

**MÉTODOS DE FORMACIÓN DE MINERALES USANDO**  
**MICROORGANISMOS BIOMINERALIZANTES Y MACROORGANISMOS**  
**BIOMINERALIZANTES, Y COMPOSICIONES FORMADAS UTILIZANDO LOS**  
**MISMOS**

5

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. n.º 62/928.944, titulada "METHODS OF USING BACTERIA FOR PRODUCING MATERIALS SUITABLE FOR USE IN CEMENT PASTE AND  
10 CONCRETE AND MATERIALS FORMED USING SAME" y presentada el 31 de octubre de 2019, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en la medida en que dicho contenido no entre en conflicto con la presente divulgación.

DECLARACIÓN CON RESPECTO A LA INVESTIGACIÓN O AL DESARROLLO  
15 SUBVENCIONADO FEDERALMENTE

La presente invención se realizó con apoyo gubernamental en virtud de la subvención número HR0011-17-2-0039, otorgada por DOD/DARPA. El gobierno posee determinados derechos sobre la invención.

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

20 La divulgación se refiere, en general, a métodos de uso de microorganismos biomineralizantes y/o macroorganismos biomineralizantes en la fabricación de materiales, tales como cemento, hormigón y otros. La divulgación también se refiere a materiales y composiciones formados utilizando microorganismos y macroorganismos biomineralizantes.

25 ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

El hormigón, generalmente una mezcla de agua, áridos y Cemento Portland Ordinario (CPO), es uno de los materiales más consumidos en la tierra, y las consecuencias económicas y ambientales de su ubicuidad son significativas. Solo la producción de CPO representa aproximadamente del 4 al 8,6 % de las emisiones de CO<sub>2</sub> globales. A medida que la población mundial sigue aumentando, se estima que la producción de cemento aumentará en aproximadamente un 50 % para 2050 a fin de mantener el ritmo de las demandas de infraestructura nueva y obsoleta tanto en los países en desarrollo como en los países desarrollados.

Normalmente, el cemento se produce calentando piedra caliza junto con arcilla a temperaturas superiores a 1500 °C, un proceso de alto consumo energético que produce grandes áridos minerales de silicato de calcio, denominados escoria. La reacción suele tener lugar en hornos que se calientan utilizando combustibles a base de carbono, tales como carbón, gas natural, aceite o coca, lo que produce una cantidad significativa de emisiones de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, la escoria se tritura hasta formar polvos finos utilizando otro proceso de alto consumo energético. Los polvos triturados secos se utilizan para fabricar hormigón.

La pasta de cemento, que incluye cemento y agua, normalmente comprende aproximadamente el 10 % en volumen de hormigón, pero representa aproximadamente el 95 % de las emisiones de CO<sub>2</sub> del hormigón (debido a la combustión de combustibles y a la calcinación química de la piedra caliza). Los áridos (por ejemplo, la piedra caliza, grava, arena) comprenden el volumen restante. Se desean técnicas mejoradas para formar cemento, hormigón y otros materiales que produzcan menos CO<sub>2</sub>.

El hormigón y/o el cemento también pueden incluir aditivos, tales como dióxido de silicio, dióxido de calcio, carbonato de calcio o similares. Los aditivos se pueden formar triturando materiales de origen, que se pueden añadir a las emisiones de CO<sub>2</sub> de la producción de cemento y hormigón. Por consiguiente, también se desean métodos mejorados para producir dichos aditivos.

Cualquier análisis de problemas y soluciones pertenecientes a la técnica relacionada se ha incluido en la presente divulgación únicamente con el fin de proporcionar un contexto para la presente invención y no debe tomarse como una admisión de que parte o la totalidad del análisis se conocía en el momento de realizarse la invención.

#### SUMARIO DE LA DIVULGACIÓN

Diversas realizaciones de la presente divulgación se refieren a métodos para formar partículas minerales para usar en una variedad de aplicaciones y a composiciones que incluyen las partículas minerales. Si bien, a continuación, se analizan más detalladamente las formas en que diferentes realizaciones de la presente divulgación abordan los inconvenientes de las técnicas anteriores, en general, diferentes realizaciones de la divulgación proporcionan métodos mejorados para formar partículas minerales y composiciones, incluyendo las partículas minerales, que producen significativamente menos dióxido de carbono e incluso pueden consumir más dióxido de carbono que el que producen los métodos. En otras palabras, los ejemplos de métodos o partes de los mismos pueden ser sin carbono. Además, los ejemplos de la divulgación permiten adaptar una morfología y/o propiedades de las partículas minerales, lo que permite ajustar las propiedades deseadas en las composiciones (por ejemplo, cemento y/u hormigón) que incluyen dichas partículas.

De acuerdo con diferentes ejemplos de la divulgación, se divulga un método para formar una composición, tal como una pasta de cemento. El método incluye proporcionar un medio de crecimiento, proporcionar uno o más de microorganismos biomineralizantes y macroorganismos biomineralizantes, producir partículas minerales usando el uno o más de los microorganismos biomineralizantes y macroorganismos biomineralizantes, y formar la pasta de cemento usando las partículas minerales. Los microorganismos biomineralizantes pueden incluir bacterias, tales como, por ejemplo, cianobacterias. Adicionalmente, o como alternativa, los microorganismos biomineralizantes pueden incluir microalgas, tales como, por ejemplo, diatomeas y/o cocolitóforos. A modo de ejemplos, las bacterias pueden utilizarse para producir carbonato de calcio y/o las microalgas pueden utilizarse para producir carbonato de calcio y/o dióxido de silicio. Como se analiza con más detalle a continuación, diferentes parámetros, tales como la especie de la bacteria, la especie de microalga, el tiempo, la temperatura, la química de los medios, las condiciones de luz/oscuridad y ambiente gaseoso (es decir, CO<sub>2</sub>, aire) y similares pueden utilizarse para ajustar las propiedades deseadas de los microorganismos biomineralizantes. Las partículas minerales producidas de acuerdo con los ejemplos de la divulgación pueden utilizarse en una variedad de aplicaciones, incluyendo la pasta de cemento, el mortero y el hormigón, como un árido, una carga, un agente de nucleación, materiales cementicios suplementarios o similares.

