerlo y evitar que suba. La producción de ácido glucónico es óptima a pH 5,5 y no tiene como objetivo acidificar el medio sino almacenar glucosa como un compuesto que no está disponible para los otros microorganismos competidores. El gluconato creado por *A .niger* (producto de la fermentación con enzimas como la catalasa para generar ácido glucónico), es reutilizado como fuente de carbono para producir los otros ácidos (Walaszczyk et al., 2018).

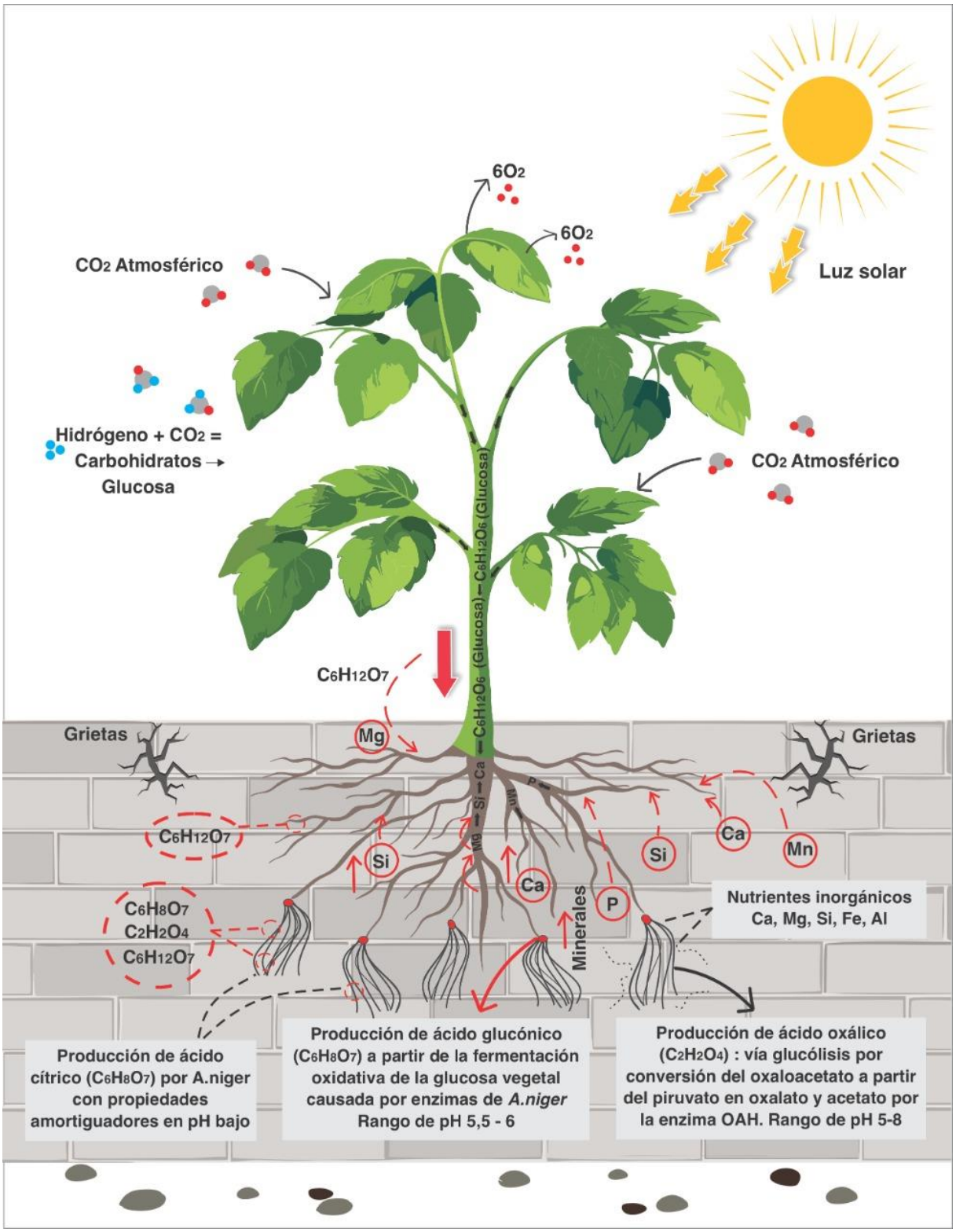


Figura 23. Dibujo de la planta establecida en una estructura urbana en simbiosis con *Aspergillus niger*.

