



INFORME PROYECTOS— 2024

AUTORREPARACIÓN DE MORTERO MEDIANTE
MICROORGANISMOS
“MORTY”

Informe: “Final de Resultados”

Número de proyecto: 22400006

Expediente: IMAMCA/2024/2

Duración: 01/01/2024 – 31/12/2024

Coordinado en AIDIMME por: Lucía Martín Román



GENERALITAT
VALENCIANA

IVACE+i

INSTITUTO VALENCIANO
DE COMPETITIVIDAD
E INNOVACIÓN

AIDIMME
INSTITUTO TECNOLÓGICO

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
1 INTRODUCCIÓN. OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	1
2 DESARROLLO DEL PROYECTO. ACTIVIDADES REALIZADAS.	4
3 RESULTADOS OBTENIDOS.	5
3.1. MICROORGANISMOS CARBONATOGÉNICOS.	5
3.2. CULTIVO Y MANTENIMIENTO.	7
3.3. ADECUACIÓN DE LAS ESPECIES SELECCIONADAS AL MORTERO. EVALUACIÓN DE LA PRECIPITACIÓN DE CARBONATO CÁLCICO.....	11
3.4. PREPARACIÓN DEL MORTERO Y FRACTURA.	16
3.5. ANÁLISIS DE FRACTURA.	20
3.6. ANÁLISIS Y VALORACIÓN DE LA REPARACIÓN.....	35
4 RESUMEN Y CONCLUSIONES	40
5 ANEXOS Y BIBLIOGRAFÍA	42

1 Introducción. Objetivos del proyecto

El hormigón es uno de los materiales de construcción globalmente utilizado debido a su alta resistencia a la compresión y a su bajo coste [1]. Sin embargo, su producción tiene una alta huella de carbono, por lo que sería esencial conseguir de este material una producción más sostenible [2] ya que suponen un 8% de la emisión global de CO₂ mundial y debería reducirse un 16% por lo menos hasta 2030 para adaptarse al acuerdo de París [3, 4]. Concretamente se producen 4 miles de millones de toneladas de cemento al año [5]. Además, según el mercado mundial de morteros de reparación de hormigón se prevé que alcance un gasto de 5,8 mil millones de dólares en 2030.

La industria de la construcción está buscando soluciones ecológicas para reducir las emisiones de CO₂ del hormigón, y equilibrar la responsabilidad medioambiental con la seguridad de las infraestructuras.

Además, existe la problemática de que las estructuras modernas como presas, carreteras, puentes, túneles y edificios necesitan mantenimiento debido al deterioro. El agrietamiento es común en el hormigón debido a la tensión, contracción, el desgaste, la actividad sísmica y factores medioambientales como la humedad, cambios de temperatura, exposición química, viento y factores biológicos [6] dando lugar a una de sus desventajas principales, la fragilidad al fracturado, lo cual disminuye su tiempo de vida útil, y aumenta los costes de reparación [7]. Es por ello por lo que este material se refuerza con acero en muchas ocasiones, este puede deteriorarse si penetra el agua.

Una manera de afrontar esta problemática es desarrollar morteros y hormigones autorreparables. Existen diversas maneras de elaborar un mortero autorreparable, nos centraremos en aquella basada en la utilización de microorganismos. La autorreparación mediante microorganismos es un buen método debido a que es una forma sostenible, no contaminante ni perjudicial para el medio ambiente.

La investigación en materiales de construcción ha avanzado en las últimas décadas, impulsado por la necesidad de desarrollar soluciones sostenibles y eficientes que respondan a los desafíos contemporáneos en la infraestructura urbana. Entre estas innovaciones, los morteros autorreparables son una alternativa prometedora, ya que unifica biotecnología y ciencia de materiales. Estos morteros, que incorporan microorganismos como bacterias y hongos, tienen la capacidad de auto-repararse ante la aparición de fisuras y daños, lo que no solo prolonga la vida útil de las estructuras, sino que también reduce la necesidad de reparaciones costosas y el uso de recursos adicionales.

Este proyecto se centra en esta autorreparación alcanzada mediante la utilización de microorganismos debido a la importancia y avance que supone a nivel económico, social y tecnológico/científico.

Desde una perspectiva económica, la implementación de morteros autorreparables puede resultar en un ahorro significativo en costos de mantenimiento y reparación.

Según estudios recientes, las infraestructuras representan una parte considerable del gasto público en muchos países, y su deterioro prematuro puede llevar a gastos adicionales que podrían evitarse con el uso de materiales más duraderos. La capacidad de estos morteros para reparar daños de manera autónoma no solo optimiza el ciclo de vida de las edificaciones, sino que también minimiza las interrupciones en el uso de las instalaciones, lo que es especialmente importante en entornos urbanos donde el tiempo de inactividad puede traducirse en pérdidas económicas significativas.

Desde el punto de vista social, la adopción de tecnologías de construcción más sostenibles y eficientes tiene un impacto directo en la calidad de vida de las comunidades. La reducción de la necesidad de reparaciones frecuentes disminuye la congestión y el ruido asociados con las obras de mantenimiento. También contribuye a un entorno más seguro y visualmente agradable. Además, el uso de microorganismos en la construcción promueve la conciencia sobre la sostenibilidad y el respeto por el medio ambiente, fomentando prácticas que pueden ser adoptadas por futuras generaciones.

La reparación producida por parte de microorganismos en morteros se puede producir de manera endógena o exógena. Es decir, mediante la inclusión en el propio mortero a la hora de elaborarlo, o bien aplicando estas bacterias a las fracturas. En este caso se realizarán reparaciones endógenas, ya que lo que se quiere conseguir es un material autorreparable que disminuya el coste de reparación.

La reparación producida por bacterias es el resultado de la actividad metabólica de bacterias y/o hongos que producen carbonato cálcico, dependiendo del pH y la temperatura, transfiriéndolos de la célula al ambiente. Estos reaccionan con el calcio para formar carbonato cálcico [8], generando esta precipitación y reparando las grietas. Este proceso se llama MICP (siglas en inglés de precipitación de carbonatos inducido por microorganismos) y cuantas más bacterias viables, más se reparan las grietas.

El objetivo de MORTY es desarrollar el conocimiento para formular un mortero u hormigón capaz de auto-regenerarse mediante la acción de un hongo o microorganismo apropiado, lo cual da lugar a dos beneficios, el primero, que la auto-reparación es constante, no se precisa de una intervención en el momento en el que ya se observa la grieta, y el segundo es el hecho de que el tratamiento es de carácter biológico y no da lugar a residuos, potenciando así la bioconstrucción y la construcción sostenible.

Asimismo, de esta forma, una vez el producto haya adquirido estabilidad en el mercado para tener un coste competitivo, se lograría una reducción de costes de mantenimiento y de reparación.

Por otro lado, se encuentran los objetivos específicos, que son los siguientes:

- Estudiar y seleccionar aquellos microorganismos capaces de desarrollar carbonato cálcico mediante la acción de la humedad.
- Formulación de morteros/hormigón con adición de microorganismos.

- Desarrollar métodos de ensayos que envejecan rápidamente el mortero/hormigón, para generar grietas y nos permita estudiar cómo reaccionan los microorganismos.
- Determinar métodos de análisis para corroborar la unión o relleno realizado por el carbonato cálcico (SEM).
- Valorar la mejora del comportamiento por ensayos habituales.
- Mejorar el conocimiento de una tecnología poco implantada hasta el momento en el mercado.
- Estudio del comportamiento del nuevo mortero/hormigón bajo diferentes condiciones.

En definitiva, el proyecto MORTY pertenece a la línea estratégica de Aplicaciones avanzadas de los materiales, en el marco de estudio y desarrollo de nuevas aplicaciones para materiales compuestos y modificados, estructuras aligeradas, resistencia al fuego, etc. En cuanto al alcance del proyecto, se quiere estudiar la preparación de morteros autorreparables con el fin de disminuir el coste de reparación en construcciones. El público objetivo es el sector de fabricación de morteros, la construcción y estructuras, como son empresas relacionadas con la construcción residencial, comercial, industrial, de obras públicas e institucionales, administradores de edificios. Además de servicios técnicos de arquitectura e ingeniería y otras actividades relacionadas con el asesoramiento técnico.

2 Desarrollo del proyecto. Actividades realizadas.

En el proyecto MORTY se ha llevado a cabo una exhaustiva búsqueda bibliográfica con el fin de estudiar y seleccionar microorganismos capaces de producir carbonato cálcico bajo las condiciones típicas del mortero. Además, se ha trabajado en aislar microorganismos que puedan sobrevivir en un ambiente con pH básico.

A continuación, se realizaron cultivos y se preparó el mantenimiento de las cepas seleccionadas, asegurando su viabilidad a largo plazo. También se prepararon cepas en forma de esporas para garantizar su resistencia a las adversas condiciones de pH y dureza del mortero.

Se evaluaron las cepas obtenidas para seleccionar aquellas con las mejores características carbonatogénicas y de viabilidad. Además, se investigó la manera óptima de agrietar los morteros y prepararlos en cuanto a tamaño, condiciones y tipo de material utilizado.

Por último, se diseñaron métodos para ensayar las muestras agrietadas, con el fin de evaluar la reparación producida a lo largo del tiempo. También se exploraron técnicas para analizar la reparación de las grietas, utilizando microscopía estereoscópica combinada con análisis de imagen, así como microscopía electrónica de barrido con detector de rayos X.

3 Resultados obtenidos.

3.1. Microorganismos carbonatogénicos.

A la hora de seleccionar microorganismos para preparar el mortero autorreparable, es importante tener en cuenta que, durante el curado, la viabilidad de estos seres vivos se reducirá debido a las condiciones ambientales de presión, pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno [9]. Las especies bacterianas formadoras de esporas serán las que soporten condiciones extremas [10], por ello se seleccionaron bacterias con estas características para introducir en mortero en este proyecto. Estas bacterias son capaces de pasar de estado activo al estado latente de forma de esporas según las condiciones ambientales, como pueden ser la falta de nutrientes, temperatura o pH desfavorables [11]. En el caso de mezclarlas en mortero, una vez entren en contacto con el exterior con unas condiciones idóneas para su crecimiento y supervivencia, romperán el estado de latencia y se reactivan, llevando a cabo su metabolismo. Que en este caso buscamos que produzcan carbonato cálcico, material que irá depositándose en las grietas.

En estudios realizados con bacterias formadoras y no formadoras de esporas en hormigón, se ha observado que las esporuladas tienen mayor resistencia [12]. Otra manera de aumentar la supervivencia de estas especies sería mediante encapsulación previa a la adición en el mortero [11].

Sin embargo, la utilización de encapsulación tiene la problemática de que deben abrirse fácilmente en el momento adecuado y liberar las esporas al medio para que hagan su trabajo. Además, tienen que ser suficientemente duros como para soportar la dureza del mortero. Tampoco deben absorber los componentes del mortero ya que afecta a la viabilidad de las bacterias del interior. Esto supone un aumento en el costo de la producción del mortero. Es por ello por lo que se terminaron seleccionando especies que produzcan su propia cubierta protectora, es decir que formen endosporas para soportar las condiciones adversas del medio en el que se encuentran.

En cuanto a las especies con capacidad carbonatogénica, existen 5 rutas metabólicas en la formación de carbonato: 3 anaeróbicas; mediante oxidación de metano y desnitrificación y reducción de sulfatos y dos aerobias que son las más utilizadas y en las que nos vamos a centrar, la amonificación y la ureólisis. Son más procesos más simples [13].

Las bacterias ureolíticas tienen enzimas ureasas que catalizan la hidrólisis de la urea para producir amoníaco, dióxido de carbono e iones hidróxido. Tras el aumento de este último compuesto el pH aumenta, y el dióxido de carbono forma iones carbonato, que combinados con calcio forman carbonato cálcico. Son las más estudiadas [13].

Las no ureolíticas como las que tienen metabolismo de la amonificación produce la descomposición de aminoácidos en carbonatos. Precipitan carbonato cálcico de manera activa como resultado del intercambio de iones en la membrana celular y la activación de bombas de calcio combinadas con la producción de iones carbonato [13].

De entre las especies bacterianas estudiadas en la bibliografía se encontraron *Sutcliffiella cohnii* DSM6307 [14], *Alkalihalophilus pseudofirmus* DSM 8715 [15, 16], *B. alkalisediminis* K1-25, *B. pseudomycooides* DSM 12442 [17], *B. aerius* [18], *B. subtilis* [19], *B. cereus* [20], *B. megaterium* [21], *Sporosarcina pasteurii* DSM 33 [16, 15], *Myxococcus xanthus* CECT 422 [22] y las especies fúngicas *Trichoderma reesei* DSM 768 [23], se seleccionaron 4 especies bacterianas y 1 fúngica (Figura 1;Tabla 1):

Tabla 1 Especies carbonatogénicas seleccionadas para ensayar con morteros.

<i>Sporosarcina pasteurii</i> DSM 33.
<i>Alkalihalophilus pseudofirmus</i> DSM 8715.
<i>Sutcliffiella cohnii</i> DSM 6307.
<i>Myxococcus xanthus</i> CECT 422.
<i>Trichoderma reesei</i> DSM 768.

Estas especies seleccionadas son de grupo de riesgo 1 es decir, no suponen ningún tipo de peligro para la salud. Una vez recibidas se cultivarán en el medio de cultivo recomendado por el distribuidor. Una vez activas se realizará el mantenimiento de las especies en glicerol para guardar a -20°C.



Figura 1 Cepas recibidas de la colección alemana de cultivos tipo.

Asimismo, se aislaron muestras de agua a pH-10 utilizada en el lavado de material usado para preparar hormigón. En medios TSA, M3P, Urea y LBA sólido. Las cepas aisladas se identificaron para comprobar la posible utilización en morteros. Para ello se utilizaron cebadores de un fragmento del gen rRNA 16S; 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3'). Así como reactivos de Thermofisher (polimerasa, tampones de carga, agarosa, tinte de ADN, etc.). Se obtuvieron las especies: *Microbacterium sediminis*, *Terribacillus saccharophilus*, *Dietzia sp*, *Microbacterium aurantiacum*.

3.2. Cultivo y mantenimiento.

Una vez recibidas las cepas se procedió a reactivarlas. Para ello fue necesario preparar medio de cultivo líquido y sólido para cada especie.