De acuerdo con ejemplos adicionales de la divulgación, se proporciona un método para formar una composición de hormigón. El método puede incluir etapas adicionales, tales como triturar las partículas minerales a un tamaño

medio de partícula de, por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 100 µm para formar un polvo, calentar las partículas trituradas con otros aditivos a una temperatura superior a 1500 °C para formar escoria y triturar la escoria para formar cemento Portland.

5 De acuerdo con ejemplos adicionales, se forma una composición de pasta de cemento de acuerdo con un método descrito en el presente documento. Las partículas minerales pueden utilizarse o incluirse como aditivo directo a una pasta de cemento y/o como sustituto de la piedra caliza, arena o similares durante la producción de cemento.

10 De acuerdo con ejemplos adicionales de la divulgación, una composición de hormigón puede incluir una pasta de cemento como se describe en el presente documento y componentes adicionales. Por ejemplo, la composición de hormigón puede incluir adicionalmente áridos gruesos, áridos finos y uno o más compuestos sólidos adicionales, tales como cenizas volantes, escoria, otras  
15 puzolanas naturales o sintéticas, fibras y/o una o más mezclas líquidas.

De acuerdo con ejemplos adicionales de la divulgación, se proporciona un método para formar un mineral. El método puede incluir proporcionar un medio de crecimiento, proporcionar uno o más microorganismos que comprendan una o más bacterias y microalgas, por ejemplo, cianobacterias, diatomeas y/o  
20 cocolitóforos, y producir partículas minerales usando el medio de crecimiento y uno o más microorganismos. Los minerales producidos usando el método pueden utilizarse para formar una o más de pinturas, recubrimientos y cartón yeso, como un pigmento blanco, como una fuente de material de cal, como material de cal, como cal agrícola y/o como fuente de calcio.

25 Estas y otras realizaciones resultarán fácilmente evidentes para los

expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada de determinadas realizaciones con referencia a las figuras adjuntas; la invención no se limita a ninguna de las realizaciones divulgadas en particular.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS DE DIBUJOS

5           Se puede obtener una comprensión más completa de los ejemplos de realizaciones de la presente divulgación haciendo referencia a la descripción detallada y a las reivindicaciones consideradas en relación con las siguientes figuras ilustrativas.

La FIG. 1 ilustra un método de acuerdo con ejemplos de la divulgación.

10           La FIG. 2 ilustra partículas minerales de acuerdo con ejemplos de la divulgación.

La FIG. 3 ilustra partículas minerales adecuadas para usar como material silíceo y calcáreo de acuerdo con ejemplos de la divulgación.

15           La FIG. 4 ilustra partículas minerales adecuadas para usar como material silíceo de acuerdo con los ejemplos de la divulgación.

La FIG. 5 ilustra imágenes de MEB (Microscopia Electrónica de Barrido) de piedra caliza triturada común utilizada como (a) sustituto de cemento de nanocarga y (b) sustituto de árido fino de microcarga, así como partículas de  $\text{CaCO}_3$  (c) angulares y (d) redondas cultivadas en agua de mar y alto contenido de  $\text{CO}_2$  que se han producido utilizando microorganismos biomineralizantes, en concreto, cianobacterias (*Synechococcus*) de acuerdo con ejemplos de la divulgación.

20

La FIG. 6 ilustra partículas minerales de  $\text{CaCO}_3$  formadas a partir de *S. pasteurii* ureolítica y cepas de expresión de ureasa genomodificadas de *E. coli* de acuerdo con ejemplos de la divulgación.

25

La FIG. 7 ilustra (a) la nanomecánica del partículas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico; (b) datos de un SDP (Sistema de Detección Precoz) de partículas precoces y tardías producidas por *E. coli* y *S. pasteurii*; (c) Análisis de MicroSonda Electrónica (AMSE) de una partícula de  $\text{CaCO}_3$  biogénico que muestra un núcleo  
5 rico en fósforo de acuerdo con ejemplos de la divulgación.

La FIG. 8 ilustra datos de calorimetría isotérmica, en concreto (a) flujo de calor y (b) calor total generado, de nanocargas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico en pasta de CPO de acuerdo con los ejemplos de la divulgación.

Se apreciará que los elementos de las figuras se ilustran para simplificar  
10 y aclarar, y no se han dibujado necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos de las figuras pueden estar ampliadas en relación con otros elementos para ayudar a mejorar la comprensión de las realizaciones ilustradas de la presente divulgación.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE EJEMPLOS DE REALIZACIONES

15 Aunque, a continuación, se divulgan determinadas realizaciones y ejemplos, los expertos en la materia entenderán que la invención se extiende más allá de las realizaciones y/o de los usos de la invención divulgados específicamente, así como de modificaciones evidentes y equivalentes de la misma. Por tanto, se pretende que el alcance de la invención divulgada no esté  
20 limitado por las realizaciones divulgadas particulares que se describen a continuación.