La meteorización comienza con la fragmentación por fuerzas físicas, luego puede darse estrés térmico y las sales producen la propagación de grietas que permiten la colonización por comunidades de microorganismos asociados. En el proceso de fotosíntesis genera carbohidratos como la glucosa, la cual es fermentada vía oxidativa y se genera el ácido glucónico por las raíces de las plantas y también *por A. niger* (pH 5,5 – 6). El ácido oxálico, se genera por la vía de la glucólisis, con la glucosa como precursor, por metabolismo enzimático del hongo, el cual tienen como primer objetivo bajar el pH de la solución y evitar microorganismos competidores, como las bacterias (pH 5-8). Cuando el pH está ligeramente ácido se produce el ácido cítrico con propiedades amortiguadoras y altamente deteriorantes.

Los ácidos oxálico y cítrico tienen fuertes propiedades quelantes y atacan agresivamente la superficie del concreto. Estos son exudados por las hifas del hongo *Aspergillus niger* los cuales alteran las condiciones químicas de los micrositios de la estructura, y afectan la disolución de los minerales. Sin embargo, el hongo necesita una fuente de carbono y energía para sintetizar los ácidos orgánicos, es por esto que, al hacer asociaciones simbióticas, puede tener una mejor adaptación para la exploración de entornos construidos, pues estos reciben el carbono fotosintético de las plantas, mientras que el hongo protege la simbiosis de condiciones ambientales extremas y aumenta el área de absorción y mayor acceso a los nutrientes minerales.

En conclusión, la acción directa de los productos metabólicos excretados, tales como los ácidos orgánicos, oxálico y cítrico, permite la disolución del cemento, por medio de la disminución del pH, acidólisis, aumentando la liberación de Ca, Si, Mg y P, entre otros, los cuales son nutrientes para las plantas. A cambio el hongo obtiene su energía para las síntesis metabólicas a través de los carbohidratos, como la glucosa, de la fotosíntesis de la planta.

7. CONCLUSIONES GENERALES

1. La investigación mostró que la influencia de *Aspergillus niger* durante los diferentes tratamientos (*In vitro*: 15 días e Invernadero 90 días) aumentó el crecimiento de las plántulas y por ende su nutrición al dejar disponibles los nutrientes provenientes del cemento en las soluciones. Estos ácidos orgánicos generados por el hongo, no solo tendrían efectos en las propiedades físicas, químicas y mecánicas del concreto, sino que también la acción de la simbiosis entre *Aspergillus niger* y *L. leucocephala* conduce a la liberación de iones de calcio, Magnesio, fósforo, silicio, entre otros, principalmente por acidólisis, lo que permite el establecimiento vegetal y formación de un "nuevo suelo", en el cual la planta hace su aporte de fuentes de carbono y energía por medio de la fotosíntesis.

2. Las estructuras morfológicas de *A. niger,* pueden responder a diferentes minerales que contengan silicatos y fosfatos para regular su crecimiento, la colonización, la asimilación de carbono y también acidificación del sustrato, es por esto es capaz de lixiviar el calcio, fósforo y silicio del concreto.

3. A pesar de que los mecanismos de biodeterioro han sido muy estudiados, profundizar en los procesos de disolución de minerales mediada por ligando y quelantes fuertes como los ácidos oxálico y cítrico, los cuales proporcionan un mayor ataque, puede dar una mayor comprensión a cerca de la formación de suelos y su importancia ambiental, como se demostró en el capítulo 5, ya que al entrar en contacto con enmiendas de concreto residual mejoraron sus relaciones nutricionales de Ca, P, Mg, Mn y Cu, esenciales para el desarrollo vegetal.

4. Uno de los principales motivos de éxito de los hongos y las plantas establecidas en las estructuras urbanas, es su capacidad para formar asociaciones simbióticas, pues al intercambiar metabolitos en la interacción (glucosa de la fotosíntesis y minerales liberados por el hongo), son responsables de transformaciones y distribución de nutrientes inorgánicos como fostatos, carbonatos y demás, mejorando el flujo del carbono y construyendo y un "nuevo suelo".