En el caso de las especies *A. pseudofirmus* DSM 8715 y *S. cohnii* DSM 6307 el medio de cultivo recomendado por el distribuidor (Figura 2) tiene la siguiente formulación:

Tabla 2 Reactivos para la preparación del medio de *A. pseudofirmus* DSM 8715 y *S. cohnii* DSM 6307.

Reactivo	Concentración
Peptona	5 g/L
Extracto de carne	3 g/L
Agar (Medio sólido)	15 g/L

Para preparar medios para favorecer la esporulación se añadieron 10 mg/L de MnSO₄. Además, tras la esterilización se añade sesquicarbonato de sodio 1M estéril a razón de 1 mL en 10mL para alcanzar un pH de 9,7.

Sesquicarbonato de sodio 1M:

Tabla 3 Reactivos para la preparación de sesquicarbonato de sodio.

Reactivo	Concentración
NaHCO ₃	4,2 g/100mL
Na ₂ CO ₃ anhidro	5,3 g/100mL

Esta solución se esteriliza con filtro de 0,22µL y se añade después de la

esterilización en autoclave.

En el caso de la especie *Sporosarcina pasteurii* DSM 33 se cultiva en un medio TSA comercial al que se añade urea:

Tabla 4 Reactivos para la preparación del medio de *Sporosarcina pasteurii* DSM 3.

Reactivo	Concentración
Peptona de caseína:	15 g/L.
Peptona de soja:	5 g/L.
Cloruro sódico:	5 g/L.
Agar:	15 g/L.
Urea:	20g/L.

Se añadió agua destilada y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Para la esporulación se preparó un medio con MnSO₄ hasta observar un 95% de esporulación en un microscopio óptico. En caso de que no funcionase se preparó una solución de NaCl de 9 g/L, donde las bacterias esporulan por falta de alimento. Se cultivaron a 30°C durante 14 días.

En el caso de *Myxococcus xanthus* CECT 422, se utiliza un medio de cultivo con la siguiente formulación:

Tabla 5 Reactivos para preparar el medio de *Myxococcus xanthus* CECT 422.

Reactivo	Concentración
Casitona (digestión enzimática pancreática de origen animal)	3 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,36 g/L
Agar (en medio solido)	15 g/L

El medio debe estar a pH 7,2. Se esterilizó a 121°C durante 20 minutos.

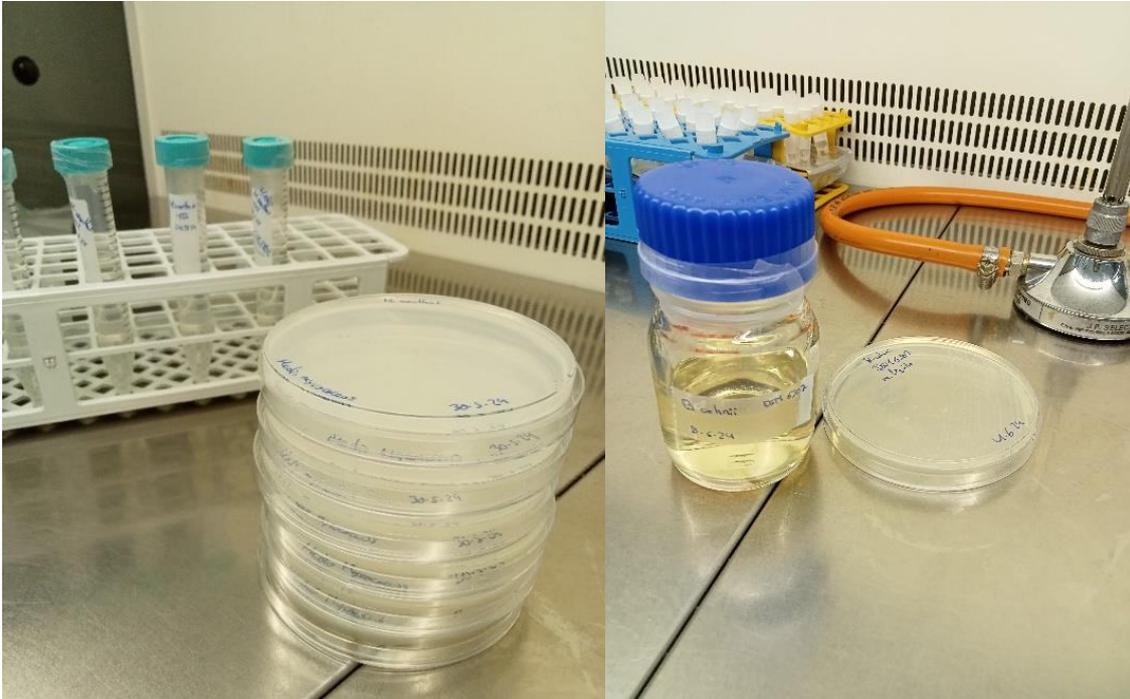


Figura 2 Medios de cultivo sólido y líquido para las cepas bacterianas recibidas.

En el caso de *Trichoderma reesei* DSM 768, se utiliza un medio PDA comercial con la siguiente formulación:

Tabla 6 Reactivos para preparar el medio de cultivo de *T. reesei* DSM 768.

Reactivo	Concentración
Peptona de patata.	4 g/L
Glucosa dextrosa	20 g/L
Agar	15 g/L

Como medio líquido se utilizó una solución de Extracto de malta al 3%. Estos se esterilizaron durante 20 minutos a 121°C. Y se enfriaron a 45°C, en caso de que tuviesen agar, para posteriormente verterlos.

Una vez preparados los medios de cultivo se abren los viales de cada especie uno a uno (Figura 3) para ello se trabajó en una cabina de flujo en ambiente estéril. Se utilizó una llama y tres gotas de agua destilada estéril fría para para resquebrajar el vidrio del vial. Posteriormente con unas pinzas estériles se sacaron los viales de dentro en el caso

de aquellas especies que estaban protegidas por dos viales. A continuación, se hidrató el liofilizado con 300µL de medio de cultivo líquido indicado para cada especie y se dejó hidratando durante 30 minutos. Pasado este tiempo se inocularon en tubos con medio de cultivo 50 µL del organismo hidratado, además de inocularlo en medio de cultivo sólido. Posteriormente se incubaron las placas en una cámara de cultivo. En el caso de *S. pasteurii*, *A. pseudofirmus*, *S. cohnii* se cultivaron a 30°C durante 24 horas. *M. xanthus* se cultivó a 26°C durante 6 días y *T. reesei* se cultivó a 25°C durante 12 días.

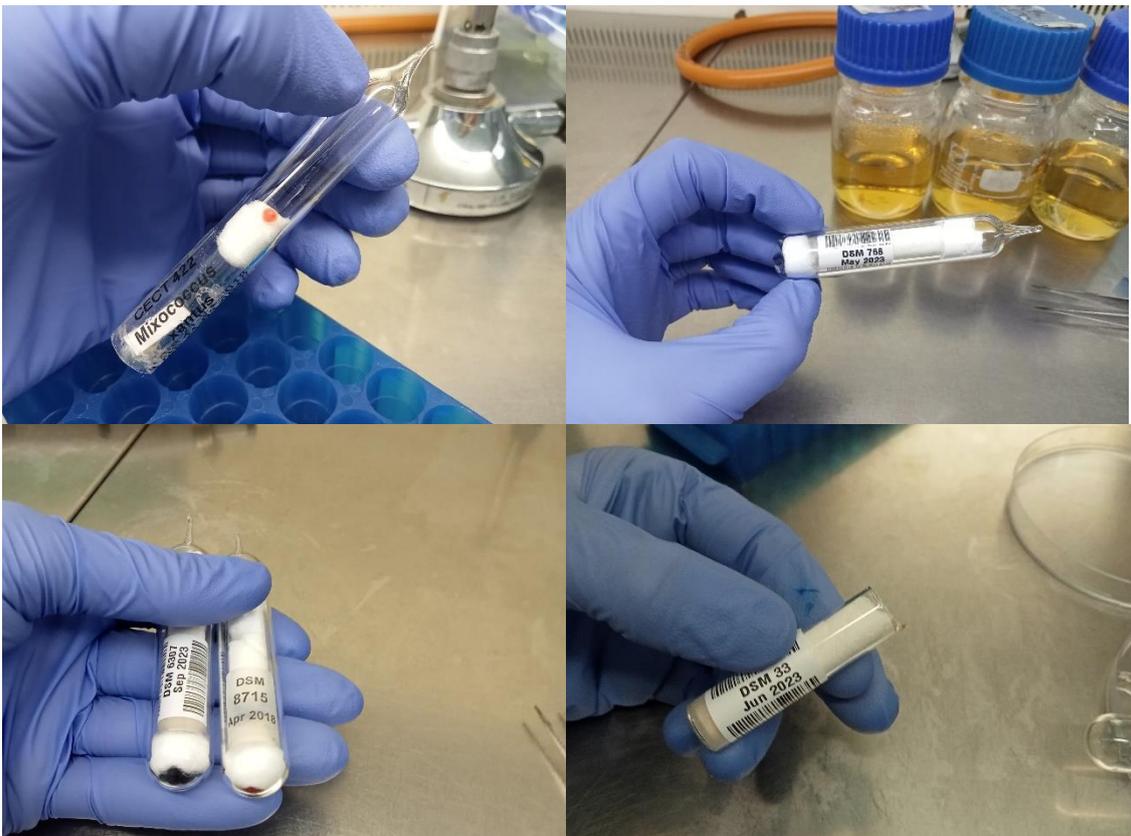


Figura 3 Viales de vidrio con las cepas recibidas, abierto en condiciones esteriles de cabina de flujo laminar.

Posteriormente se realizaron cultivos en medio líquido para añadir 500 µL en criotubos de glicerol de 2 mL con agua mili-Q y glicerol a partes iguales (500µL+500µL) esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Estos viales se guardaron en un congelador a -20°C para su mantenimiento y conservación a largo plazo (Figura 4).

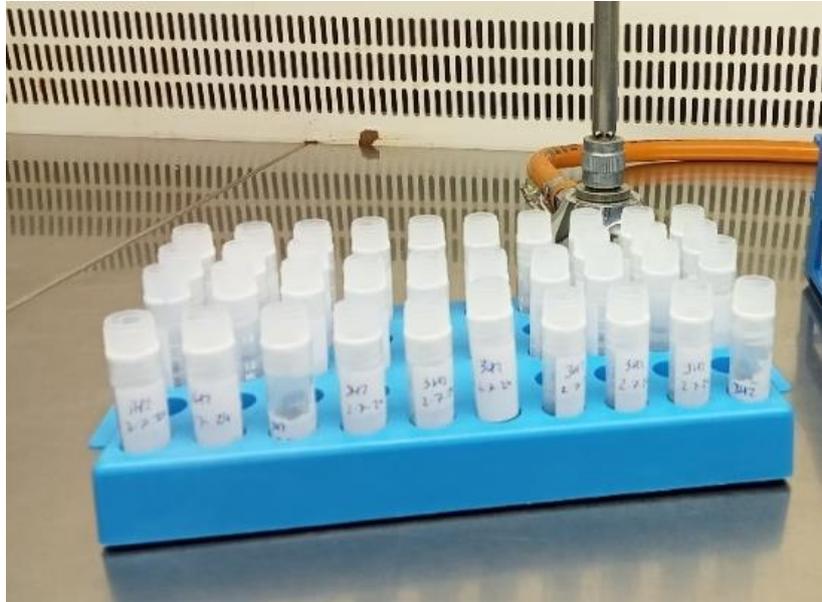


Figura 4 Criotubos con agua mili-Q y glicerol para el mantenimiento de las cepas recibidas.

3.3. Adecuación de las especies seleccionadas al mortero. Evaluación de la precipitación de carbonato cálcico.

Como se ha mencionado anteriormente, la formación de endosporas por parte de las bacterias les confiere resistencia a condiciones adversas, como por ejemplo en este caso, es interesante que las especies soporten las condiciones del mortero, de pH elevado, presión y disponibilidad de oxígeno. Por ello se inducirá la producción de endosporas en las especies seleccionadas, para utilizarlas en el mortero y asegurar su viabilidad dentro del mismo, además de a largo plazo.

Para ello se prepararon medios de cultivo de esporulación, mediante la adición de 10 mg/L de $MnSO_4$ al medio de cultivo de cada especie. Todos estos medios se prepararon en tubos de ensayo de vidrio y el medio se dejó solidificar inclinándolos.

Se inocularon los medios de esporulación y se incubaron durante 15 días, hasta observar un 99% de esporulación. Posteriormente se prepararon soluciones de esporas, se añadió temperatura a 80°C para eliminar las células vegetativas. Se realizaron lavados por centrifugación 4 veces a 10000rpm durante 10 minutos. A continuación, se realizaron controles de viabilidad y conteo de las soluciones de esporas preparadas. Estas soluciones se utilizaron para realizar mantenimiento de las cepas en criotubos y para inocular en medios para estudiar la formación de carbonato cálcico por parte de las bacterias. Se observaron las soluciones de esporas al microscopio para comprobar el porcentaje de esporulación. Las especies *B. pseudofirmus* y *B. pasteurii* no eran tan eficaces en la esporulación mediante este método, ya que requerían más tiempo para esporular (Figura 5).