Diferentes ejemplos de la presente divulgación se refieren, en general, a métodos para formar partículas minerales usando uno o más de microorganismos biomineralizantes y macroorganismos biomineralizantes, y a  
25 composiciones y productos formados usando las partículas minerales. Los

ejemplos de métodos descritos en el presente documento pueden reducir una cantidad de dióxido de carbono que, de otro modo, se emitiría durante la fabricación de las composiciones y los productos. Varios ejemplos que se describen a continuación se relacionan con la formación de cemento y hormigón.

5 Sin embargo, salvo que se indique lo contrario, la invención no se limita a dichos ejemplos.

Se pueden añadir partículas minerales tales como carbonato de calcio, dióxido de silicio y similares a composiciones, tales como cemento, pasta de cemento y/u hormigón. Las partículas minerales se pueden utilizar como aditivo  
10 o como sustituto de la piedra caliza, arena o similar, y pueden someterse a un procesamiento adicional para formar cemento, tal como cemento Portland.

De acuerdo con ejemplos de la divulgación, los microorganismos biomineralizantes y los macroorganismos biomineralizantes producen minerales silíceos (es decir, que contienen sílice) y calcáreos (es decir, que contienen  
15 calcio) adecuados para usar como aditivos y/o como sustituto de piedra caliza para usar en cemento, hormigón, y otras composiciones y productos.

La FIG. 1 ilustra un método 100 de acuerdo con diferentes ejemplos de la divulgación. El método 100 incluye las etapas de proporcionar un medio de crecimiento 102, proporcionar microorganismos biomineralizantes y/o  
20 macroorganismos biomineralizantes 104, producir partículas minerales 106, triturar las partículas minerales 108, calentar las partículas minerales trituradas 110, triturar escoria 112, añadir agua 114 y añadir arena y áridos 116. Aunque se ilustran con las etapas 102-116, los métodos de acuerdo con la divulgación pueden incluir un subconjunto de estas etapas (por ejemplo, en la formación de  
25 cemento y pasta de cemento) y/o incluir etapas adicionales o alternativas.



Durante la etapa 102, se proporciona un medio de crecimiento adecuado para el crecimiento y/o microorganismos biomineralizantes y macroorganismos biomineralizantes. El medio de crecimiento puede depender de los microorganismos biomineralizantes y macroorganismos biomineralizantes proporcionados, y/o de los polimorfos y/o de las propiedades que se desean de las partículas minerales formadas. Por ejemplo, en el caso de las cianobacterias, el medio de crecimiento puede incluir agua de mar y CO<sub>2</sub> de la atmósfera (por ejemplo, en forma de ácido carbónico) para producir CaCO<sub>3</sub>. Se puede utilizar un medio de CaCl<sub>2</sub> al que se añaden níquel, ampicilina y Ca<sup>2+</sup> para cepas de *E. coli* recombinantes (véase Liya Liang *et al.*, "Rational Control of Calcium Carbonate Precipitation by Engineered Escherichia Coli", *ACS Synth. Biol.* 2018, 7, 2497-2506, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en la medida en que dicho contenido no entre en conflicto con la presente divulgación). Se puede utilizar un medio similar, sin el níquel, para la biomineralización con *S. pasteurii* (véase Chelsea M. Heveran *et al.*, "Engineered Ureolytic Microorganisms Can Tailor the Morphology and Nanomechanical properties of Microbial-Precipitated Calcium Carbonate", *Scientific Reports* [(2019) 9:14721], cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en la medida en que dicho contenido no entre en conflicto con la presente divulgación). BG-11 se puede utilizar como medio de crecimiento para microalgas, tales como diatomeas y cocolitóforos.

Durante la etapa 104, se añaden uno o más de microorganismos biomineralizantes y macroorganismos biomineralizantes al medio de crecimiento proporcionado durante la etapa 102. El uno o más de los microorganismos biomineralizantes y los macroorganismos biomineralizantes pueden incluir

bacterias, tales como cianobacterias y/o microalgas, tales como diatomeas y/o cocolitóforos.

Durante la etapa 106, se producen partículas minerales utilizando uno o más de los microorganismos biomineralizantes y los macroorganismos biomineralizantes proporcionados durante la etapa 104. Las partículas minerales pueden ser o incluir, por ejemplo, uno o más de carbonato de calcio o dióxido de silicio. Más en particular, las partículas minerales pueden incluir dióxido de silicio amorfo o carbonato de calcio cristalino. A modo de ejemplos particulares, los microorganismos biomineralizantes que comprenden cocolitóforos o bacterias pueden utilizarse para formar partículas minerales que comprenden carbonato de calcio y/o los microorganismos biomineralizantes que incluyen diatomeas pueden utilizarse para formar partículas minerales que incluyen dióxido de silicio y/o carbonato de calcio. El tamaño de las partículas minerales formadas puede variar entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 5 mm o aproximadamente 10 nm y aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , o aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5 mm.

Como se analiza con más detalle a continuación en relación con los ejemplos, pueden controlarse y/o manipularse una morfología y/u otras propiedades de las partículas minerales manipulando uno o más de los microorganismos biomineralizantes y macroorganismos biomineralizantes, el medio de crecimiento (por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$  en el medio de crecimiento), la temperatura, el tiempo y similares. Por ejemplo, en algunos casos, una morfología de las partículas minerales es redondeada. En otros casos, una morfología de las partículas minerales es angular. Además, puede controlarse y/o manipularse el tamaño de las partículas minerales mediante la manipulación

de uno o más de los mismos parámetros o parámetros similares, por ejemplo, a los intervalos de tamaño indicados anteriormente. En algunos casos, las partículas minerales se pueden prensar entre sí para formar partículas mayores que tengan una dimensión de sección transversal media de hasta  
5 aproximadamente 5 cm.