5. Tanto microorganismo, plantas y animales representan los procesos desencadenantes de biodeterioro de las estructuras urbanas y de concreto en general. Para aplicar procesos de conservación en las estructuras es indispensable conocer, evaluar y cuantificar la presencia de sistemas biológicos que inducen estos daños, así como sus mecanismos de interacción que se produce con el material y evaluar las causas y efectos de la acción del biodeterioro *Aspergillus niger*.

6. Los exudados de las hifas del hongo *Aspergillus niger,* tales como ácido oxálico y cítrico, alteran las condiciones químicas de los micrositios de la estructura, y afectan la disolución de los minerales; Sin embargo, el hongo necesita una fuente de carbono y energía para sintetizar los ácidos orgánicos, es por esto que, al hacer asociaciones simbióticas, puede tener una mejor adaptación para la exploración de entornos construidos, pues estos reciben el carbono fotosintético de las plantas, mientras que el hongo protege la simbiosis de condiciones ambientales extremas y aumenta el área de absorción y mayor acceso a los nutrientes minerales.

7. El ácido glucónico, aunque se presentó en mayores cantidades en las soluciones, no presenta buena capacidad complejante, pues produce una acidificación baja en el medio, lo que podría explicar su bajo rendimiento en procesos de deterioro, sin embargo, es indispensable para el metabolismo de *Aspergillus niger*, ya que lo acumula como fuente de carbono y energía cuando esta se agota en el medio.

8. Los ácidos cítrico y oxálico obtenidos están relacionados con su capacidad de acidificar e impulsar la meteorización de minerales a partir de la fuente concreto residual, en especial, el ácido oxálico, ya que entre sus funciones está la de bajar el pH del medio en el menor tiempo, en esta investigación se encontró concentraciones mayores que el ácido cítrico, el cual se genera cuando el pH está bajo, con propiedades amortiguadoras, pero también con propiedades muy deteriorantes como se evidenció en los cilindros de concreto..

9. El impacto en las propiedades del material con respecto a la actividad de la simbiosis entre hongos y plantas y su estructuración es muy importante, y ha sido poco entendida, pues las simbiosis en estas superficies, generalmente se asocian a

líquenes o biopelículas de bacterias, estos aspectos son cruciales en el desarrollo de materiales de construcción y su funcionamiento en diferentes entornos, pues la meteorización mediada por hogos y plantas afectan considerablemente su durabilidad.

8. RECOMENDACIONES FUTURAS

1. Los efectos del ataque de hongos y sus metabolitos como ácido cítrico y oxálico, pueden compararse, para determinar cuál podría acelerar el proceso de degradación de los desechos provenientes de los materiales de la construcción.

2. En cuanto al ataque por ácidos orgánicos, especialmente, el ácido oxálico y sus sales poco solubles como el oxalato de calcio, generadas por el *Aspergillus niger,* se debería indagar en las propiedades de estas sales, ya que podrían tener influencia y afinidad por la matriz cementante y mejorar las propiedades mecánicas.

3. El ácido oxálico podría explorarse como una forma de proteger el material cementante en ambientes ácidos, al probar mezclas con este ácido para comprender más el proceso de interacción con los ácidos y la matriz cementante, ya que, en particular el ataque con ácidos, como el oxálico crea sales expansivas que generan grietas en la matriz y modifican sus propiedades mecánicas.

4. Aunque los daños por biodeterioro ocasionan grandes pérdidas, entender los mecanismos de interacción entre las plantas y los microorganismos, son fundamentales para plantear alternativas de rehuso del concreto en programas de restauración de suelos, esto no solo tendría un impacto positivo a nivel económico, sino especialmente a nivel ambiental.