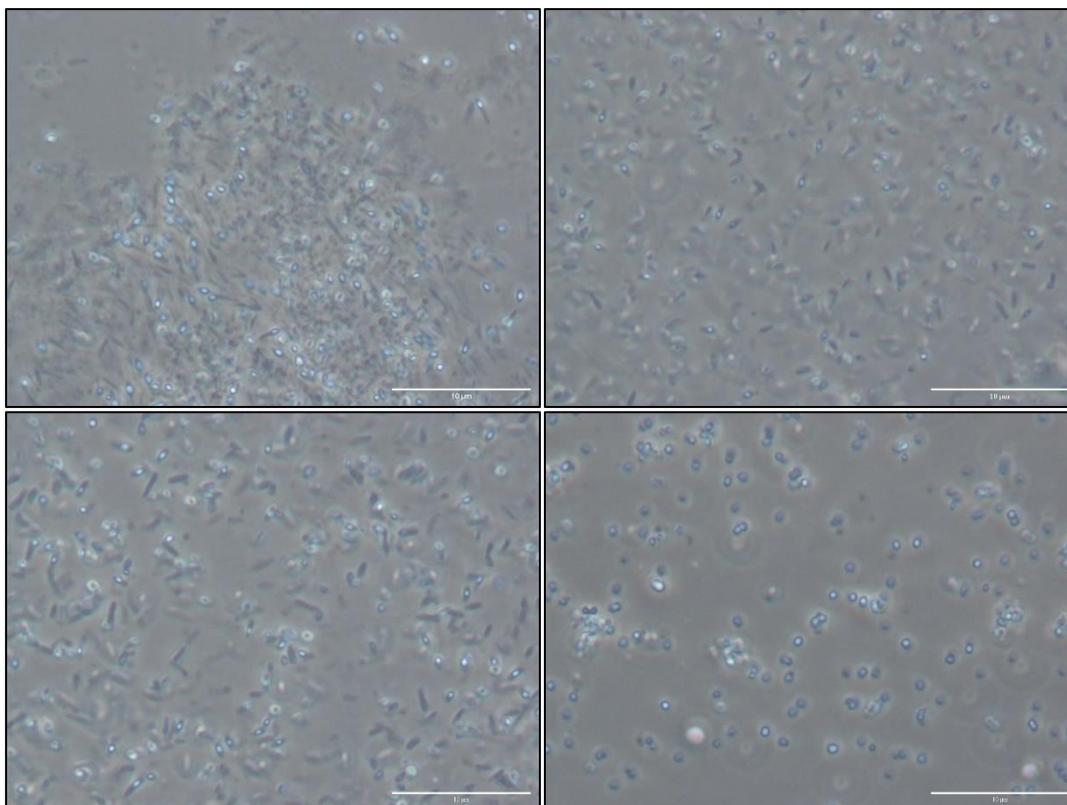


Figura 5 Imagen de la esporulación al microscopio a 1.000 aumentos (1:1000) de *B. cohnii* (arriba izquierda), *B. pasteurii* (arriba derecha), *B. pseudofirmus* (inferior izquierda) y *M. xanthus* (superior derecha).

Por otro lado, con el fin de comprobar la efectividad de las bacterias en ensayos in vitro en condiciones controladas de laboratorio, y poder seleccionar aquellas óptimas en la formación de cristales, se prepararon medios para comprobar la precipitación de carbonato cálcico:

- a. El medio LBA (LB + acetato de calcio) para comprobar la precipitación de calcita producida por las bacterias *B. cohnii* y *B. pseudofirmus*, con la siguiente formulación:

Tabla 7 Reactivos para preparar el medio LBA.

Reactivo	Concentración
Triptona	1g/L
Extracto de levadura	5g/L
NaCl	1g/L

Reactivo	Concentración
Acetato de calcio	2,5g/L

El medio se ajustó a pH 8 con NaOH.

- b. Otro medio para medir la reacción de conversión de calcio insoluble para *B. pasteurii* es:

Tabla 8 Reactivos para preparar el medio de conversión de calcio insoluble de *B. pasteurii*.

Reactivo	Concentración
Urea	12g/L
Cloruro de calcio	22 g/L

Por último, el medio **M3P** para la bacteria *M. xanthus*:

Tabla 9 Reactivos para la preparación del medio M3P de *M. xanthus*.

Reactivo	Concentración
Casitona (Tryptona)	10 g/L
Ca(CH ₃ COO) ₂ ·4H ₂ O (acetato de calcio).	10g/L
K ₂ CO ₃ ·½H ₂ O	2g/L
Agar (Medio sólido)	20g/L
Tampón fosfato 10 mM.	1L

El medio se ajustó a pH 8. Esterilizado a 121°C 20 minutos.

Se prepararon Tubos de 50mL con 10mL del medio de cultivo LBA para la cuantificación de precipitación de calcita. El medio LBA se inoculó con las cepas bacterianas *B. cohnii* y *B. pseudofirmus*, el medio TSA+Urea se inoculó con *B. pasteurii* y el medio M3P se inoculó con *M.xanthus*.

En el caso de las especies *B. pasteurii*, *B. cohnii* y *B. pseudofirmus*, transcurridos 21

días, se tomaron muestras de 3 cultivos, se centrifugaron a 8.000rpm durante 10 minutos y los pellets se lavaron una vez con LB 1/10 (sin acetato de calcio) y un par de veces con agua destilada estéril, el pellet lavado se filtró en Whatman Filter Paper Nº2 con tamaño de poro de 8 μm . Sin embargo, no se obtuvieron cristales debido a que las cepas no los habían producido. Los cristales de la membrana se hubiesen recogido y lavado tres veces con agua destilada después se hubiesen secado al aire. En todos los casos, se hicieron controles en un medio sin inocular.

En el caso del estudio de precipitación de calcita por parte de *M. xanthus*. Se observó formación de cristales a diferencia de los medios control. Para ello se observó que si existía formación de cristales de carbonato cálcico mediante microscopía óptica. Asimismo, estos fueron estudiados en microscopio de barrido electrónico conectados a un analizador de rayos X (SEM-EDX). En la Figura 7 y 8 se muestra la imagen de uno de los precipitados estudiado en el microscopio óptico y del microscopio de barrido. Se midió el tamaño del cristal mediante el programa Image J, obteniendo valores de 1,77mm de largo y 0,7mm de ancho. También se midió el tamaño de la espora de *M. xanthus* la cual mide 1,2 μm .

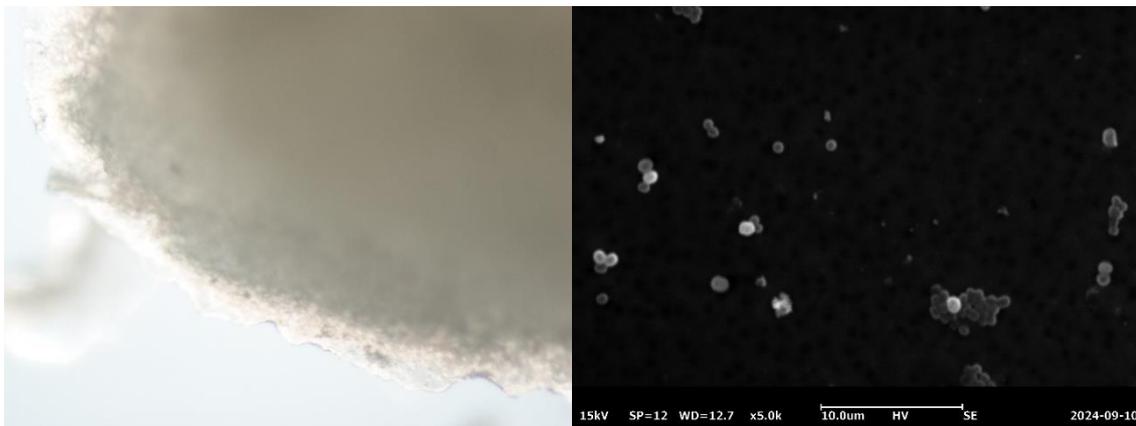


Figura 6 Cristal de carbonato cálcico producido por *M. xanthus* en medio de cultivo M3P observado en microscopio óptico (izquierda). Esporas de la bacteria *M. xanthus* observada en el SEM (derecha).

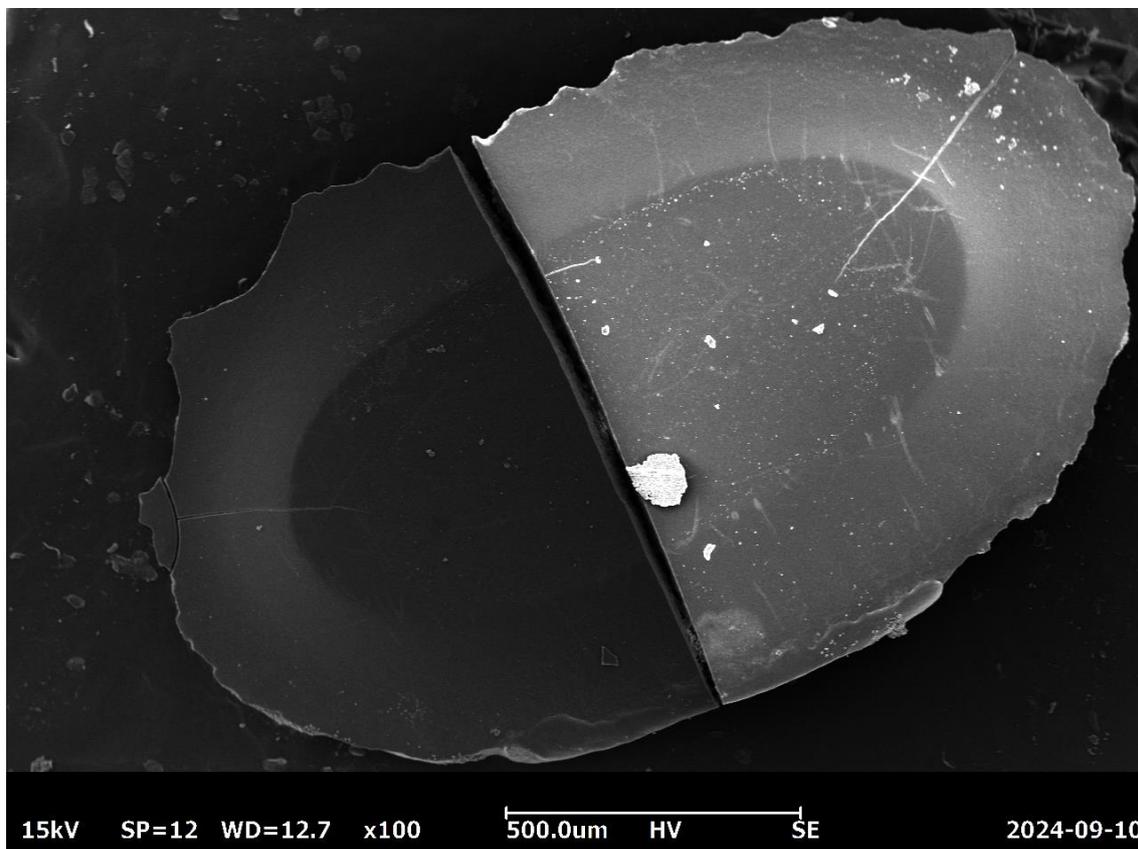


Figura 7 Cristal de carbonato cálcico producido por *M. xanthus* en medio de cultivo M3P observado en SEM.

Tras el análisis EDX del precipitado producido por la bacteria *M. xanthus* se obtuvieron resultados de presencia de Carbono, Oxígeno, Calcio en mayor cantidad, tal y como se observa en los picos de la gráfica de la Figura 8 y en los resultados obtenidos, de porcentaje de peso y atómico de la Tabla 10. Estos 3 compuestos son los principales formadores del carbonato cálcico. También se observó presencia de fósforo y flúor en menores cantidades. En medio líquido no se observó producción de cristales.

En el caso del hongo *T. reesei* se cultivó en medio PDA con urea, lactato de calcio ajustado a pH 8, pero no se observó crecimiento, posiblemente debido al elevado pH.

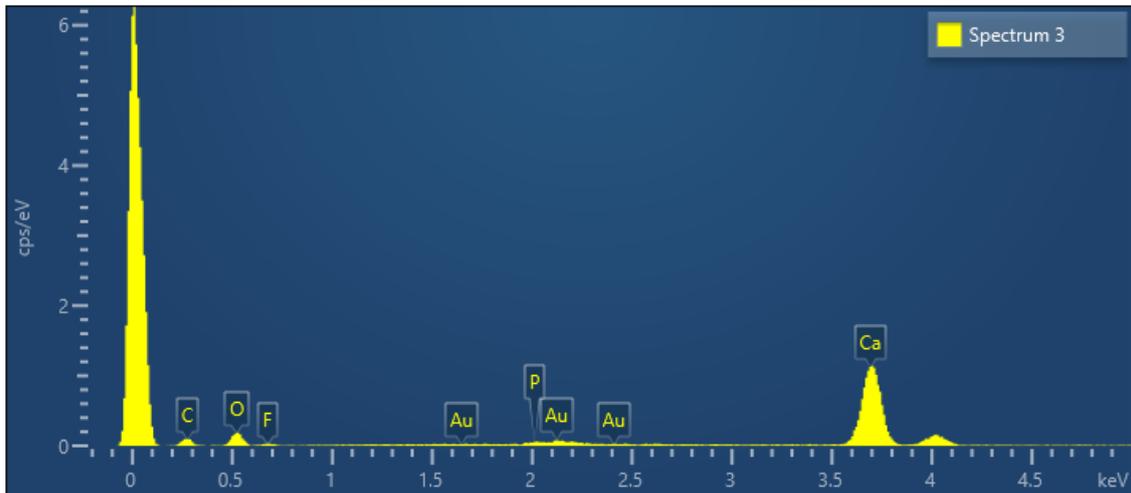


Figura 8 Espectro resultado del análisis del precipitado producido por la bacteria *M. xanthus*, realizado con el analizador de rayos X acoplado al microscopio óptico de barrido.

Tabla 10 Resultados del análisis EDX del precipitado producido por *M.xanthus*.

<i>Elemento</i>	<i>Peso %</i>	<i>Peso atómico %</i>
<i>C</i>	26.23	37.83
<i>O</i>	41.63	45.08
<i>F</i>	6.56	5.98
<i>P</i>	0.45	0.25
<i>Ca</i>	25.14	10.87
<i>Total</i>	100.00	100.00

3.4. Preparación del mortero y fractura.

Inicialmente se prepararon 4 litros (8kg) de muestras de mortero de 40mm x 40mm x 160mm de acuerdo con la norma BS EN 196-1. Se utilizó un cemento Portland Fly Ash Cement, CEM II/ B-L 32.5R. Se utilizó agregado hasta 3-4mm de diámetro. Se añadieron 5,3 kg de arena, 900mL de agua y 1,8 kg de cemento y se mezcló en una amasadora, tal y como se muestra en la Figura 9 [3].



Figura 9 Preparación del mortero en un mezclador (imagen izquierda). Pesado del cemento (imagen derecha).