Las partículas minerales producidas durante la etapa 106 se pueden utilizar como aditivo para las composiciones, tales como cemento, pasta de cemento u hormigón. Cuando se utilizan como aditivo en la formación de hormigón, las partículas minerales se pueden añadir durante, por ejemplo, etapa  
10 114 y/o etapa 116. Adicionalmente, o como alternativa, las partículas minerales pueden utilizarse como precursores de cemento (por ejemplo, como sustituto de piedra caliza triturada o como fuente de silicio). En estos casos, el método 100 puede pasar a la etapa 108.

Durante la etapa 108, se pueden triturar las partículas minerales formadas  
15 durante la etapa 106 y/u otro material, tal como fuentes de calcio (por ejemplo, piedra caliza, creta, marga, conchas marinas, aragonito y similares) y silicio, aluminio, hierro y similares, que se pueden obtener de menas y minerales, tales como arena, esquisto, arcilla y mineral de hierro. Por ejemplo, las partículas minerales se pueden triturar hasta un tamaño medio de partícula de  
20 aproximadamente 1 a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  para formar un polvo.

Durante la etapa 110, se calientan las partículas trituradas para formar escoria, que son nódulos de forma esférica, duros como el vidrio y de color gris que normalmente varían de 0,32 a 5,1 centímetros (cm) de diámetro.

Durante la etapa 112, se tritura la escoria y se puede mezclar con otros  
25 materiales para formar cemento Portland. Se añade hasta aproximadamente un

5 por ciento de yeso y/o anhidrita natural a la escoria durante la etapa 112 para controlar el tiempo de fraguado del cemento y otras propiedades deseadas.

Se puede añadir agua al cemento Portland formado durante la etapa 112 para formar pasta de cemento durante la etapa 114. La cantidad de cemento en la pasta de cemento puede variar de un 20 a un 90 o de un 30 a un 80 por ciento en peso. A menos que se indique otra cosa, todos los porcentajes establecidos en el presente documento son porcentajes en peso.

La pasta de cemento puede combinarse o mezclarse con áridos finos y áridos gruesos durante la etapa 116 para formar hormigón.

10 Los áridos gruesos pueden incluir, por ejemplo, piedra machacada, grava de río o similares. Una dimensión de la sección transversal del árido grueso puede ser superior a 4,5 mm o variar de aproximadamente 4 a aproximadamente 130 o de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mm. La composición de hormigón puede incluir de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 60, de 15 aproximadamente el 25 a aproximadamente el 50, o de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 45 % en peso del árido grueso.

Los áridos finos pueden incluir, por ejemplo, arena, áridos finos fabricados (por ejemplo, usando partículas minerales formadas de acuerdo con la divulgación) o similares. La dimensión de la sección transversal del árido fino 20 puede ser inferior a 4,5 mm o variar de 0,002 a 4,5 o de 0,2 a 4,5 mm. La composición de hormigón puede incluir de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 50, de aproximadamente el 25 a aproximadamente el 45, o de aproximadamente el 25 a aproximadamente el 40 % en peso del árido fino.

El hormigón puede incluir un cemento como se ha descrito anteriormente. 25 De acuerdo con ejemplos de la divulgación, la composición de hormigón puede

incluir de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 30, de aproximadamente el 3 a aproximadamente el 20, o de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 10 % en peso del cemento.

#### Ejemplos específicos

- 5 Los ejemplos proporcionados a continuación ilustran métodos para formar carbonato de calcio y óxido de silicio adecuados para utilizar en, por ejemplo, la formación de cemento y hormigón. Estos ejemplos pretenden ilustrar realizaciones de la divulgación y no pretenden limitar el alcance de la divulgación o de las reivindicaciones.
- 10 Ejemplos de carbonato de calcio procedente de bacterias nativas y modificadas
- La piedra caliza, un árido común del hormigón, comprende principalmente  $\text{CaCO}_3$ , del cual el 44 % (en masa) es, en efecto,  $\text{CO}_2$  secuestrado. Los depósitos geológicos de piedra caliza (y sus canteras) formados durante milenios predominantemente por el mecanismo biológico de la Precipitación de  $\text{CaCO}_3$
- 15 Inducida Microbiológicamente (PCCIM). Basándose en esto, se cree que se podría almacenar más  $\text{CO}_2$  en el hormigón del que se emite durante su producción aprovechando y acelerando el mecanismo biológico de la PCCIM con el uso de la biología sintética para producir áridos adecuados para usar en la pasta de cemento, mortero y hormigón. Adicionalmente, o como alternativa, los
- 20 microorganismos biomineralizantes y los macroorganismos biomineralizantes pueden utilizarse en la producción de nanocargas y/o microcargas.

La piedra caliza ( $\text{CaCO}_3$ ) machacada se utiliza ampliamente como mezcla mineral y sustituto del cemento. Se utiliza hasta un 15 % en peso de piedra caliza en el Cemento de Piedra Caliza Portland (CPCP) en EE.UU. y hasta un 35 % en

25 Europa. Cuando es lo suficientemente fino ( $< 10 \mu\text{m}$ ), el  $\text{CaCO}_3$  confiere

características deseables a las propiedades en estado fresco y endurecido de la pasta de cemento. Sin embargo, las partículas de mayor tamaño ( $> 10 \mu\text{m}$ ) pueden afectar negativamente a las propiedades. Estos efectos se pueden atribuir al tamaño, la morfología (por ejemplo, forma, polimorfismo) y gradación del  $\text{CaCO}_3$ . Para ser funcional y adecuado para usar en el hormigón de CPO, las nanocargas de  $\text{CaCO}_3$  deben tener un tamaño suficiente y las microcargas deben tener una forma suficiente. Se puede utilizar el control metabólico durante la precipitación biológica de  $\text{CaCO}_3$  para producir nanocargas y microcargas que almacenen carbono a partir de, por ejemplo, residuos de  $\text{CO}_2$ , que sean adecuadas para usar en el hormigón de CPO.