5. La degradación del material se debe a un proceso de descalcificación y reducción de silicio, lo cual es muy negativo para la estructura cementante. Sin embargo, la solución obtenida del proceso de descalsificación y reducción de silicio, rica en estos dos elementos, se debe considerar como fuente de nutrientes para microorganismos y plantas. Teniéndose en cuenta para los programas de mantenimiento de suelos degradados.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Angulo, S. C., Ulsen, C., John, V. M., Kahn, H., & Cincotto, M. A. (2009). Chemical-mineralogical characterization of C&D waste recycled aggregates from São Paulo, Brazil. In *Waste Management* (Vol. 29, Issue 2, pp. 721–730). https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.07.009
2. Aprianti, E., Shafigh, P., Bahri, S., & Farahani, J. N. (2015). Supplementary cementitious materials origin from agricultural wastes - A review. *Construction and Building Materials*, *74*, 176–187. https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2014.10.010
3. Bakker, B. L. G., & Ji, C. R. (2013). Issues in the GPD formulation of DVCS. *Acta Physica Polonica B, Proceedings Supplement*, *6*(1), 131–136. https://doi.org/10.5506/APhysPolBSupp.6.131
4. Banfield, J. F., Barker, W. W., Welch, S. A., & Taunton, A. (1999). Biological impact on mineral dissolution: Application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(7), 3404–3411. https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3404
5. Bashan, Y., Vierheilig, H., Salazar, B. G., & Luz, E. (2006). *Primary colonization and breakdown of igneous rocks by endemic , succulent elephant trees (Pachycormus discolor) of the deserts in Baja California , Mexico*. 344–347. https://doi.org/10.1007/s00114-006-0111-4
6. Bertron, A., Duchesne, J., & Escadeillas, G. (2005). Attack of cement pastes exposed to organic acids in manure. *Cement and Concrete Composites*, *27*(9–10), 898–909. https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2005.06.003
7. Bertron, A., Duchesne, J., & Escadeillas, G. (2007). Degradation of cement pastes by organic acids. *Materials and Structures/Materiaux et Constructions*, *40*(3), 341–354. https://doi.org/10.1617/s11527-006-9110-3
8. Bertron, Alexandra. (2014). Understanding interactions between cementitious materials and microorganisms: a key to sustainable and safe concrete structures in various contexts. *Materials and Structures*, *47*(11), 1787–1806. https://doi.org/10.1617/s11527-014-0433-1
9. *Biodeterioro(de(monumentos(y(biorremediación:(estado(actual(y(perspectivas(futuras(*. (2013). 562–579.
10. Corrêa Pinto, A. M., Palomar, T., Alves, L. C., da Silva, S. H. M., Monteiro, R. C., Macedo, M. F., & Vilarigues, M. G. (2019). Fungal biodeterioration of stained-glass windows in

monuments from Belém do Pará (Brazil). *International Biodeterioration and Biodegradation*, *138*(September 2018), 106–113. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.01.008

11. Coutinho, M. L., Miller, A. Z., & Macedo, M. F. (2015). Biological colonization and biodeterioration of architectural ceramic materials: An overview. In *Journal of Cultural Heritage* (Vol. 16, Issue 5). https://doi.org/10.1016/j.culher.2015.01.006
12. Cwalina, B. (2008). Biodeterioration of Concrete. *Journal of Architecture Civil Engineering Environment*, 133–140.
13. Dakal, T. C., & Cameotra, S. S. (2012). Microbially induced deterioration of architectural heritages: Routes and mechanisms involved. *Environmental Sciences Europe*, *24*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/2190-4715-24-36
14. De Windt, L., Bertron, A., Larreur-Cayol, S., & Escadeillas, G. (2015). Interactions between hydrated cement paste and organic acids: Thermodynamic data and speciation modeling. *Cement and Concrete Research*, *69*, 25–36. https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2014.12.001
15. De Windt, L., & Devillers, P. (2010). Modeling the degradation of Portland cement pastes by biogenic organic acids. *Cement and Concrete Research*, *40*(8), 1165–1174. https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2010.03.005
16. Gadd, Geoffrey M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, *111*(1), 3–49. https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.12.001
17. Gadd, Geoffrey Michael. (2013). Molecular Environmental Soil Science. In *Molecular Environmental Soil Science*. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4177-5
18. Gadd, Geoffrey Michael, Bahri-Esfahani, J., Li, Q., Rhee, Y. J., Wei, Z., Fomina, M., & Liang, X. (2014). Oxalate production by fungi: Significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. *Fungal Biology Reviews*, *28*(2–3), 36–55. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.05.001
19. Gámez-Espinosa, E., Bellotti, N., Deyá, C., & Cabello, M. (2020). Mycological studies as a tool to improve the control of building materials biodeterioration. *Journal of Building Engineering*, *32*(August). https://doi.org/10.1016/j.jobe.2020.101738
20. George, R. P., Ramya, S., Ramachandran, D., & Kamachi Mudali, U. (2013). Studies on Biodegradation of normal concrete surfaces by fungus Fusarium sp. *Cement and Concrete Research*, *47*, 8–13. https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2013.01.010
21. Giannantonio, D. J., Kurth, J. C., Kurtis, K. E., & Sobecky, P. A. (2009). Effects of concrete

properties and nutrients on fungal colonization and fouling. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *63*(3), 252–259. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.10.002