Esta se separó en 4 partes de 2kg (1L) cada una en diferentes recipientes (proporciones en la Tabla 11), donde cada parte pertenecía a un tipo de mortero:

1. Una de ellas fue el control al que se añadieron 25 ml más de agua (C).
2. Una fracción de los litros era otro control al que se añadió 10 g de lactato de calcio y 25 mL más de agua (CL).
3. Una tercera fracción inoculada, a la que se añadió 10 g de lactato y 25 mL de solución de esporas de *B. cohnii* a concentración $2 \cdot 10^9$, por lo que la concentración final de bacterias es de $5 \cdot 10^7$ UFC/mL (Bc).
4. Se realizó una fracción también inoculada con otra especie bacteriana, a la que se añadió 10 g de lactato y 25 mL de solución de esporas de *M.xanthus* a concentración $1 \cdot 10^8$ UFC/mL, por lo que la concentración final de bacterias es de $2,5 \cdot 10^6$ UFC/mL (Mx).
5. Por último, se preparó un mortero aparte inoculado con 25 mL de una mezcla de esporas de las dos bacterias anteriores a la misma concentración que en los anteriores casos. A este mortero también se le añadió 10g de lactato.

Tabla 11 Formulación de las muestras de mortero preparadas. Control (C), Control con lactato de calcio (CL), Mortero inoculado con *B. cohnii* (Bc) y mortero inoculado con *M. xanthus* (Mx).

Tipo de muestra	Arena (g)	Agua (mL)	Cemento (g)	Lactato de calcio (g)	Agua (mL)	<i>B.cohnii</i> (mL)	<i>M. xanthus</i> (mL)
C	1325	225	450	-	25	-	-

Tipo de muestra	Arena (g)	Agua (mL)	Cemento (g)	Lactato de calcio (g)	Agua (mL)	<i>B.cohnii</i> (mL)	<i>M. xanthus</i> (mL)
CL	1325	225	450	10	25	-	-
Bc	1325	225	450	10	-	25	-
Mx	1325	225	450	10	-	-	25
MxBc	1325	225	450	10	-	12,5	12,5

Cada tipo de muestra de mortero se vertió en 3 moldes de 40mm x 40mm x 160mm de cada tipo de muestra. Se colocó una lámina de cobre de 0,5mm para asemejar una fractura en uno de los dos moldes de cada tipo de muestra, tal y como se muestra en la Figura 10 .

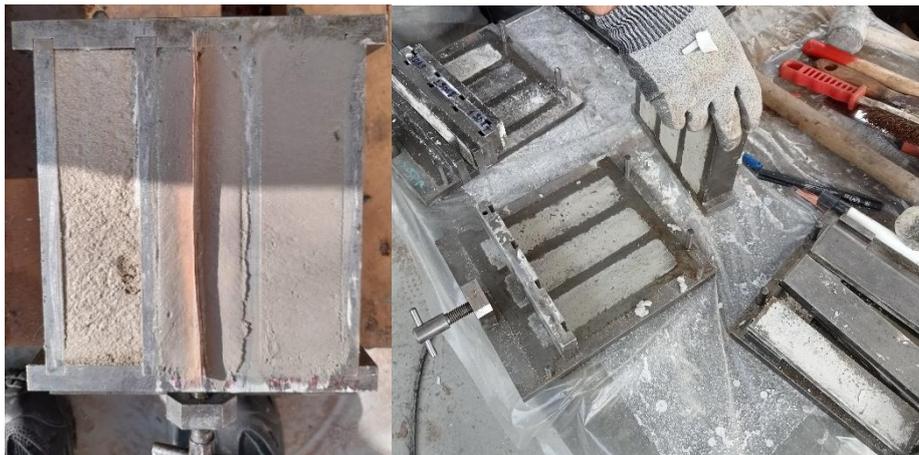


Figura 10 En la imagen izquierda molde de mortero de dimensiones 40mmx40mmx160mm con mortero y el del medio con una lámina de cobre para crear una fractura. En la imagen de la derecha desmolde de los morteros trascurridas 24 horas.

Las muestras de mortero se curaron durante 24 horas a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo se retiraron del molde (Figura 11) y se curaron a 100% de humedad inmersas en agua a 20°C durante 10 días como se observa en la Figura 12 [24]. Cada tipo de muestra se curó en recipientes diferentes con el fin de no mezclar el agua de curado con bacterias u otros compuestos que pudiesen migrar al agua de curado.

Por otro lado, uno de los moldes de mortero de cada tipo se curó en agua a 20°C durante 28 días. Para posteriormente utilizarlo como control en ensayos de absorción.



Figura 11 Muestras de mortero preparadas, control, control con lactato de calcio, inoculadas con *Bacillus cohnii* e inoculada con *Myxococcus xanthus*.

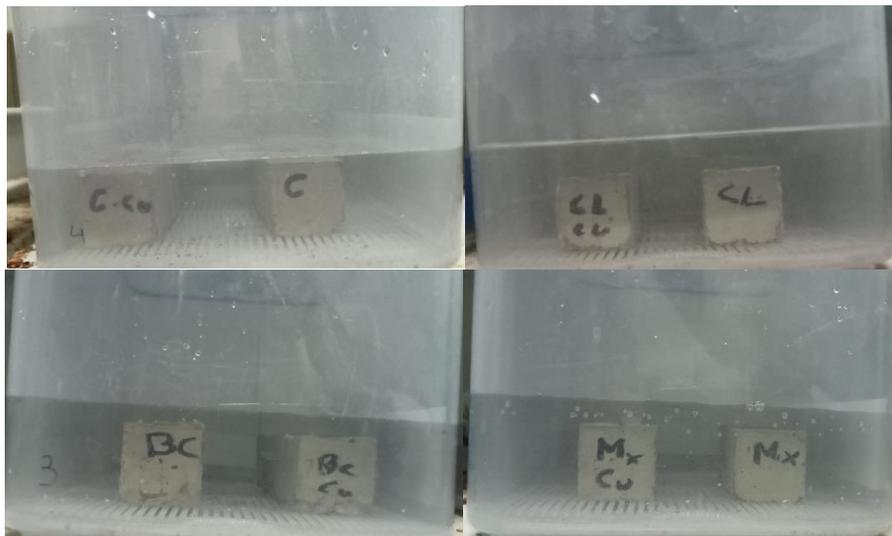


Figura 12 Muestras de mortero curando en condiciones de 100% de humedad a 20°C.

Pasado este tiempo se cortaron muestras de 40mm x 40mm x 5mm (Figura 13) y se fracturaron mediante aplicación de fuerza en tres puntos, con el equipo ZwickRoell. Por otro lado, las muestras agrietadas con una lámina de cobre no se les aplicó fuerzas externas debido a ya tenían una grieta.



Figura 13 Muestras de mortero de 40mm x 40mm x 5mm fracturadas con presión en tres puntos.

Posteriormente se procedió a ensayar los morteros para conseguir la autorreparación. Al inicio del ensayo se realizaron imágenes a tiempo 0 con una lupa tras la fractura de las muestras de mortero previo a su introducción en agua de curado a 20°C, posteriormente estas imágenes se trataron, midieron las grietas y añadió la escala mediante el programa Image J.

Se realizaron imágenes trascurridos 7, 14 y 28 días de curado de las muestras agrietadas. Posteriormente mediante el mismo programa Image J se binarizó y midió el área de las grietas a tiempo 0 y a tiempo 28 para comprobar el porcentaje de reparación mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Ratio de area reparada (\%)} = \frac{A_0 - A_{28}}{A_0} \times 100$$

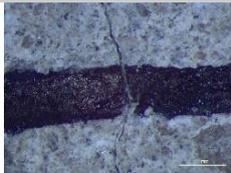
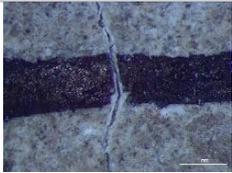
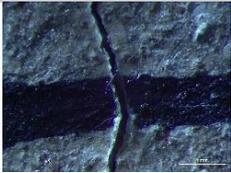
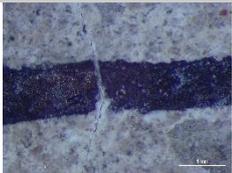
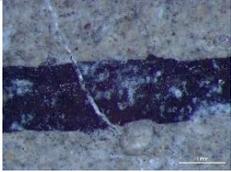
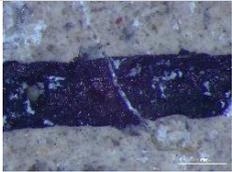
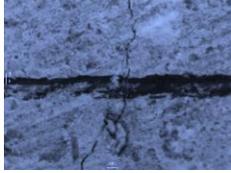
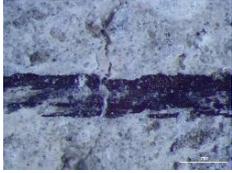
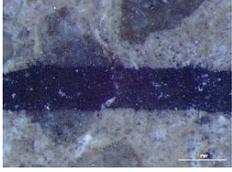
Donde A_0 es el número del área de la grieta antes de la reparación y A_{28} el área después de la reparación realizada durante 28 días [25].

3.5. Análisis de fractura.

Microscopio estereoscópico y SEM y FTIR

En cuanto a los resultados de la reparación de las muestras de mortero agrietadas, se observan las imágenes de los resultados de curado entre el día cero y el día 28 en la Tabla 12 las muestras control, en la Tabla 14 los resultados de curado de las muestras de mortero control con lactato, en la Tabla 16 las muestras de mortero con la bacteria *B. cohnii*, en la Tabla 18 los resultados de mortero con la bacteria *M. xanthus* y en la Tabla 20 los resultados del mortero con ambas bacterias.

Tabla 12 Evaluación de grietas realizadas por presión en 3 puntos en muestras Control de mortero trascurridos 0, 7, 14 y 28 días.

Muestra Control	Día 0	Día 7	Día 14	Día 28
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

Se observa en la Tabla 12 una precipitación blanca en las grietas trascurridos 28 días de ensayo en algunos fragmentos de las muestras control, conteniendo algunas de

las grietas diversos huecos sin precipitar. Esto puede deberse al proceso de curado del mortero. Asimismo, se realizaron imágenes en SEM, mostrada en la Figura 4 donde se observa presencia de carbono, oxígeno y calcio mostrado en los resultados del análisis EDX de la Tabla 13.

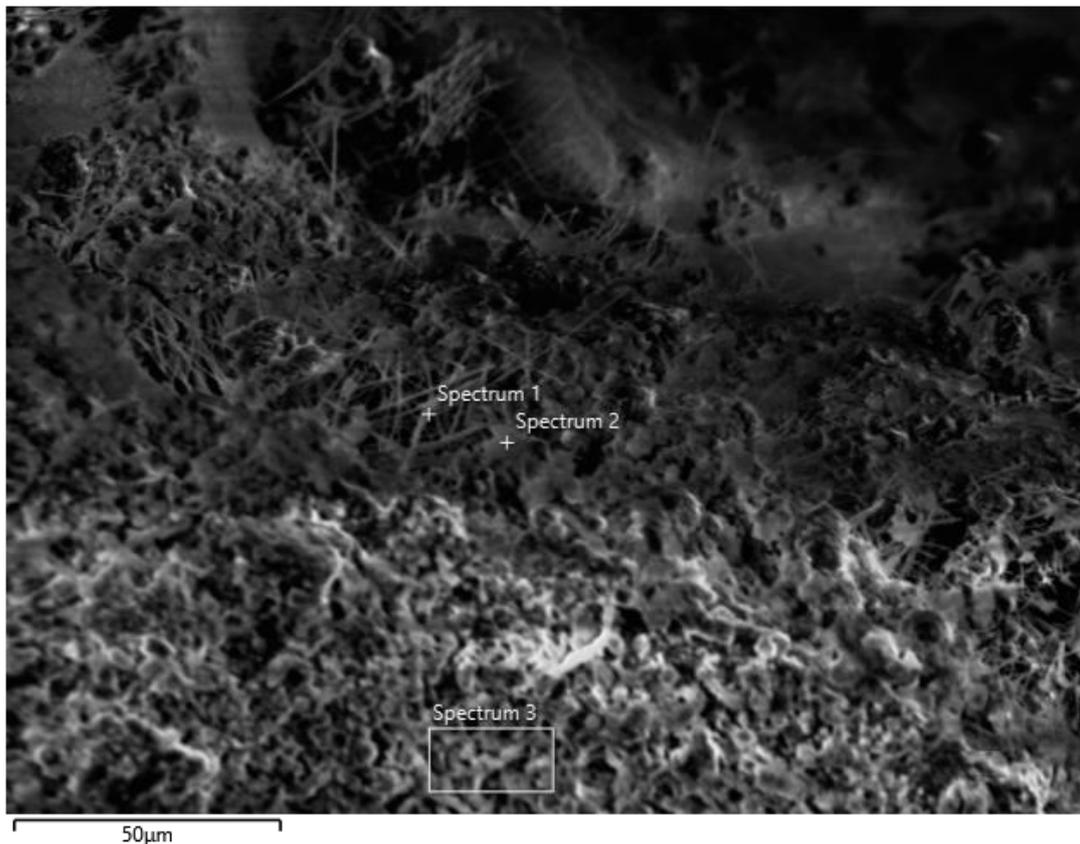
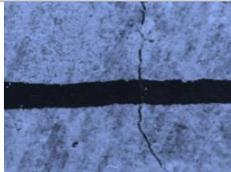
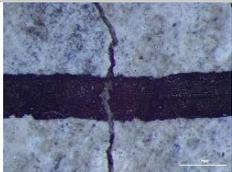
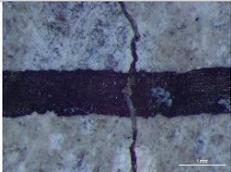
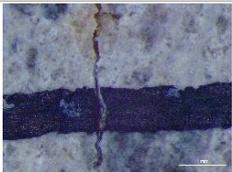
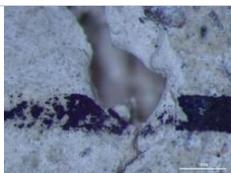
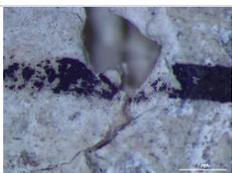
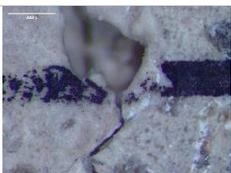
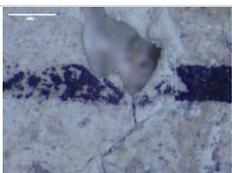
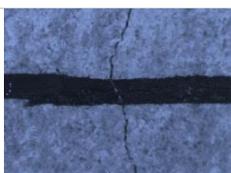
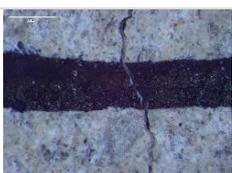
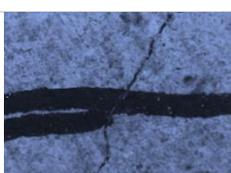
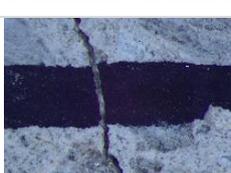
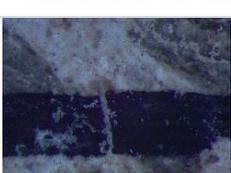


Figura 14 Imagen SEM de la grieta de una muestra de mortero Control donde se observa alguna formación cristalina.