En el hormigón de CPO fresco, las nanopartículas de piedra caliza pueden afectar a la reología, hidratación, contracción química y formación de minerales. Las nanocargas pueden mejorar el flujo de cemento al reducir la fricción entre partículas y permitir que el agua atrapada fluya mejor, mientras que las microcargas de mayor tamaño aumentan la demanda de agua al afectar negativamente la trabajabilidad. Los problemas de trabajabilidad pueden agravarse cuando se utiliza piedra caliza angular machacada como microcarga. Cuando se utiliza  $\text{CaCO}_3$  como árido fino, por ejemplo, puede aumentar la demanda de agua, y las partículas angulares mayores disminuyen la cohesión y aumentan la exudación. Adicionalmente, las nanopartículas de piedra caliza pueden proporcionar sitios de nucleación para el hidrato de sílice de calcio (HSC), acelerando así la hidratación y el tiempo de fraguado, mientras que las partículas mayores son relativamente inertes. Este fenómeno se atribuye tanto al tamaño de las partículas como al aumento de la densidad de empaquetamiento logrado por las nanopartículas. Las pastas de cemento que

contienen partículas de piedra caliza mayores suelen presentar grados más bajos de hidratación. Los cementos que contienen nanocargas de piedra caliza son, sin embargo, susceptibles a la contracción química debido a la velocidad de hidratación, mientras que los cementos con áridos de piedra caliza machacada

5 presentan una mayor contracción plástica debido a la evaporación del agua de exudación. Por último, las nanocargas de  $\text{CaCO}_3$  pueden reaccionar con los cementos que tengan un alto contenido de C3A para formar un hidrato de monocarboaluminato cristalino que, en los cementos de tipo II, puede conducir a una mayor resistencia a la compresión. En el hormigón de CPO endurecido, las

10 propiedades como la porosidad y la resistencia a la compresión también dependen de la forma y del tamaño de las partículas de la adición de mineral de caliza. La porosidad se reduce cuando se añaden nanopartículas de piedra caliza a la mezcla, disminuyendo así la absorción de agua y otras propiedades, como la difusión de cloruro. Sin embargo, las partículas de piedra caliza mayores

15 aumentan el volumen de los poros y el espacio hueco, lo que conduce a una mayor absorción de agua y permeabilidad al gas, y a una menor resistencia a la penetración de iones de cloruro. Asimismo, las nanopartículas aumentan la resistencia a la compresión inicial del hormigón de CPO, de nuevo, debido al aumento de la nucleación de los productos de reacción. Si bien el uso de piedra

20 caliza como sustituto de la arena mejora la resistencia a la flexión y a la compresión del hormigón de CPO en pequeños porcentajes de sustituto (debido a las mejoras en la Zona de Transición Interfacial (ZTI) y al entrelazamiento de las partículas de áridos), la amplia sustitución de la arena por microcargas de piedra caliza angulares y rugosas disminuye la resistencia a la compresión,

25 independientemente del tipo de cemento (por ejemplo, tipo I/II, tipo III).

### Producción bacteriana de $\text{CaCO}_3$

Se pueden obtener formas y tamaños deseados de carbonato de calcio seleccionando (1) especies de bacterias, (2) química de medios y/o (3) cepas de bacterias genomodificadas que puedan utilizar  $\text{CO}_2$  y una fuente de calcio elemental en los medios para producir precipitados de  $\text{CaCO}_3$ .

En la FIG. 5, se muestran ejemplos de adaptabilidad de  $\text{CaCO}_3$  controlada por medios, que ilustra que las cianobacterias (por ejemplo, *Synechococcus* sp. PCC 7002, un secuestrador de carbono fotosintético que utiliza el calcio presente en el agua de mar (su medio de crecimiento) y  $\text{CO}_2$  de la atmósfera), pueden producir precipitados de  $\text{CaCO}_3$  de diferentes formas y tamaños. Con calcio adicional en el medio (por ejemplo, a concentraciones superiores a 1 g/l de  $\text{CaCl}_2$  o entre aproximadamente 30 g/l de  $\text{CaCl}_2$  y aproximadamente 120 g/l de  $\text{CaCl}_2$ ), *Synechococcus* precipitará cristales más redondeados, un resultado importante que puede utilizarse para afinar las partículas de  $\text{CaCO}_3$  que almacenan carbono y que son adecuadas para la pasta de cemento.

Diferentes bacterias utilizan diferentes vías metabólicas para producir  $\text{CaCO}_3$  biogénico. Por ejemplo, en lugar de la fotosíntesis, *S. pasteurii* produce ureasa, una enzima que hidroliza la urea. A través de reacciones posteriores (y, de nuevo, en presencia de calcio), se forma  $\text{CaCO}_3$ . Los presentes inventores han mostrado que se puede introducir la vía de la ureasa en productores no naturales (por ejemplo, *E. coli*) que son más manejables genéticamente (es decir, modificables). Al modificar el número de plásmidos que se introdujeron en el genoma, los presentes inventores no solo demostraron que un productor no natural puede hacer precipitar  $\text{CaCO}_3$ , sino que también mostrado que es posible adaptar la morfología del  $\text{CaCO}_3$  biogénico. La FIG. 6 muestra imágenes de MEB



de precipitados de  $\text{CaCO}_3$  obtenidos de acuerdo con ejemplos de la divulgación que demuestran la viabilidad de adaptar la morfología y el tamaño de partícula del  $\text{CaCO}_3$  utilizando diferentes especies microbianas y cepas genomodificadas de la misma especie (es decir, *E. coli*).