22. Guerra, F. L., Lopes, W., Cazarolli, J. C., Lobato, M., Masuero, A. B., Dal Molin, D. C. C., Bento, F. M., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2019). Biodeterioration of mortar coating in historical buildings: Microclimatic characterization, material, and fungal community. *Building and Environment*, *155*(October 2018), 195–209. https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2019.03.017
23. Harbulakova, V. O., Estokova, A., Stevulova, N., Luptáková, A., & Foraiova, K. (2013). Current trends in investigation of concrete biodeterioration. *Procedia Engineering*, *65*, 346–351. https://doi.org/10.1016/j.proeng.2013.09.053
24. Ivanov, V., & Stabnikov, V. (2017). *Biocorrosion, Biodeterioration, and Biofouling in Civil Engineering*. 261–269. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1445-1_13
25. Jones, J. M. C., Guinel, F. C., & Antunes, P. M. (2020). Carbonatites as rock fertilizers: A review. *Rhizosphere*, *13*(November 2019). https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100188
26. Kakakhel, M. A., Wu, F., Gu, J. D., Feng, H., Shah, K., & Wang, W. (2019). Controlling biodeterioration of cultural heritage objects with biocides: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *143*(June), 104721. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104721
27. Lambers, H., Mougel, C., Jaillard, B., & Hinsinger, P. (2009). *Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere : an evolutionary perspective*. 83–115. https://doi.org/10.1007/s11104-009-0042-x
28. Larreur-Cayol, S., Bertron, A., & Escadeillas, G. (2011). Degradation of cement-based materials by various organic acids in agro-industrial waste-waters. *Cement and Concrete Research*, *41*(8), 882–892. https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2011.04.007
29. Leyva, L. A. (2006). *Efecto del ácido glucónico sobre la actividad de las enzimas encargadas de su metabolismo, en la bacteria promotora de crecimiento en plantas Azospirillum brasilense Cd asociada a plantas de mezquite (Prosopis articulata S. Watson)*. 79. https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/660/1/leyva_l.pdf
30. LIAN, B., CHEN, Y., ZHU, L., & YANG, R. (2008). Effect of Microbial Weathering on Carbonate Rocks. *Earth Science Frontiers*, *15*(6), 90–99. https://doi.org/10.1016/s1872-5791(09)60009-9
31. Limbachiya, M. C., Marrocchino, E., & Koulouris, A. (2007). Chemical-mineralogical characterisation of coarse recycled concrete aggregate. *Waste Management*, *27*(2), 201–

208. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.01.005

32. Lopez, B. R., & Bacilio, M. (2020). *Weathering and soil formation in hot , dry environments mediated by plant – microbe interactions*. 447–459.
33. Loukanov, A., El Allaoui, N., Omor, A., Elmadani, F. Z., Bouayad, K., & Seiichiro, N. (2020). Jo ur na l P. *Journal of the Neurological Sciences*, 116544. https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.116544
34. Mej, E., & Sc, R. M. (2017). *Bioacidulation of construction and demolition wastes and its potential use in bioremediation of urban-mining- degraded soils*.
35. Mejía, E., Tobón, J. I., & Osorio, W. (2019). Urban structure degradation caused by growth of plants and microbial activity. *Materiales de Construccion*, *69*(333), 1–11. https://doi.org/10.3989/mc.2019.09517
36. Mejía, Erica, Navarro, P., Vargas, C., Tobón, J. I., & Osorio, W. (2016). Caracterización de un residuo de construcción y demolición para la obtención de Ca y Si mediante tratamiento con ácido cítrico. *DYNA (Colombia)*, *83*(199), 94–101. https://doi.org/10.15446/dyna.v83n199.56394
37. Mendes, G. de O., Murta, H. M., Valadares, R. V., Silveira, W. B. da, Silva, I. R. da, & Costa, M. D. (2020). Oxalic acid is more efficient than sulfuric acid for rock phosphate solubilization. *Minerals Engineering*, *155*(September 2019), 106458. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2020.106458
38. Michel, D. (1998). Introduccion a la bioarchivistica. *La Gazette Des Archives*, *182*(1), 282–283.
39. Nascimento, J. M. do, Vieira Netto, J. A. F., Valadares, R. V., Mendes, G. de O., Silva, I. R. da, Vergütz, L., & Costa, M. D. (2021). Aspergillus niger as a key to unlock fixed phosphorus in highly weathered soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *156*(May 2020). https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108190
40. Palla, F., & Barresi, G. (2017). Biotechnology and conservation of cultural heritage. *Biotechnology and Conservation of Cultural Heritage*, 1–100. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46168-7
41. Quintero Ange Mauriciol, Carvajal Escobar Yesid, A. P. (2012). Luna Azul ISSN 1909-2474 No. 34, enero - junio 2012. *Luna Azul*, *34*, 240–256. https://doi.org/10.17151/luaz.2015.40.14
42. Rendon Diaz Miron, L. E., & Koleva, D. A. (2017). Concrete durability: Cementitious materials and reinforced concrete properties, behavior and corrosion resistance. *Concrete Durability: Cementitious Materials and Reinforced Concrete Properties, Behavior and*

Corrosion Resistance, 1–162. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55463-1

43. Rosling, A., Roose, T., Herrmann, A. M., Davidson, F. A., Finlay, R. D., & Gadd, G. M. (2009). Approaches to modelling mineral weathering by fungi. *Fungal Biology Reviews*, *23*(4), 138–144. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.09.003
44. Siegesmund, S., & Snethlage, R. (2014). Stone in architecture: Properties, durability: Fifth edition. In *Stone in Architecture: Properties, Durability: Fifth Edition*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45155-3
45. Tiago, I., & Gil, F. (2020). *International Biodeterioration & Biodegradation In vitro analyses of fungi and dolomitic limestone interactions : Bioreceptivity and biodeterioration assessment Jo a*. *155*(July). https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105107
46. Uroz, Stéphane, Calvaruso, C., Turpault, M. P., & Frey-Klett, P. (2009). Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology*, *17*(8), 378–387. https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.05.004
47. Uroz, Stephane, Kelly, L. C., Turpault, M. P., Lepleux, C., & Frey-Klett, P. (2015). The Mineralosphere Concept: Mineralogical Control of the Distribution and Function of Mineral-associated Bacterial Communities. *Trends in Microbiology*, *23*(12), 751–762. https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.004
48. Varela, G. (n.d.). *Fisiologia y metabolismo bacteriano*. 1–8.
49. Verdier, T., Coutand, M., Bertron, A., & Roques, C. (2014). A review of indoor microbial growth across building materials and sampling and analysis methods. *Building and Environment*, *80*, 136–149. https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2014.05.030
50. Walaszczyk, E., Podgórski, W., Janczar-Smuga, M., & Dymarska, E. (2018). Effect of medium pH on chemical selectivity of oxalic acid biosynthesis by aspergillus Niger W78C in submerged batch cultures with sucrose as a carbon source. *Chemical Papers*, *72*(5), 1089–1093. https://doi.org/10.1007/s11696-017-0354-x
51. Wei, S., Jiang, Z., Liu, H., Zhou, D., & Sanchez-Silva, M. (2013). Microbiologically induced deterioration of concrete - A review. In *Brazilian Journal of Microbiology*. https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000006
52. Wiktor, V., De Leo, F., Urzì, C., Guyonnet, R., Grosseau, P., & Garcia-Diaz, E. (2009). Accelerated laboratory test to study fungal biodeterioration of cementitious matrix. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *63*(8), 1061–1065. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.09.004
53. Xu, J., & Sparks, D. L. (2014). Molecular Environmental Soil Science. In *Chemistry International -- Newsmagazine for IUPAC* (Vol. 31, Issue 4).

https://doi.org/10.1515/ci.2009.31.4.35a

54. Zhao, J., Csetenyi, L., & Michael, G. (2020). International Biodeterioration & Biodegradation Biocorrosion of copper metal by Aspergillus niger. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *154*(June), 105081. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105081