Tabla 13 Elementos presentes y sus porcentajes en peso y atómicos en la grieta de una muestra de mortero Control.

Elemento	Peso %	Peso % Sigma	Atómico %
C	23.46	4.99	38.63
O	18.80	2.73	23.25
Mg	1.80	0.43	1.47
Al	37.71	2.84	27.65
Ca	18.23	1.64	9.00
Total	100.00		100.00

Tabla 14 Evaluación de grietas realizadas por presión en 3 puntos en muestras de mortero Control con Lactato de calcio trascurridos 0, 7, 14 y 28 días.

Muestra Control Lactato	Día 0	Día 7	Día 14	Día 28
1				
2				
3				
4				
5				
7				

En el caso de las muestras de mortero CL (Tabla 14) se observa menor precipitación en las grietas trascurridos 28 días de ensayo, de manera que se observan huecos en las grietas, exceptuando las muestras 4 y 7 que presentan ligeramente mayor precipitación. Asimismo, se realizaron imágenes en SEM mostrados en la Figura 15 donde se observa presencia de carbono, oxígeno y calcio mostrado en los resultados del análisis EDX de la Tabla 15.

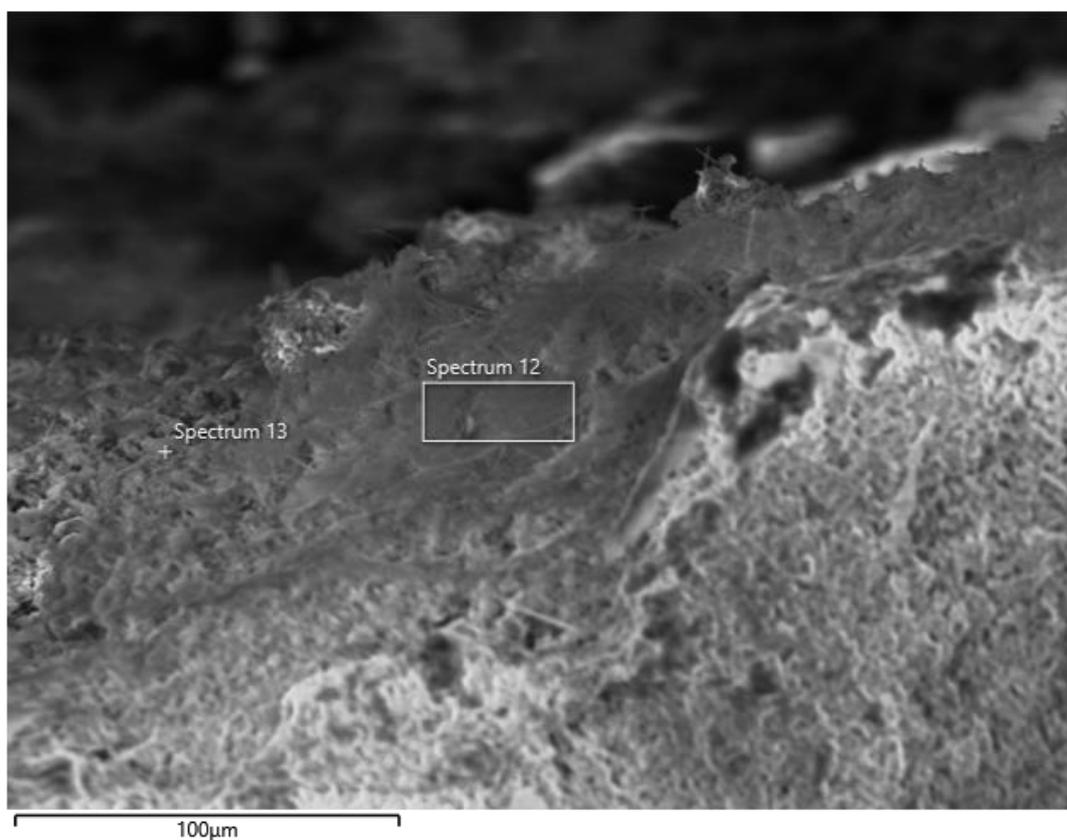
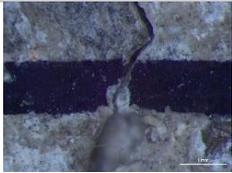
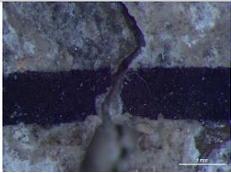
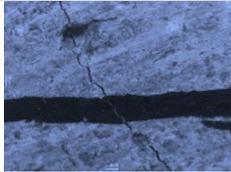
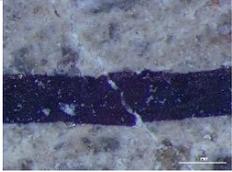
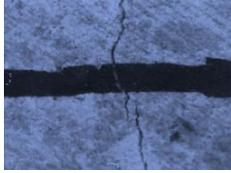
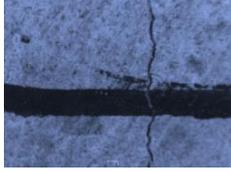
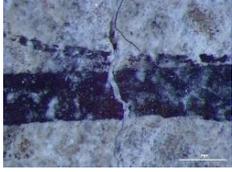
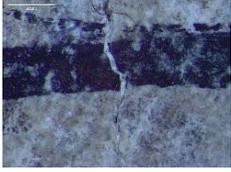
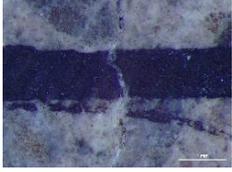
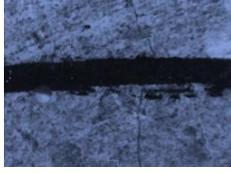
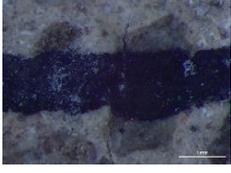


Figura 15 Imagen SEM de la grieta de una muestra de mortero Control Lactato.

Tabla 15 Elementos presentes y sus porcentajes en peso y atómicos en la grieta de una muestra de mortero Control Lactato.

Elemento	Peso %	Peso % Sigma	Atómico %
C	17.07	0.99	26.03
O	49.72	0.82	56.92
Mg	3.74	0.14	2.82
Al	3.05	0.11	2.07
Si	0.67	0.06	0.44
S	0.36	0.07	0.20
Ca	24.69	0.45	11.28
Fe	0.70	0.18	0.23

Tabla 16 Evaluación de grietas realizadas por presión en 3 puntos en muestras de mortero inoculados con *B. cohnii* trascurridos 0, 7, 14 y 28 días.

Muestra Bc	Día 0	Día 7	Día 14	Día 28
1				
2				
3				
4				
5				
6				

En el caso de las muestras de mortero con Bc mostradas en la Tabla 16 ensayadas durante 28 días se observa precipitación blanca en las grietas, aunque no en la totalidad de las grietas ya que se observan huecos en algunas de ellas. Asimismo, se realizaron imágenes en SEM mostrada en la Figura 16, posteriormente se hizo análisis EDX donde se observa presencia de carbono, oxígeno y calcio, presente en la Tabla 17.

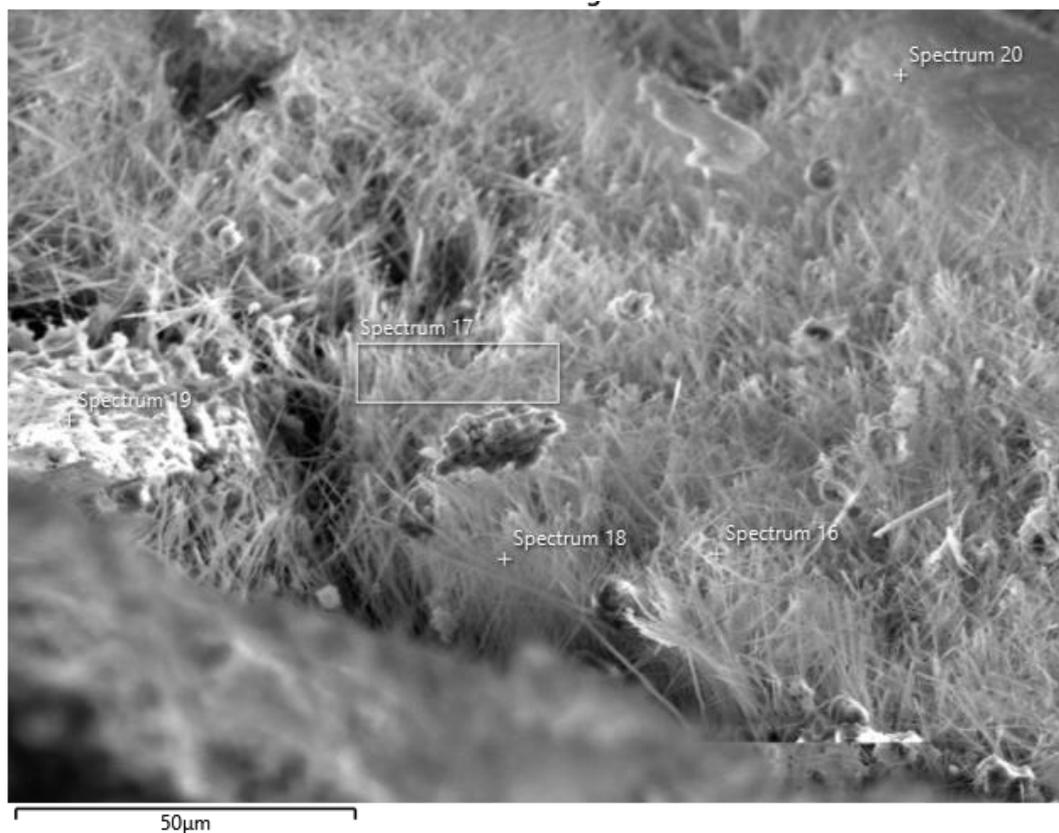
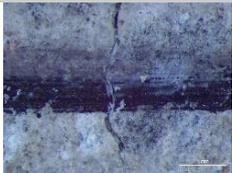
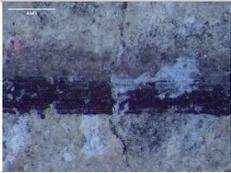
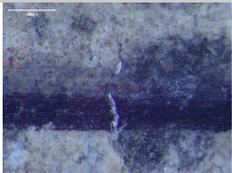
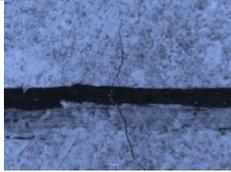
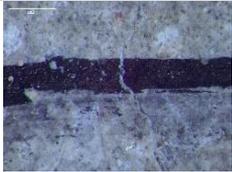
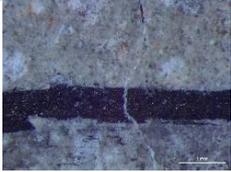
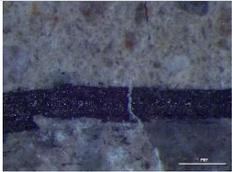
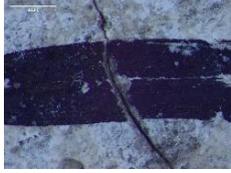
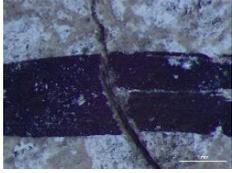
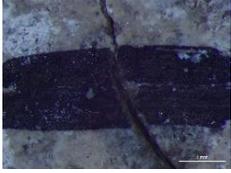
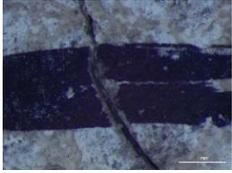
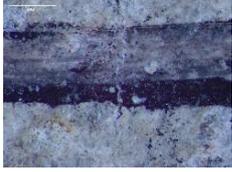
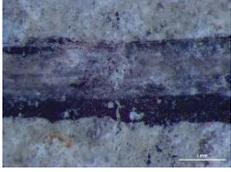
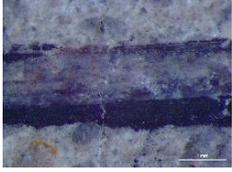
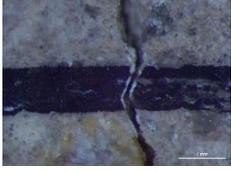
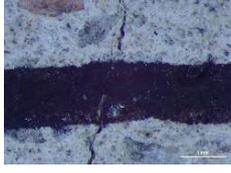
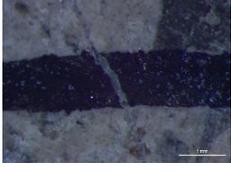
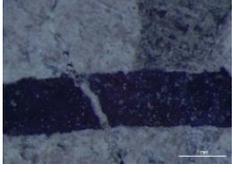


Figura 16 Imagen SEM de la grieta de una muestra de mortero con *B. cohnii*.

Tabla 17 Elementos presentes y sus porcentajes en peso y atómicos en la grieta de una muestra de mortero con *B. cohnii*.