- 5 Basándose en los datos de las FIG. 5 y 6, se cree que *Synechococcus* sp. PCC 7002 produce nanocargas adecuadas, dado que la concentración de calcio en el medio A+ es inferior a la de las otras cepas y no está disponible para un mayor crecimiento de cristales en condiciones de reacción discontinuas. *E. coli* se puede utilizar para producir microcargas, debido a la eficacia del mecanismo
- 10 de PCCIM de hidrólisis de la urea en medios LB (que se complementa con concentraciones más altas de calcio). También se cree que los medios de temperatura inferior y bajo contenido de sal (es decir, baja fuerza iónica, por ejemplo, una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 o de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 g/l de  $\text{CaCl}_2$ ) producirán partículas
- 15 mayores, dado que estas condiciones ralentizarán la cinética de crecimiento de los cristales, lo que conducirá a precipitados más duros, más fuertes y de mayor tamaño. En la Tabla 1, se proporcionan ejemplos de parámetros ajustables que se pueden manipular para obtener las propiedades del precipitado de  $\text{CaCO}_3$  deseadas.

| Especie              | Ejemplo de medio de crecimiento | Tiempo   | Temperatura °C |
|----------------------|---------------------------------|----------|----------------|
| <i>Synechococcus</i> | A+                              | 0-7 días | 20-40          |
| <i>Prymnesium</i>    | BG-11                           | 0-7 días | 20-40          |
| <i>Emiliania</i>     | BG-11                           | 0-7 días | 20-40          |
| <i>Sporosarcina</i>  | BPU                             | 0-7 días | 20-40          |

| Especie                         | Ejemplo de medio de crecimiento | Tiempo   | Temperatura °C |
|---------------------------------|---------------------------------|----------|----------------|
| <i>E. coli-int. de ureasa-1</i> | Caldo LB                        | 0-7 días | 20-40          |
| <i>E. coli-int. de ureasa-2</i> | Caldo LB                        | 0-7 días | 20-40          |
| <i>E. coli-int. de ureasa-3</i> | Caldo LB                        | 0-7 días | 20-40          |

Tabla 1

Se cultivan los cultivos de todas las bacterias en sus respectivos medios (véanse los ejemplos de la Tabla 1). Para *Synechococcus* sp. PCC 7002, que se somete a PCCIM a través de la fotosíntesis autótrofa, se pueden utilizar las células cultivadas hasta la fase exponencial para inocular un medio de crecimiento A+. Estos cultivos se pueden incubar a 37 °C en un alto nivel de CO<sub>2</sub> (3 %) con 100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de intensidad de luz durante 48 h. Para los organismos que se someten a PCCIM a través de la hidrólisis de la urea (por ejemplo, *S. pasteurii*, *E. coli*), las células se pueden inocular en 25 mM de medio de urea-CaCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de  $1 \times 10^7$  células/ml, en el que se puede complementar con níquel (5  $\mu\text{M}$ ) y ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) para las cepas de *E. coli*. Todos los ejemplos se pueden llevar a cabo aeróbicamente en un agitador. Se pueden utilizar la actividad de la ureasa (Sigma-Aldrich, MAK120) y los ensayos colorimétricos de Ca<sup>2+</sup> (Sigma-Aldrich, MAK022) para controlar la actividad de la ureasa y la concentración de Ca<sup>2+</sup>.

Se cree que *Synechococcus* sp. PCC 7002 (fotosíntesis autótrofa)

producirá partículas de  $\text{CaCO}_3$  de tipo A, mientras que *S. pasteurii* y *E. coli* (hidrólisis de urea) producirán partículas de  $\text{CaCO}_3$  de tipo A, B y C, según lo clasificado de acuerdo con la clasificación ASTM C1797 de partículas de  $\text{CaCO}_3$  trituradas para usar en el cemento hidráulico.

5            Los  $\text{CaCO}_3$  producidos de acuerdo con los ejemplos de la divulgación han demostrado que las partículas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico pueden cambiar las propiedades mecánicas a lo largo del tiempo debido a la maduración termodinámica de la vaterita a calcita. Por lo tanto, se pueden controlar los cambios dependientes del tiempo en las propiedades mecánicas del  $\text{CaCO}_3$

10 biogénico para garantizar la maduración completa y para informar sobre las condiciones adecuadas de endurecimiento y almacenamiento. Esto permite determinar qué cepas de bacterias (y en qué condiciones) producen  $\text{CaCO}_3$  biogénico rígido y estable. Los datos de la FIG. 7 ilustran que los cultivos bacterianos que presentan una cinética más lenta de crecimiento de cristales

15 producen  $\text{CaCO}_3$  biogénico que es más rígido que el  $\text{CaCO}_3$  biogénico producido por bacterias que presentan una cinética de precipitación más alta. Se pueden utilizar ensayos colorimétricos de  $\text{Ca}^{2+}$  para controlar la utilización de Ca, que se utiliza convencionalmente como indicador de la cinética de la biomineralización. Una cinética más lenta de crecimiento de cristales conduce termodinámicamente

20 a precipitados de mayor tamaño y mecánicamente más resistentes. En particular, la FIG. 7 ilustra (a) la nanomecánica de partículas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico; (b) datos de SDP de partículas precoces y tardías producidas por *E. coli* y *S. pasteurii*; (c) análisis de microsonda electrónica (AMSE) de una partícula de  $\text{CaCO}_3$  biogénico que muestra un núcleo rico en fósforo. Los datos muestran que el fosfato de

25 calcio puede desempeñar un papel importante en la nucleación y terminación del

CaCO<sub>3</sub> biogénico en estas especies, mientras que el calcio desempeña un papel en el crecimiento del CaCO<sub>3</sub>. Estos datos apoyan la conclusión de que una cinética de precipitación más lenta (medida para *E. coli* HB101/pRS462) puede permitir la producción de mayores partículas mecánicamente más rígidas.