Elemento	Peso %	Peso % Sigma	Atómico %
C	12.32	0.99	19.19
O	48.74	0.80	57.02
F	7.00	0.55	6.89
Mg	4.47	0.14	3.44
Al	0.98	0.08	0.68
Si	2.35	0.09	1.57
K	0.23	0.06	0.11
Ca	23.39	0.42	10.92
Fe	0.51	0.14	0.17

Tabla 18 Evaluación de grietas realizadas por presión en 3 puntos en muestras de mortero inoculados con *M. xanthus* trascurridos 0, 7, 14 y 28 días.

Muestra Mx	Día 0	Día 7	Día 14	Día 28
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

En cuanto a morteros con la bacteria Mx cuyas imágenes están en la Tabla 18, se observa que las grietas están prácticamente blancas debido a la precipitación, producida

probablemente por las bacterias, dejando muy pocos huecos. Asimismo, se realizaron imágenes en SEM de la Figura 17 donde tras realizar el análisis EDX se observa presencia de carbono, oxígeno y calcio en la Tabla 19.

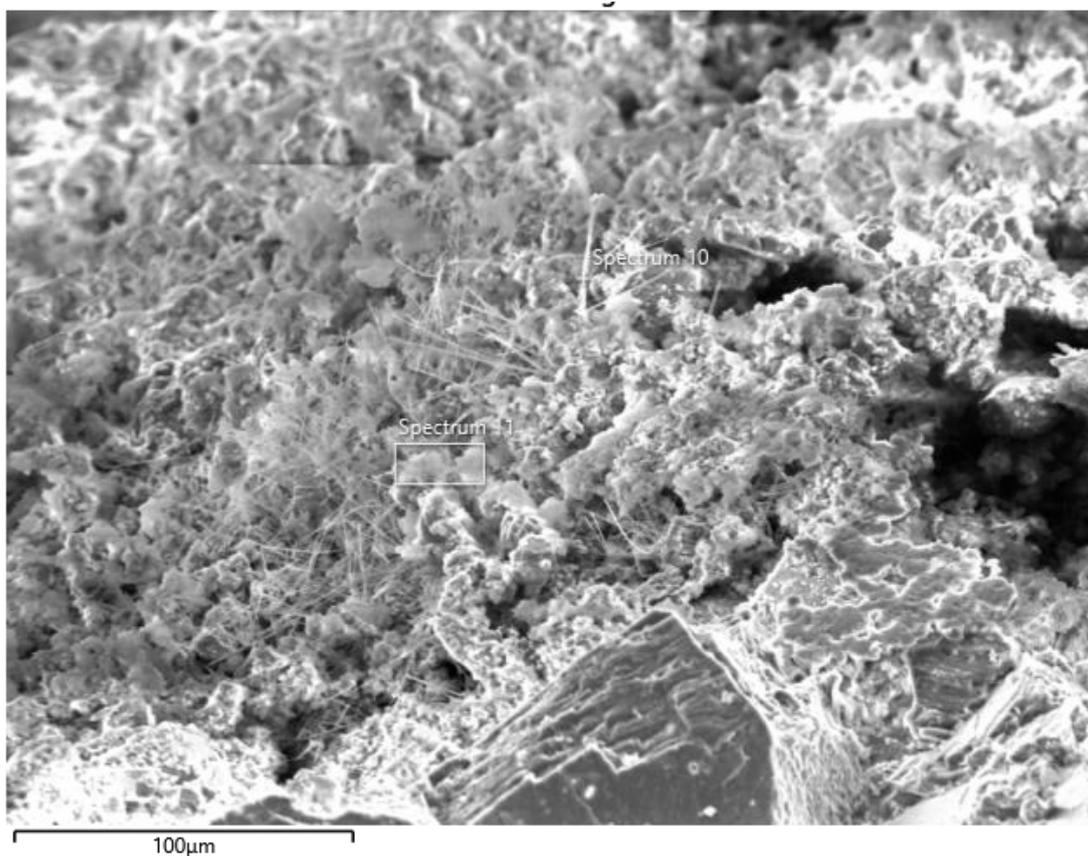


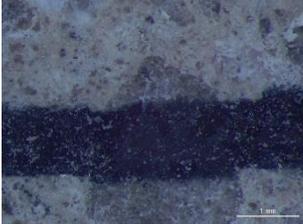
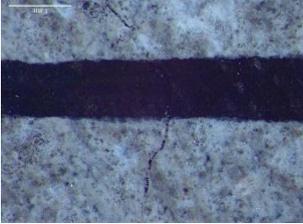
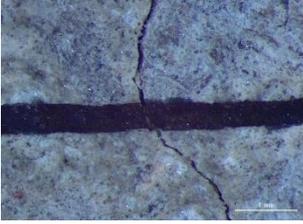
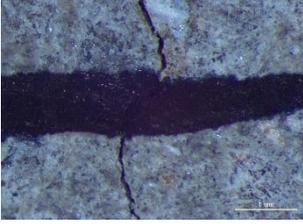
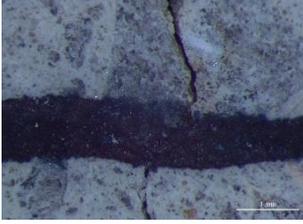
Figura 17 Imagen SEM de la grieta de una muestra de mortero con *M. xanthus*.

Tabla 19 Elementos presentes y sus porcentajes en peso y atómicos en la grieta de una muestra de mortero con *M. xanthus*.

Elemento	Peso %	Peso % Sigma	Atómico %
C	13.21	0.82	19.45
O	53.92	0.66	59.61
F	6.34	0.43	5.90
Mg	9.40	0.17	6.84
Al	1.60	0.07	1.05
Si	1.32	0.06	0.83
S	0.38	0.06	0.21

Elemento	Peso %	Peso % Sigma	Atómico %
Ca	13.84	0.22	6.11

Tabla 20 Evaluación de grietas realizadas por presión en 3 puntos en muestras de mortero inoculados con *M. xanthus* trascurridos 0, 7, 14 y 28 días.

Muestra MxBc	Día 0	Día 28
1		
2		
3		
4		
5		

En las muestras de mortero con las dos especies bacterianas seleccionadas se observa casi una completa reparación en donde es difícil encontrar la grieta, como por ejemplo en las muestras 1 y 2. Sin embargo, en la muestra 5 no se observa apenas precipitado, es posible que se deba a que tenga un diámetro mayor (Tabla 20).

En el agua de curado de estas muestras se produjo una lámina de precipitado de carbonato cálcico sobre la superficie (Figura 18). Es posible que en otras condiciones de ensayo todo este precipitado se hubiese producido en las grietas, incluso llegando a reparar la grieta de la muestra 5. En futuros estudios se podría optimizar el método de ensayo de la reparación por parte de una sinergia de estas dos bacterias, ya que se ha observado una ligera mejora trabajando en conjunto respecto a aisladas cada una un mortero por separado.

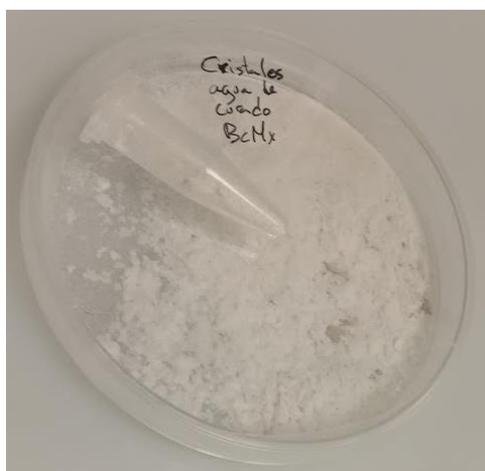


Figura 18 Placa Petri y Eppendorf con cristales recogidos sobre el agua de ensayo de las muestras de mortero con las bacterias *B. cohnii* y *M. xanthus*.

Se realizaron las imágenes en SEM (Figura 19) del cristal producido en el agua de curado de las muestras de mortero con Mx y Bc. Los resultados de EDX (Tabla 21) en el SEM del cristal se muestran en la tabla donde se observa presencia de carbono, oxígeno y calcio, sugiriendo que estos cristales son de carbonato cálcico ya que se reafirma con el análisis mediante FTIR mostrado en la Figura 20.

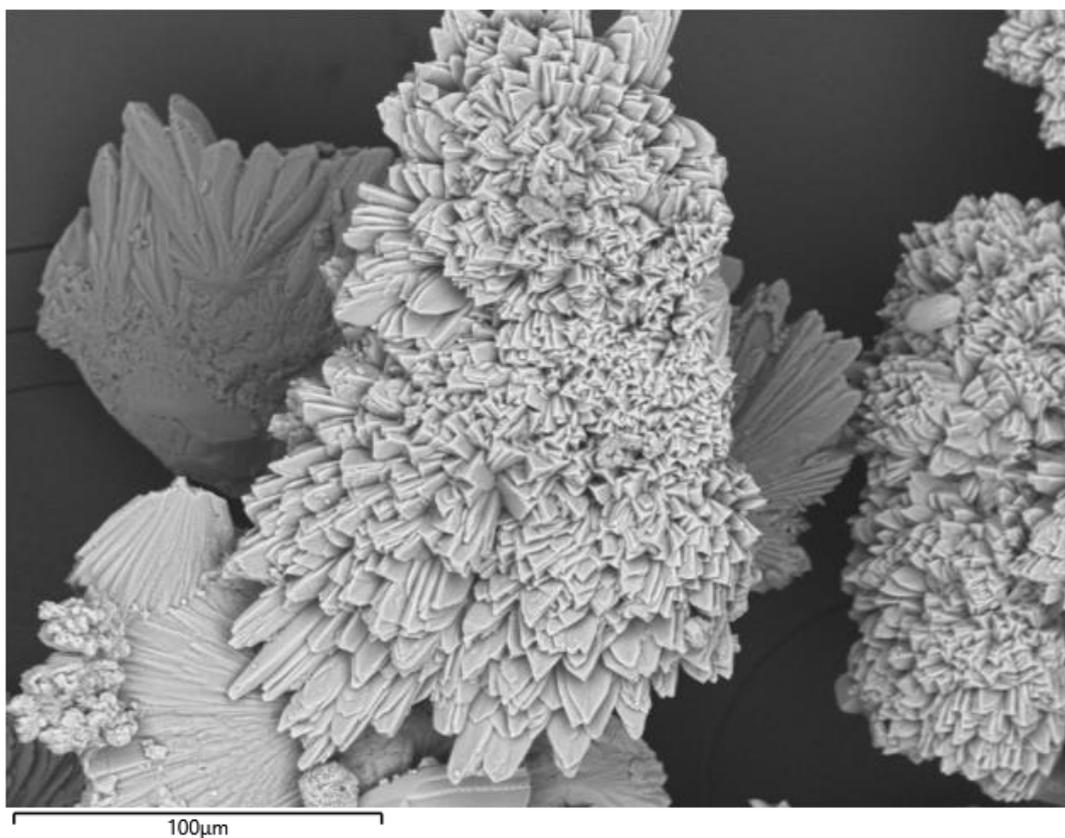


Figura 19 Imagen SEM de los cristales formados en el proceso de curación de las muestras de mortero con *M. xanthus* y *B. cohnii*.

Tabla 21 Elementos presentes y sus porcentajes en peso y atómicos en la grieta de los cristales formados en el proceso de curación de las muestras de mortero con *M. xanthus* y *B. cohnii*.

Elemento	Peso %	Peso % Sigma	Atómico %
C	16.60	1.17	27.46
O	38.91	1.02	48.34
F	2.58	0.51	2.70
Na	1.47	0.14	1.27
Al	0.47	0.07	0.35
K	5.37	0.20	2.73
Ca	34.60	0.74	17.16

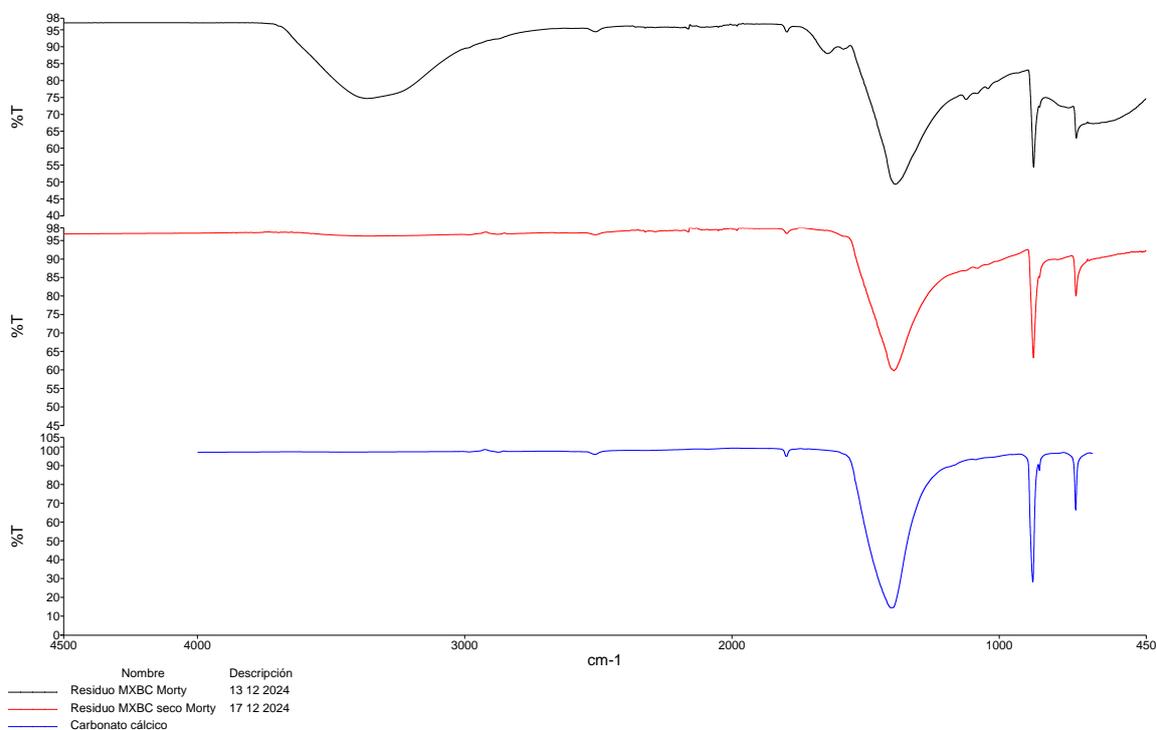


Figura 20 Gráfica resultado de un análisis IR de los cristales formados en el proceso de curación de las muestras de mortero con *M. xanthus* y *B.cohnii*.

Tabla 22 Evaluación de grietas realizadas mediante una lámina de cobre de 0,5mm en muestras de mortero Control trascurridos 0, 7, 14 y 28 días.

Muestra Ccu	Día 0	Día 7	Día 14	Día 28
1				
2				
3				

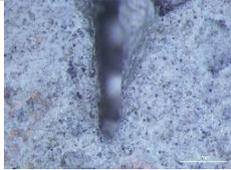
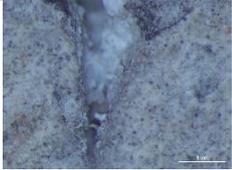
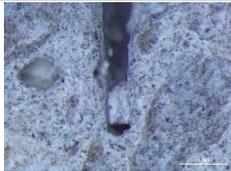
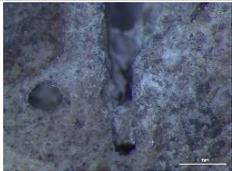
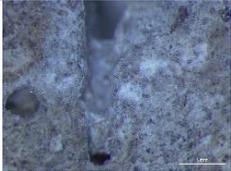
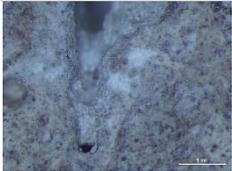
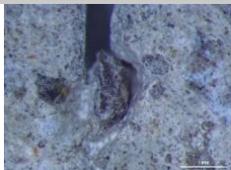
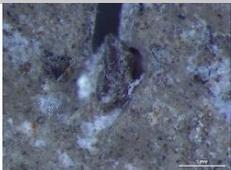
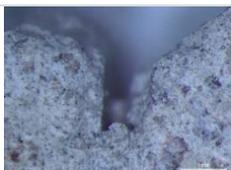
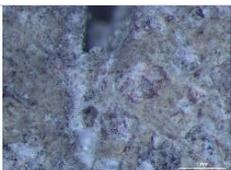
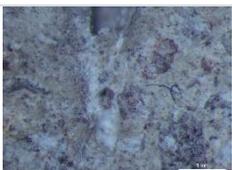
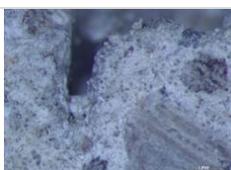
Muestra Ccu	Día 0	Día 7	Día 14	Día 28
4				
5				

Tabla 23 Evaluación de grietas realizadas mediante una lámina de cobre de 0,5mm en muestras de mortero Control con Lactato de calcio trascurridos 0, 7, 14 y 28 días.

Muestra CLcu	Día 0	Día 7	Día 14	Día 28
1				
2				
3				
4				

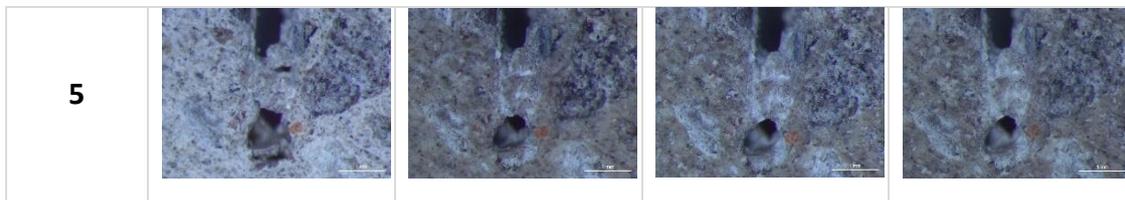


Tabla 24 Evaluación de grietas realizadas mediante una lámina de cobre de 0,5mm en muestras de mortero inoculadas con *B. cohnii* en su preparación, transcurridos 0, 7, 14 y 28 días.

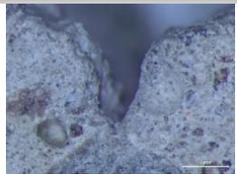
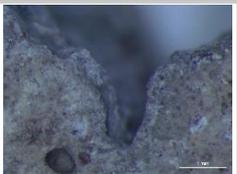
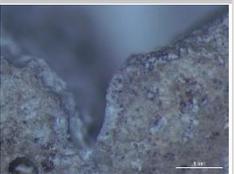
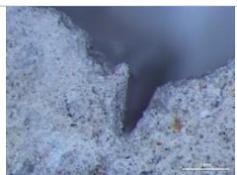
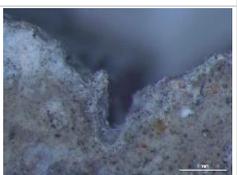
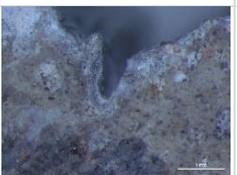
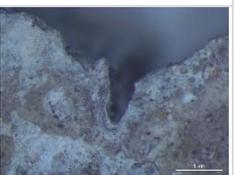
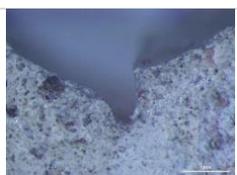
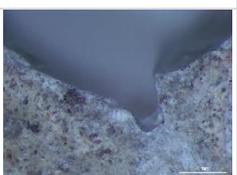
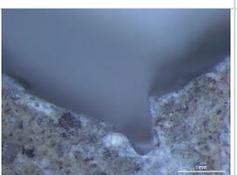
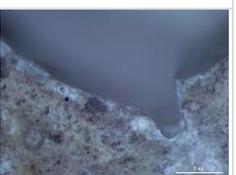
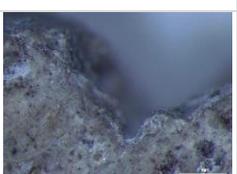
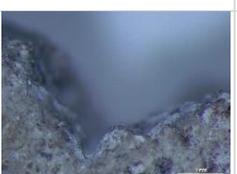
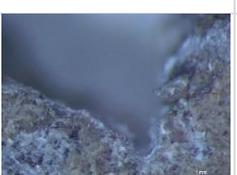
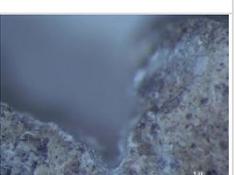
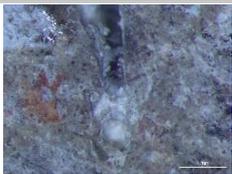
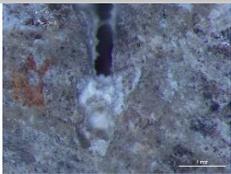
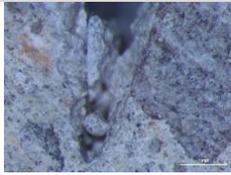
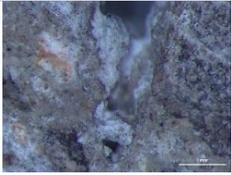
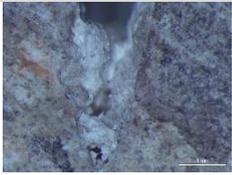
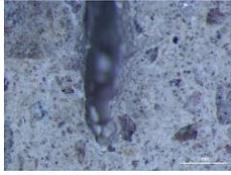
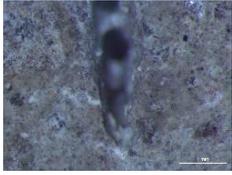
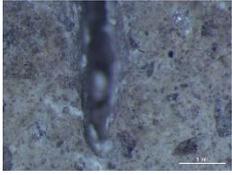
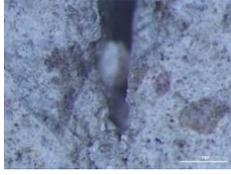
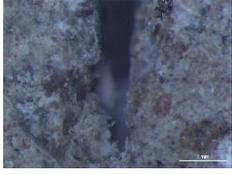
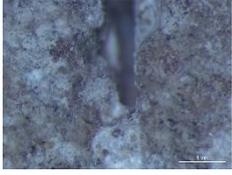
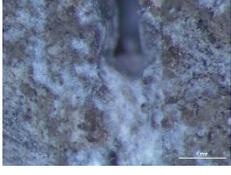
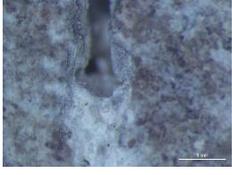
Muestra Bccu	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 28
1				
2				
3				
4				
5				

Tabla 25 Evaluación de grietas realizadas mediante una lámina de cobre de 0,5mm en muestras de mortero inoculadas con *M. xanthus* en su preparación, transcurridos 0, 7, 14 y 28 días.

Muestra Mxcu	Día 0	Día 7	Día 14	Día 28
1				
2				
3				
4				
5				

En el caso de las muestras de mortero agrietadas con lámina de cobre se observan ligeras precipitaciones, no dando lugar a una reparación, es posible que esto se deba a que el diámetro de las grietas sea demasiado grande (0,5mm) como para que sea reparado por las bacterias. Esto se observa en las tablas de la 13 a la 16.

3.6. Análisis y valoración de la reparación.

Se realizaron análisis de imagen con el programa de procesamiento digital ImageJ mediante la binarización de las imágenes (Figura 21) de las grietas a tiempo 0 y a tiempo

28 días de ensayo, para posteriormente medir el área de las grietas. A continuación, se calculó el área que había disminuido transcurrido el tiempo de ensayo mediante la Fórmula 1 [25]. Se obtuvieron los resultados de reparación mostrados en la Tabla 26.

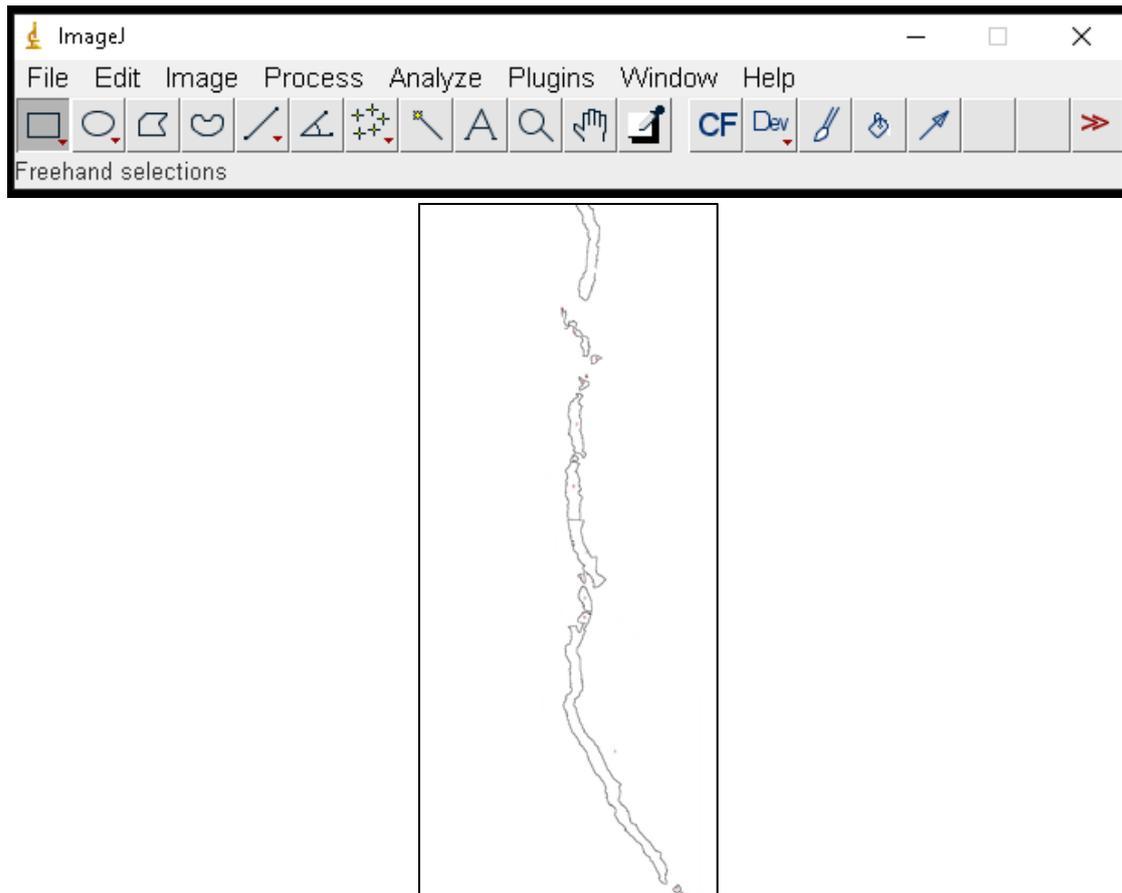


Figura 21 Imagen obtenida tras el cálculo del área de una grieta de una muestra de mortero tras la binarización con ImageJ.

Fórmula 1

$$\text{Ratio de reparación de la grieta (\%)} = \frac{A_{\text{Inicial}} - A_{\text{Final}}}{A_{\text{Inicial}}} \cdot 100\%$$

Donde A_{Inicial} es el área a tiempo 0 y A_{Final} es el área trascurridos 28 días de ensayo.

Tabla 26 Resultados del porcentaje de reparación de las grietas de cada tipo de muestra.

Muestras de mortero	Ratio de reparación (%)
Control (C)	78,3
Control Lactato (CL)	64,3
Con <i>B.cohnii</i> (Bc)	84,3
Con <i>M.xanthus</i> (Mx)	94,8
Con <i>Mx</i> y <i>Bc</i>	95,2

Se observó que los morteros con *M. xanthus*, con *B. cohnii* y especialmente los morteros con ambas bacterias (*M. xanthus* y *B. cohnii*) presentaban mayor ratio de reparación que los controles. El control con Lactato de calcio se comportaba peor a la reparación, esto podría influir en los morteros con bacterias, debido a que estos mismos también tienen lactato de calcio.

Asimismo, se realizaron ensayos de absorción basándose en una adaptación de la metodología de ensayo de la Norma UNE-EN 1015-18: "Métodos de ensayos de morteros para albañilería. Parte 18: Determinación del coeficiente de absorción de agua por capilaridad del mortero endurecido". Con ello se quería comprobar la diferencia de comportamiento entre muestras con bacteria y controles. Se comenzó aplicando 3 capas de recubrimiento sellante de naturaleza Epoxi de dos componentes para impermeabilizar todas las caras a excepción de la cara inferior (Figura 22). Posteriormente se pesaron las muestras (M0). La cara sin recubrimiento de cada muestra de mortero se sumergió 4-5mm en una lámina de agua, se realizaron pesadas a los 10 minutos de sumersión (M1), a los 90 minutos (M2) y a las 24 horas (M3) para posteriormente calcular los coeficientes de absorción de morteros (C), y de morteros de renovación (Cm).