5 Las propiedades físicas y químicas de las propiedades de carga superficial pertinentes para el cemento de partículas de CaCO<sub>3</sub> biogénico, tales como el punto de carga cero (PZC, *Point Zero Charge*) se pueden determinar mediante el método de deriva de pH. Se puede ajustar el pH en tubos de polipropileno de 50 ml, que contienen 25 ml de NaCl 0,1 M, entre pH 2-10, con  
10 NaOH o HCl en atmósfera de N<sub>2</sub>. Se pueden añadir 50 mg de CaCO<sub>3</sub> biogénico a cada una de estas soluciones y mezclarse durante 48 h, tras lo que se puede registrar el pH. El PZC, que se puede determinar a partir de la solución que no experimentó ningún cambio desde su pH inicial, se puede utilizar para explicar las propiedades reológicas de la pasta de cemento y el mortero con partículas  
15 de CaCO<sub>3</sub> biogénico. Los resultados se pueden comparar con el PZC de la piedra caliza triturada comercialmente. Dado que, en general, se desea un pH localmente alto (> 8) para la precipitación bacteriana del CaCO<sub>3</sub> tanto para los mecanismos de PCCIM fotosintéticos autótrofos como para los hidrolíticos de urea, se cree que el PZC será mayor para el CaCO<sub>3</sub> biogénico que para la piedra  
20 caliza convencional, lo que es beneficioso para las propiedades reológicas de la pasta de cemento y del mortero, dado que el pH de la pasta de cemento es > 12.

El CaCO<sub>3</sub> biogénico formado de acuerdo con ejemplos de la divulgación puede afectar a la trabajabilidad, a la contracción química, a las propiedades reológicas, al calor de hidratación, al tiempo de fraguado y a otras propiedades  
25 de las pastas de cemento frescas. A modo de ejemplos, se puede utilizar el 1 %,

5 %, 10 %, 15 %, o cualquier intervalo entre dichos valores, de  $\text{CaCO}_3$  formado de acuerdo con ejemplos de la divulgación, para reemplazar el cemento en las pastas de cemento.

La trabajabilidad se puede medir utilizando un minimolde cónico para la prueba de asentamiento. La contracción química puede medirse controlando los cambios en la geometría después del fraguado final. Las propiedades reológicas dependientes del tiempo (es decir, módulo de almacenamiento, módulo de pérdida) se pueden medir mediante pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud (SAOS, *Small-Amplitude Oscillatory Shear*) utilizando un reómetro MCR 301 de Anton Paar. El Potencial Zeta (PZ) se puede interrogar a través de la dispersión de luz de análisis de fase utilizando un analizador del PZ ZETA PLUS. El tiempo de fraguado se puede estudiar mediante pruebas estandarizadas de tiempo de fraguado utilizando una aguja Vicat, en la que se determinará el fraguado inicial y final. Las mediciones del tiempo de fraguado se pueden correlacionar con las mediciones del calor de hidratación, que se puede analizar utilizando un sistema de calorimetría isotérmica (CI) TAM air. Los resultados pueden correlacionarse con las propiedades físicas y químicas de las partículas de nanocarga que se obtienen de acuerdo con los ejemplos de la divulgación. Se cree que las nanocargas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico formadas de acuerdo con los ejemplos descritos en el presente documento actúan como agentes de nucleación para la pasta de cemento (mayor contenido de CH, CSH) y mejoran la reología sin comprometer el fraguado a pequeñas dosis (5-15 % en masa de cemento). Es probable que las combinaciones de partículas lisas y angulares inhiban la contracción química provocada solo por las nanocargas angulares. Finalmente, la materia orgánica residual puede retardar la hidratación, como se

evidencia por los retrasos de tiempo de fraguado que se muestran en la FIG. 8.

El  $\text{CaCO}_3$  biogénico formado de acuerdo con los ejemplos de la divulgación también se puede utilizar para reemplazar la arena en los morteros. Las microcargas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico (por ejemplo,  $> 10 \mu\text{m}$ ) pueden afectar a la trabajabilidad, a las propiedades reológicas, al calor de hidratación y al tiempo de fraguado de los morteros de CPO frescos. El sustituto sistemático de arena puede ser del, por ejemplo, 0 % o más del 0 % al 10 %. La trabajabilidad se puede medir utilizando una prueba de asentamiento en minimolde cónico. Las propiedades reológicas (es decir, límite elástico, viscosidad) y el PZ se medirán utilizando un reómetro MCR 301 de Anton Paar dotado de una celda de materiales de construcción y un analizador del PZ ZETA PLUS, respectivamente. El tiempo de fraguado se puede estudiar (como se hizo con las pastas de cemento) mediante pruebas estandarizadas de tiempo de fraguado con una aguja Vicat. Las mediciones del tiempo de fraguado se pueden correlacionar con las mediciones del calor de hidratación, que se analizarán mediante un sistema de CI TAM Air. Se cree que aumentará el asentamiento del minimolde cónico de los morteros, mientras que la resistencia a la cizalla, la viscosidad y el PZ mejorará con el uso de las partículas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico redondas frente a angulares. También se cree que las partículas angulares del tamaño de la arena aceleran el tiempo de fraguado y la cinética de hidratación del cemento.