Figura 22 Muestra de mortero con una de las grietas sin recubrimiento Epoxi aplicado, para ensayar la capacidad de absorción.

Se ensayaron muestras de mortero control sin ensayar (CA y CB) y ensayadas (C3 y C6), muestras de mortero control con lactato de calcio sin ensayar (CLA y CLB) y ensayadas (CL1 y CL3), y de muestras con bacterias sin ensayar (MxBcA y MxBcB) y ensayadas (Bc2, Bc5, Mx2, Mx4, MB1, MB2 y MB4). Las pesadas se a tiempo 0 (M0), a los 10 minutos (M1), a los 90 minutos (M2) y a las 24 horas (M3).

Posteriormente se calcularon los coeficientes de absorción para morteros (C), y para morteros renovados (Cm):

$$C = 0,1 (M2-M1) \text{ kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{min}^{0.5})$$

$$C_m = 0,625 (M3-M0) \text{ kg}/\text{m}^2$$

Se obtuvieron los resultados presentados en la *Tabla 27*.

Tabla 27 Resultados de coeficiente de absorción de morteros (Coef) y de morteros para renovación (Coef-m) de las muestras Control, Control lactato y mortero con bacterias sin

ensayar (C, CL, y MxBc), Control, Control lactato y morteros con bacterias ensayados (Cn, CLn, Bc, Mx y MB).

	Muestra	Coef	Coef-m
Controles sin ensayar	C	0,39	0,78
	CL	0,40	0,92
	MxBc	0,45	1,02
Controles ensayados	Cn	0,29	0,57
	CLn	0,42	0,96
Morteros con bacteria ensayados	Bc	0,35	0,76
	Mx	0,40	1,03
	MB	0,39	0,80

Se observa que los morteros que tienen el coeficiente de absorción más bajo son aquellos ensayados: Cn, Bc y MB respecto a sus homólogos no ensayados, exceptuando CLn y Mx que tienen valores de absorción mayores a sus homólogos no ensayados.

Esto se debe a que C, Bc y MB han reparado en mayor o menor medida las grietas. Por otro lado, es posible que la presencia de lactato de calcio aumente la absorción por parte del mortero, por eso este mortero (CL=0.4 y 0.92; CLn=0.42 y 0.96) presenta mayor coeficiente de absorción que el mortero control (C=0.39 y 0.78; Cn=0.29 y 0.57). Y es por ello, que los morteros con bacteria, incluidos aquellos no ensayados (MxBc= 0.45 Y 1.02), ya que todos tienen lactato de calcio, presenten mayor coeficiente de absorción (Bc=0.35 y 0.76; Mx= 0.4 y 1.03; MB=0.39 y 0.8) que el control ensayado (Cn y CLn) o sin ensayar (C, CL y MxBc). En este caso los resultados de morteros con bacteria serían comparables únicamente con el mortero control con lactato de calcio. Se observa así un mejor comportamiento de morteros con bacteria, siendo el coeficiente de los morteros Bc, Mx y MB menor que el de mortero control lactato ensayado (CLn) y sin ensayar (CL) en el caso del coeficiente de absorción de morteros (Coef). Sin embargo, en el caso del coeficiente de absorción de morteros para renovación (Coef-m) las muestras Bc y MB tienen mejor comportamiento que CLn, quedándose fuera el mortero con *M. xanthus*.

4 Resumen y conclusiones

En el proyecto MORTY, se seleccionaron diversas especies carbonatogénicas para evaluar su capacidad de formar cristales de carbonato cálcico en morteros. Entre las especies elegidas se encuentran 4 bacterias y un hongo. Las muestras de estas especies fueron mantenidas en criotubos, con el fin de preservar las cepas a largo plazo. Además, se aislaron y detectaron tres cepas bacterianas a partir de muestras líquidas con pH altamente básico.

Posteriormente, se realizaron ensayos para comprobar la capacidad de estas especies para formar cristales de carbonato cálcico. Entre las bacterias estudiadas, una destacó por producir la mayor cantidad de cristalización, mientras que la segunda mostró una alta viabilidad. Por esta razón, ambas cepas fueron seleccionadas para ser añadidas a los morteros en futuras pruebas.

Se prepararon varios tipos de morteros: uno de control, otro con suplemento cálcico, y los últimos con dos bacterias, tanto por separado como en combinación. Las muestras se fabricaron en pequeñas probetas, y se sometieron a pruebas de agrietamiento con un equipo ZwickRoell. Se determinó que la manera más efectiva de inducir las grietas era mediante este equipo, logrando pequeñas fisuras de hasta 0,3 mm sin que la muestra se rompiera por completo.

Durante el ensayo, las muestras se mantuvieron en condiciones de 100% de humedad. Se realizaron análisis de imagen utilizando un microscopio estereoscópico, lo que permitió observar la evolución de las grietas a lo largo del tiempo. Al finalizar los ensayos, se evaluaron las muestras nuevamente mediante el mismo microscopio estereoscópico, y adicionalmente, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) acoplado a un detector de rayos X para obtener detalles más precisos sobre la formación de cristales. Tras analizar los resultados, se observó que existía precipitaciones en muestras control, muestras con bacteria *B. cohnii*, *M. xanthus*, y ambas mezcladas. En muestras control con lactato de calcio se observó menos precipitación.

Los resultados mostraron que en el agua de ensayo de las muestras de mortero que contenían ambas bacterias (*M. xanthus* y *B. cohnii*) se formaba una lámina cristalina en el agua de ensayo, lo cual no ocurrió en las muestras de control. Los cristales fueron recogidos y analizados en el microscopio electrónico de barrido, donde se identificaron estructuras cristalinas compuestas principalmente de carbonato, calcio y oxígeno, confirmando la capacidad de estas bacterias para generar carbonato cálcico. Además, un análisis espectroscópico por FTIR reveló que el espectro de los cristales obtenidos coincidía con el del carbonato cálcico, lo que subraya la notable capacidad cristalizadora

de las bacterias seleccionadas.

Por otro lado, se observó tras el análisis superficial con ImageJ que el área de las grietas disminuía trascurrido el tiempo de ensayo en morteros con bacterias *B. cohnii*, *M. xanthus*, y ambas en conjunto, frente a los controles y controles con lactato.

En cuanto a los resultados de absorción se observó que las muestras control absorbían menor cantidad de agua, sin embargo, las muestras con bacteria absorbían más agua debido a que contenían lactato de calcio, ya que el mortero control con lactato de calcio ensayado, fueron las muestras que más agua absorbían, por lo tanto aquellos morteros con bacterias, tenían un mejor comportamiento a la absorción de agua debido a que poseían menor coeficiente de absorción de agua que los morteros control lactato.

Este estudio proporciona nuevas perspectivas sobre el uso de bacterias carbonatogénicas para mejorar las propiedades de los materiales de construcción, especialmente en el ámbito de los morteros. La capacidad de las bacterias para inducir la formación de carbonato cálcico en ambientes húmedos podría ser aprovechada en técnicas de consolidación y refuerzo de estructuras a lo largo del tiempo.

5 Anexos y bibliografía

- [1] T. Qureshi y A. Al-Tabbaa, «Self-healing Concrete and Cementitious Materials.,» de *Advanced functional materials*, 2020.
- [2] M. Maslyk, T. Gäb, G. Matveeva, P. Opitz, M. Mondeshki, Y. Krysiak, U. Kolb y W. Tremel, «Multistep Crystallization Pathways in the Ambient-Temperature Synthesis of a New Alkali-Activated Binder,» *Advanced Functional Materials*, vol. 32, 2022.
- [3] J. Lehne y F. Preston, «Making Concrete Change: Innovation in Low-carbon Cement and Concrete,» 2018.
- [4] A. Sandak, « Engineered living materials for sustainable and resilient architecture.,» *Nature Reviews Materials*, vol. 8, pp. 357-359, 2023.
- [5] W. Shanks, C. F. Dunant, M. P. Drewniok, R. Lupton, . A. Serrenho y J. M. Allwood, «How much cement can we do without? Lessons from cement material flows in the UK,» *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 141, pp. 441-454, 2019.
- [6] G. Golewski, «The phenomenon of cracking in cement concretes and reinforced concrete structures: the mechanism of cracks formation, causes of their initiation, types and places of occurrence, and methods of detection - a review.,» *Buildings* 13, nº 3, p. 765, 2023.
- [7] S. Liu, M. Zhu, X. Ding, Z. Ren, S. Zhao, M. Zhao y J. Dang, «High-Durability Concrete with Supplementary Cementitious Admixtures Used in Corrosive Environments,» *Crystals*, vol. 11 (2), nº 196, 2021.
- [8] . R. A. Khushnood, Z. A. Qureshi, N. Shaheen y S. Ali, «Bio-mineralized self-healing recycled aggregate concrete for sustainable infrastructure.,» *Sci. Total Environ.* , nº 135007, p. 703, 2020..
- [9] A. Ivaske, V. Gribniak, R. Jakubovskis y J. Urbonavicius, «Bacterial viability in self-healing concrete: a case study of non-ureolytic *Bacillus* species.,» *Microorganisms*, vol. 11, p. 2402, 2023.
- [10] H. Kim, H. M. Son, J. Seo y H. K. Lee, «Recent advances in microbial viability and self-healing performance in bacterial-based cementitious materials: a review.,» *Constr. Build. Mater.*, vol. 122094, p. 274, 2021.
- [11] F. Farmani, P. Khadiv-Parsi, A. A. Ramezani-pour, B. Bonakdarpour y F. Yazdian, «Dual eco-friendly application of silica fume and scoria in cement-based materials through the enhancement of microbially-induced carbonate precipitation.,» *Case Studies in Construction Materials* , nº e01481, p. 17, 2022.
- [12] N. Shaheen, R. A. Khushnood, S. A. Memon y F. Adnan, «Feasibility assessment of newly isolated calcifying bacterial strains in self-healing concrete.,» *Constr. Build. Mater.*, vol. 18, p. 362, 2023.
- [13] O. Šovljanski, A. Tomić y S. Markov, «Relationship between Bacterial Contribution

- and Self-Healing Effect of Cement-Based Materials,» *Microorganisms* , vol. 10, nº 7, p. 1399, 2022.
- [14] L. Z. Tan, B. Reeksting, I. Justo-Reinoso, V. Ferrandiz-Mas, A. Heath, S. Gebhard y K. Paine, «The effect of oxygen and water on the provision of crack closure in bacteria-based self-healing cementitious composites,» *Cem. Concr. Compos.*, vol. 17, p. 142, 2023.
- [15] H. Jonkers y E. Schlangen, Development of a bacteria-based self-healing concrete. In *Tailor Made Concrete Structures*; Walraven, S., FL, USA, 2008.: Taylor and Francis Group.; 2008.
- [16] H. J. Chen, Y. H. Huang, C. C. Chen y J. P. Maity, «Microbial Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP) Using Pig,» *Waste Biomass Valorization*, vol. 10, p. 2887–2895, 2018.
- [17] H. A. Algaifi, S. A. Bakar, R. Alyousef, A. R. Mohd Sam, M. H. W. Ibrahim, S. Shahidan , M. Ibrahim y B. A. Salami , «Bioinspired self-healing of concrete cracks using new *B. pseudomycooides* species.,» *J. Mater. Res. Technol.* , vol. 12, pp. 967-981, 2021.
- [18] R. Siddique, K. Singh, M. Kunal y V. C. Singh, «Properties of bacterial rice husk ash concrete,» *Constr. Build. Materials*, vol. 121, pp. 112-119, 2016.
- [19] W. Khaliq y M. B. Ehsan, «Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques,» *Constr. Build. Mater*, vol. 102, pp. 349-357, 2016.
- [20] G. Le Metayer-Levrel, S. Castanier, G. Orial, J. F. Loubiere y J. P. Perthuisot, «Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony.,» *Sediment Geol*, vol. 126, pp. 25-34, 1999.
- [21] K. Kawaai, T. Nishida, A. Saito y T. Hayashi, «Application of bio-based materials to crack and patch repair methods in concrete.,» *Constr. Build. Mater*, vol. 340, nº 127718, 2022.
- [22] F. Jroundi, P. Gómez-Suaga, C. Jimenez-Lopez, G.-M. Maria Teresa y M. A. Fernandez-Vivas, «Stone-isolated carbonatogenic bacteria as inoculants in bioconsolidation treatments for historical limestone.,» *Science of The Total Environment*,, vol. 425, pp. 89-98, 2012.
- [23] A. Van Wylick, H. Rahier, L. De Laet y E. Peeters, «Conditions for CaCO₃ Biomineralization by *Trichoderma Reesei* with the Perspective of Developing Fungi-Mediated Self-Healing Concrete,» *Global challenges*, vol. 8, nº 2300160, 2024.
- [24] N. Yamasamit, P. Sangkeaw, W. Jitchaijaroen, C. Thongchom, S. Keawsawasvong y V. Kamchoom, «Effect of *Bacillus subtilis* on mechanical and self-healing properties in mortar with different crack widths and curing conditions,» *Scientific Reports*, vol. 13, nº 1, pp. 2045-2322, 2023.
- [25] Z. Tianwen , S. Yilin , Z. Xuan , Z. Hengyi y Q. Chunxiang , «Effect and Mechanism of Encapsulation-Based Spores on Self-Healing Concrete at Different Curing Ages,»

ACS Applied Materials & Interfaces, vol. 12, nº 47, pp. 52415-52432 , 2020.

AIDIMME

INSTITUTO TECNOLÓGICO

Domicilio fiscal —

C/ Benjamín Franklin 13. (Parque Tecnológico)
46980 Paterna. Valencia (España)
Tlf. 961 366 070 | Fax 961 366 185

Domicilio social —

Leonardo Da Vinci, 38 (Parque Tecnológico)
46980 Paterna. Valencia (España)
Tlf. 961 318 559 - Fax 960 915 446

aidimme@aidimme.es

www.aidimme.es