La FIG. 8 ilustra datos de calorimetría isotérmica, en concreto (a) flujo de calor (representado por las líneas 802-810) y (b) calor total generado de nanocargas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico (representado por las líneas 812-820) en pasta de CPO. Mientras que las nanocargas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico de *E. coli* actúan de manera similar al CPO (y, en algunos casos, aceleran la hidratación), las

nanocargas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico de *Synechococcus* sp. PCC 7002 retardan la hidratación, un resultado que probablemente se deba al exceso de materia orgánica, como polisacáridos (es decir, azúcares), que puede mitigarse preacondicionando las partículas antes de su uso en la pasta de cemento.

5 Las propiedades del estado endurecido (es decir, mineralogía, microestructura, porosidad, propiedades mecánicas) de (1) las pastas de cemento con nanocargas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico, (2) los morteros de cemento con nanocargas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico y micropartículas biogénicas y (3) el hormigón a base de cemento con cargas de cemento inerte de  $\text{CaCO}_3$  y el sustituto de  
10 áridos finos se pueden manipular de acuerdo con los ejemplos de la divulgación. Los productos de reacción (por ejemplo, CH, CSH, etringita) se pueden analizar mediante DRX (Difracción de Rayos X) semicuantitativa (con un patrón interno), que determinará cuantitativamente los cambios relativos, en caso de haberlos, en la mineralogía resultante de los aglutinantes cementosos. Los resultados se  
15 pueden corroborar con un sistema combinado de ATG-IRTF (Análisis TermoGravimétrico-espectroscopia InfraRroja con Transformada de Fourier) para ayudar a identificar las fases hidratadas amorfas. Los cambios en la microestructura y la porosidad se pueden cuantificar a través de análisis de MEB, MRX (Microscopía de Rayos X) y BET (Brunauer-Emmett-Teller). Finalmente,  
20 las propiedades mecánicas, tales como el módulo elástico y la resistencia a la compresión, de los morteros de cemento se puede medir mediante pruebas mecánicas de acuerdo con ASTM C109. Se cree que las nanocargas angulares potenciarán la formación de aluminato de carbono y mejorarán la porosidad y la resistencia a la compresión global, y que las partículas de  $\text{CaCO}_3$  redondas de  
25 los morteros resolverán los problemas de la angulosidad del  $\text{CaCO}_3$  triturado (es

decir, mejorarán la porosidad y la resistencia a la compresión) siempre que las microcargas de  $\text{CaCO}_3$  biogénico tengan una porosidad igual (o mejorada) a la del  $\text{CaCO}_3$  triturado.

#### Biomíneralización con microalgas

5            Además o como alternativa a las bacterias, las microalgas, tales como las microalgas eucariotas, por ejemplo, diatomeas y cocolitóforos, se pueden utilizar para formar partículas minerales silíceas y calcáreas aptas para el cemento, hormigón y mortero, así como otras aplicaciones, tales como las que se indican en el presente documento. Determinadas microalgas eucariotas (por ejemplo, 10 diatomeas, cocolitóforos) poseen la capacidad de realizar la fotosíntesis y posteriormente producir minerales silíceos y calcáreos. La biomíneralización de estos minerales se ve facilitada por la vesícula de depósito de sílice de las diatomeas y la vesícula de cocolito del cocolitóforo. Estos orgánulos especializados son muy hábiles para estimular la formación de sílice amorfa y 15 carbonato cálcico cristalino, respectivamente. Lo que es excepcionalmente emocionante es que tanto la sílice amorfa como el carbonato de calcio cristalino son los componentes básicos minerales de tanto la tobermorita como la jennita, que son análogos a los minerales de silicato de calcio presentes en el cemento ordinario. Se han establecido técnicas bioinformáticas y analíticas, incluyendo 20 kits de herramientas de biología sintética, para el descubrimiento de bioproductos en diferentes microorganismos, y estos métodos también se pueden utilizar para obtener información sobre los bioproductos producidos por las microalgas. Los ejemplos de diatomeas incluyen diatomea *Cyclotella* sp. con frústula de sílice, cocolitóforo *Prymnesium neolepis* con escamas de sílice y 25 cocolitóforo calcificante *Emiliania huxleyi* con cocolitos de carbonato de calcio.



La FIG. 2 ilustra el uso de bacterias 202 y microalgas 204 para la producción de partículas minerales calcáreas 206, 208, 210 producidas a partir de microalgas 204 y bacterias 202. La FIG. 3 ilustra el uso de partículas minerales calcáreas 206, 208, 210 y partículas silíceas 302. Como se ilustra en la FIG. 3, las partículas minerales formadas de acuerdo con los ejemplos de la divulgación pueden someterse a un procesamiento adicional (por ejemplo, etapas 108-116 del método 100) para formar cemento y/u hormigón, como se ha explicado anteriormente en relación con la FIG. 1. La FIG. 4 ilustra el uso de material silíceo en la producción de pasta de cemento, mortero, hormigón y similares.

La presente invención se ha descrito anteriormente con referencia a una serie de realizaciones ilustrativas y ejemplos. Debe apreciarse que las realizaciones particulares mostradas y descritas en el presente documento son ilustrativas de las realizaciones preferidas de la invención y de su mejor modo, y no pretenden limitar el alcance de la invención. En las reivindicaciones, se exponen otros ejemplos de la divulgación. Se reconocerá que se pueden realizar cambios y modificaciones a las realizaciones descritas en el presente documento sin apartarse del alcance de la presente invención. Se pretende que estos y otros cambios o modificaciones estén incluidos dentro del alcance de la presente invención.